

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Мулашкина Татьяна Игоревна

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

1.4.4. Физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

д.ф-м.н. Хренова Мария Григорьевна

Москва – 2025

Оглавление

Введение	5
Глава 1. Литературный обзор	14
1.1. Фосфороганические соединения	14
1.2. Ферменты, катализирующие реакции фосфороганических соединений	15
1.2.1. Фосфатазы	15
1.2.2. Регуляторные ферменты	16
1.2.3. Фосфоглюкомутазы	17
1.2.4. Киназы.....	17
1.2.5. Ферменты с промежуточным карбоксифосфатом.....	18
1.2.6. АТФазы или АТФ-синтазы.....	19
1.2.7. Фосфодиэстеразы.....	19
1.2.8. Нуклеотидилтрансферазы.....	20
1.2.9. Фосфотриэстеразы.....	20
1.3. Диссоциативный и ассоциативный типы разрыва Р-О связи.....	21
1.4. Фосфотриэстераза из бактерии <i>Pseudomonas diminuta</i> (Pd-PTE).....	24
1.4.1. Активный центр фосфотриэстеразы Pd-PTE	24
1.4.2. Механизм реакции гидролиза органоfosфатов.....	26
1.4.3. Каталитические свойства	28
1.5. Протеинкиназа А (PKA).....	30
1.5.1. Роль протеинкиназы А в глутаматергической системе мозга человека.....	30
1.5.2. Структура и активный центр PKA	31
1.5.3. Механизм реакции фосфорилирования в активном центре PKA	33
1.6. Белок открытой рамки считывания 2 (ORF2p)	35
1.6.1. Обратная транскрипция в активном центре ORF2p	35
1.6.2. Структура и активный центр ORF2p	36
Глава 2. Методы молекулярного моделирования.....	39

2.1. Методы молекулярной механики.....	39
2.2. Методы квантовой химии	40
2.3. Комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики.....	43
2.4. Поверхность потенциальной энергии.....	46
2.5. Дескрипторы электронной плотности и анализ порядка связи	47
2.6. Метод молекулярной динамики	50
2.7. Метод зонтичной выборки.....	53
Глава 3. Ферментативный разрыв Р-О связи: критерии диссоциативного и ассоциативного механизмов	57
3.1. Классификация модельных систем	57
3.2. Подготовка систем и протоколы расчетов	58
3.3. Сравнение активных центров ферментов.....	63
3.4. Анализ ключевых межатомных расстояний в активных центрах систем.....	64
3.5. Анализ дескрипторов электронной плотности и порядка связи	69
3.6. Применение методики к определению механизма реакции переноса фосфорила в аденилаткиназе.....	74
Глава 4. Гидролиз фосфорорганических соединений в активном центре фосфотриэстеразы бактерии <i>Pseudomonas diminuta</i>	78
4.1. Подготовка модельных систем и протокол расчетов.....	78
4.2. Применение критериев определения типа механизма	82
4.3. Механизм реакции гидролиза органофосфатов в активном центре Pd-PTE и профили энергии Гиббса.....	83
4.4. Сравнение ключевых межатомных расстояний в фермент-субстратном комплексе параоксона в активном центре Pd-PTE, содержащей катионы цинка.....	88
4.5. Особенности геометрии и электронной плотности промежуточного интермедиата реакции гидролиза органофосфатов в активном центре Pd-PTE	89
Глава 5. Фосфорилирование субстрата SP20 в активном центре протеинкиназы А	92

5.1. Подготовка модельной системы и протоколы расчетов	92
5.2. Конформационная динамика фермент-субстратного комплекса протеинкиназы А с псевдосубстратом SP20	95
5.3. Применение критериев определения типа механизма	100
5.4. Механизм реакции фосфорилирования субстрата SP20 в активном центре РКА и профили энергии Гиббса.....	101
Глава 6. Фосфорилирование ДНК в процессе обратной транскрипции в активном центре ORF2p	106
6.1. Подготовка модельной системы и протоколы расчетов	106
6.2. Применение критериев определения типа механизма	109
6.3. Механизм реакции удлинения цепи ДНК в активном центре ORF2p и профили энергии Гиббса	110
Заключение	113
Выводы.....	116
Список сокращений и условных обозначений.....	117
Список литературы	122

Введение

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, антиpirенов, 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), при этом реакция разрыва Р-О может следовать либо диссоциативному, либо ассоциативному 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 органоfosфатов 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 органоfosфатов 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 органоfosфата. Текущие исследования механизма гидролиза органоfosфатов 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 органоfosфатов 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 fosфатной группы от молекулы АТФ. Понимание

механизма передачи сигнала между цАМФ, РКА и К⁺ 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, содержания 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 (ПКА) 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 ПКА 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 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-PTE 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-PTE 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

метаfosфата 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 c^{-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 стеновых 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» (Сузdalь, 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:

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: DGBHXW. 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: YFOHVW. 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 аденоцинтрифосфатом // 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 // Biomeditsinskaia 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))

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.

Глава 1. Литературный обзор

1.1. Фосфороганические соединения

Фосфороганические соединения (ФОС), также известные как органофосфаты, представляют собой сложные эфиры фосфорной кислоты, содержащие алкильные или ароматические заместители (Рисунок 1.1.1). Эти соединения широко применяются в различных областях, включая сельское хозяйство в качестве пестицидов и гербицидов, а также в промышленности как антипиреды и в военных целях в качестве боевых отравляющих веществ [1,2]. Кроме того, эфиры фосфорной кислоты играют ключевую роль в биологических системах, являясь структурными компонентами таких жизненно важных биомолекул, как дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), рибонуклеиновая кислота (РНК) и аденоинтрифосфат (АТФ) [3]. Искусственные ФОС чаще всего представляют собой триэфиры, в то время как биологические органофосфаты обычно являютсяmono- и диэфирами.

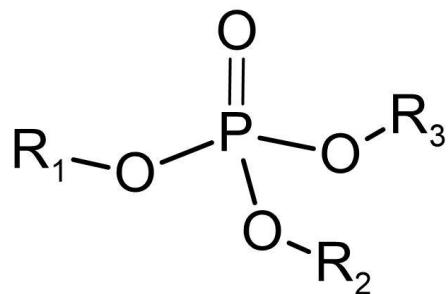


Рисунок 1.1.1. Общая химическая структура фосфороганических соединений. R₁, R₂ и R₃ – радикалы, в качестве которых могут выступать водороды, алкильные и арильные группы.

Реакции нуклеофильного замещения, происходящие в фосфорных центрах, представляют собой одну из наиболее распространённых химических реакций эфиров фосфорной кислоты [4]. К этим реакциям относятся гидролиз и фосфорилирование. Гидролиз органофосфатов представляет собой замещение уходящей группы гидроксидом или молекулами воды. Гидролиз ФОС является одной из ключевых реакций в биохимии, участвуя в регуляции функций белков, выработке энергии, а также в многочисленных метаболических и сигнальных процессах. Несмотря на то, что триэфиры не являются

природными биомолекулами, ферменты эволюционировали для катализитического гидролиза этих потенциально токсичных соединений. Фосфорилирование белков представляет собой фундаментальный механизм регуляции функциональной активности ключевых клеточных белков, играющий центральную роль в сигнальных путях и метаболических процессах. В ходе данной химической реакции осуществляется перенос остатка фосфорной кислоты от донора на аминокислотный остаток белка или иного субстрата. Основными аминокислотами, подвергающимися фосфорилированию, являются серин, треонин, тирозин и гистидин.

1.2. Ферменты, катализирующие реакции фосфорорганических соединений

1.2.1. Фосфатазы

Фосфатазы – ферменты, которые катализируют гидролиз фосфатных моноэфиров. Известны щелочные и кислые фосфатазы, фиолетовые кислые фосфатазы и фосфопротеинфосфатазы [3].

Щелочные фосфатазы присутствуют в большинстве организмов и катализируют гидролиз дианионной формы фосфомоноэфиров. Реакция, катализируемая щелочными фосфатазами, протекает через промежуточный фосфосерин. Все щелочные фосфатазы в активном центре содержат два катиона цинка Zn^{2+} и один катион магния Mg^{2+} , а также аминокислотный остаток аргинина, который играет ключевую роль в связывании ФОС. Катионы цинка непосредственно играют катализическую роль, а магний выступает в роли основания, депротонирующего серин для образования нуклеофильного алкоголята серина [5].

Как и щелочные фосфатазы, кислые фосфатазы неспецифично катализируют гидролиз фосфомоноэфиров через промежуточный фосфофермент. Кислые фосфатазы характеризуются консервативным нуклеофильным гистидином, отсутствием ионов металлов, кислым рН-оптимумом и наличием аминокислотного остатка аспарагиновой кислоты, который на первой стадии реакции участвует в протонировании уходящей

группы, а на второй стадии выступает в качестве основания депротонирования нуклеофильной молекулы воды [6].

Фиолетовые кислые фосфатазы катализируют гидролиз фосфомоноэфиров. В качестве нуклеофила в этих ферментах выступает гидроксид-анион, координированный катионами металлов. Характерный фиолетовый цвет этих ферментов обусловлен переносом заряда с тирозината на консервативный катион железа Fe^{3+} . В качестве второго катиона в активном центре фиолетовых фосфатаз встречаются катионы двухвалентных металлов: железа, цинка и марганца. Кроме того, активные центры фиолетовых кислых фосфатаз содержат семь инвариантных аминокислот, координирующих биядерный металлоцентр.

Фосфопротеинфосфатазы обычно классифицируют на две группы по субстратной специфичности и генетической гомологии: тирозиновые протеинфосфатазы и фосфосерин/фосфотreonин-специфичные фосфатазы [7]. Фосфосерин/фосфотреонин-специфичные фосфатазы, как следует из названия, дефосфорилируют остатки фосфосерина и фосфотреонина. Эти фосфатазы, аналогично фиолетовым кислым фосфатазам, имеют биядерный активный центр, а в качестве нуклеофила также выступает гидроксид-анион. В отличие от них, тирозиновые протеинфосфатазы не содержат катионов металлов в активном центре.

1.2.2. Регуляторные ферменты

Обратимое фосфорилирование белков обеспечивает один из основных способов передачи сигнала как у прокариот, так и у эукариот. В эукариотических клетках фосфорилирование происходит по аминокислотным остаткам серина, треонина или тирозина. А у прокариот используется так называемый двухкомпонентный механизм передачи сигнала, при котором фосфатная группа переносится с АТФ сначала на гистидин сенсорного белка, а затем на аспартат белка-регулятора [8].

Одним из классов белков, участвующих в процессе передачи сигнала, являются гуанин-нуклеотид-связывающие белки, также известные как ГТФ-связывающие белки или G-белки [9]. Эти белки катализируют гидролитическую реакцию ГТФ, в результате

которой образуется гуанозинидифосфат (ГДФ). ГТФ-белки разделяют на два класса: мономерные малые ГТФазы и гетеротримерные G-белки комплексы. К первому из них относится суперсемейство белков Ras, которое по структуре, последовательности и выполняемым функциям делится на пять основных семейств Ras, Rho, Ran, Rab и Arf. Семейство G-белков Ras демонстрирует низкую активность по сравнению с типичными ГТФазами. Активирующие ГТФазу белки, называемые GAP, значительно ускоряют гидролиз ГТФ в Ras-белках.

1.2.3. Фосфоглюкомутазы

α - и β -фосфоглюкомутазы (PGM) катализируют превращение D-глюкозы-1-фосфата (G1P) в глюкозо-6-фосфат (G6P) и наоборот, соответственно. Оба фермента содержат катион магния и α - и β -глюкозо-1,6-дифосфат в качестве кофакторов. Реакция протекает через образование промежуточного фосфофермента как результата взаимодействия глюкозо-1,6-дифосфата с нуклеофилом в активном центре фермента. В качестве нуклеофила в α -PGM выступает аминокислотный остаток серина, а в β -PGM – аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты. Фосфорилированная фосфоглюкомутаза связывается либо с G1P, либо с G6P и катализирует перенос фосфатной группы на C(6)OH или C(1)OH соответственно [10].

1.2.4. Киназы

Киназы – это ферменты, которые катализируют перенос γ -фосфата от доноров фосфатов к определенным субстратам. Этот процесс известен как фосфорилирование, при котором высокоэнергетическая молекула АТФ передает фосфатную группу молекуле субстрата. В результате реакции фосфорилирования образуется аденоzinидифосфат (АДФ) и фосфорилированный субстрат. Большинство киназ содержит катионы магния в активном центре, которые участвуют в координировании АТФ. Киназы классифицируются в зависимости от субстрата, подвергающегося фосфорилированию [11]. Основные группы включают протеинкиназы (подробнее про

одну из протеинкиназ будет изложено в разделе 1.5), липидкиназы и углеводные киназы. Также существует значительное количество киназ, действующих на нуклеотиды, такие как нуклеозидфосфаткиназа и нуклеозидифосфаткиназа. В качестве субстратов в реакциях фосфорилирования, катализируемых киназами, также могут выступать и небольшие молекулы, такие как креатин, фосфоглицерат, рибофлавин, шикимат и другие.

1.2.5. Ферменты с промежуточным карбоксифосфатом

Целый ряд ферментов катализирует процесс фосфорилирования бикарбоната, используя аденоинтрифосфат (АТФ) или фосфоенолпируват (ФЕП) для синтеза промежуточного соединения — карбоксифосфата. Этот промежуточный интермедиат является лабильным и впоследствии вступает в реакцию с аммиаком, образуя карбамат, или карбоксилирует акцептор. Наиболее хорошо изученные ферменты этого класса: ФЕП-карбоксилаза, биотинкарбоксилаза и карбамоилфосфатсинтетаза.

ФЕП-карбоксилаза [12] катализирует фосфорилирование бикарбоната с помощью фосфоенолпирувата с образованием оксалоацетата и неорганического фосфата. Механизм реакции включает перенос фосфорила от ФЕП к бикарбонату с образованием связанного с катионом магния енолята пирувата и карбоксифосфата, который затем декарбоксилируется до HPO_2^{2-} и CO_2 . Полученный углекислый газ реагирует с енолятом пирувата с образованием оксалоацетата.

В ферментах биотинкарбоксилазы [13] и карбамоилфосфатсинтетазы [14] фосфорилирование происходит с помощью АТФ. В активном центре биотинкарбоксилазы происходит карбоксилирование биотина. Механизм данной реакции схож с реакцией протекающей в активном центре ФЕП-карбоксилазы. Карбамоилфосфатсинтетаза катализирует синтез карбамоилфосфата из глутамина или аммиака и бикарбоната. Карбоксифосфат, образованный фосфорилированием бикарбоната АТФ, реагирует с аммиаком с образованием карбаминовой кислоты, которая в свою очередь вступает в реакцию со второй молекулой АТФ, образуя карбамоилфосфат и АДФ.

1.2.6. АТФазы или АТФ-сингтазы

Аденозинтрифосфатазы (АТФазы) представляют собой класс ферментов, которые катализируют разложение АТФ на АДФ и фосфат-ион. Эта реакция высвобождает энергию, которую фермент использует для запуска других процессов. АТФ-сингтазы – ферменты, которые катализируют обратную реакцию – образование АТФ из АДФ и неорганического фосфата. К классу АТФаз относятся такие ферменты, как миозин, кинезин и F₁-АТФаза.

Миозин – это моторный белок, который играет ключевую роль в преобразовании химической энергии гидролиза АТФ в механическую энергию для сокращения мышц. Кинезин – моторный белок, использующий энергию гидролиза АТФ для таких клеточных процессов как митоз, мейоз и транспорт везикул. F₁-АТФаза – это вращательный белок-мотор, работающий за счет гидролиза АТФ, который высвобождаемую энергию гидролиза преобразует в механическую энергию. Сравнительный анализ результатов моделирования [15], проведенного различными независимыми исследовательскими группами, выявил, что механизм гидролиза аденозинтрифосфата в активных центрах указанных ферментов подчиняется общим закономерностям. В качестве промежуточного соединения в реакции гидролиза образуется метафосфат, который предпочтительнее атакуется нуклеофильным гидроксид-анионом. Атакующая вода координируется глутаматным основанием и карбонильной группой основной цепи, что позволяет отщепить протон от воды с образованием гидроксильного нуклеофила. Далее отщепленный протон переносится на γ -фосфат в связанном продукте АДФ с неорганическими фосфатом.

1.2.7. Фосфодиэстеразы

Фосфодиэстеразы (ФДЭ) представляют собой класс ферментов, катализирующих гидролиз фосфодиэфирных связей [16]. В большинстве случаев под термином «фосфодиэстеразы» подразумеваются циклические нуклеотидные фосфодиэстеразы, которые расщепляют фосфодиэфирную связь в молекулах «вторичных мессенджеров»,

таких как циклический аденоzinмонофосфат (АМФ) и циклический гуанозинмонофосфат (ГМФ). Однако существует также множество других семейств фосфодиэстераз, включая фосфолипазы С и D, аутотаксин, ДНКазы и РНКазы. Эти ферменты катализируют разрыв фосфодиэфирных связей в ДНК или РНК.

1.2.8. Нуклеотидилтрансферазы

Нуклеотидилтрансферазы представляют собой группу ферментов, относящихся к классу трансфераз, которые катализируют перенос фосфорилированных групп, таких как нуклеотидловые остатки или нуклеозидмонофосфаты. Эти ферменты играют ключевую роль в разнообразных биологических процессах, включая синтез нуклеиновых кислот и репарации ДНК.

1.2.9. Фосфотриэстеразы

Как было сказано ранее в разделе 1.1, триэфиры фосфорной кислоты не встречаются в природе, а попадают в окружающую среду в результате антропогенной деятельности. Эти химические соединения используются в качестве пестицидов, инсектицидов и антипиренов, что обуславливает их широкое распространение в различных экосистемах. Фосфотриэстеразы (ФТЭ или РТЕ) представляют собой ферменты, катализирующие процесс гидролиза триэфиров. Их открытие стало возможным благодаря изучению механизмов устойчивости некоторых видов насекомых к инсектицидам и способности микроорганизмов к биодеградации пестицидов [17,18]. Наиболее хорошо изучена фосфотриэстераза почвенной бактерии *Pseudomonas diminuta*. Подробнее про этот фермент будет изложено в разделе 1.4.

1.3. Диссоциативный и ассоциативный типы разрыва Р-О связь

Нуклеофильное замещение в фосфорорганических соединениях может протекать по различным механизмам (Рисунок 1.3.1). В процессе нуклеофильного замещения происходит атака атома фосфора нуклеофилом Nu: и разрыв связи P-O_{LG}, приводящий к отщеплению уходящей группы (-OR_{LG}). Данная реакция может протекать в одну (согласованный механизм) или две стадии (ступенчатый механизм). Кроме того, реакция может идти по ассоциативному или диссоциативному пути. При диссоциативном механизме реакции разрыв P-O_{LG} связи предшествует нуклеофильной атаке и образуется переходное состояние или промежуточный метафосфат для согласованных (D_NA_N) и ступенчатых (D_N+A_N) реакций соответственно. При ассоциативном механизме, наоборот, нуклеофильная атака происходит до разрыва P-O_{LG} связи с образованием стационарного состояния с пентакоординированным атомом фосфора, которое может быть переходным состоянием для согласованной реакции (A_ND_N) или промежуточным интермедиатом для ступенчатой реакции (A_N+D_N). В случае согласованных механизмов степень образования связи P-Nu и разрыва P-O_{LG} связи определяет по какому пути (диссоциативному или ассоциативному) идет реакция [19].

Одна из первых классификаций разрыва P-O_{LG} в фосфорорганических соединениях была предложена Воршелом [20], который в своих работах проводил теоретическое исследование поверхностей энергии Гиббса неферментативного гидролиза монометилфосфата. Были рассмотрены все состояния протонирования атомов кислорода фосфатных групп и две формы нуклеофила (гидроксид-анион и молекула воды). Данное исследование проводилось с использованием квантово-механических расчетов *ab initio* с использованием моделей неявного растворителя. Таким образом, было показано, что гидролиз нейтрального метилфосфата протекает по ассоциативному механизму, тогда как гидролизmono- и дианионных метилфосфатов происходит со схожими активационными барьерами (разница между барьерами ниже погрешности используемого метода) как по ассоциативному так и по диссоциативному путям. Кроме того, было показано, что различие между ассоциативным и диссоциативным механизмами не может быть показано с использованием привычных наблюдаемых маркеров, например, таких как линейное соотношение свободной энергии по Брёнстеду (LFER) или изотопный эффект [21]. А

также в работе [22] было проведено сравнение энергетических барьеров реакции гидролиза фосфорорганических соединений с различными уходящими группами. Что показало влияние pK_a уходящей группы на тип механизма реакции: при высоком значении pK_a реакция протекает по ассоциативному механизму, а при более низком предпочтительнее диссоциативный механизм.

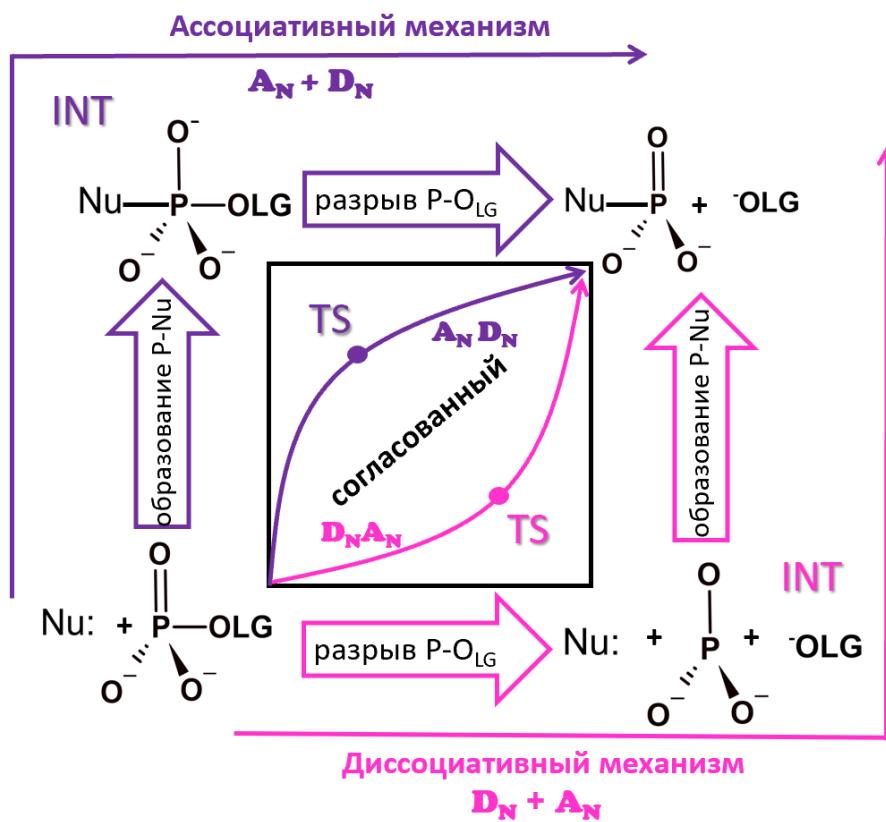


Рисунок 1.3.1. Механизмы разрыва $P-O_{LG}$ связи. Нуклеофил $Nu:$ атакует атом фосфора и происходит разрыв $P-O_{LG}$ связи. Реакция может протекать согласованно через образование одного переходного состояния (TS) или в две стадии (ступенчато) с образованием промежуточного интермедиата (INT). При ассоциативном механизме образование связи $P-Nu$ предшествует разрыву $P-O_{LG}$ связи (фиолетовый цвет). При диссоциативном механизме сначала происходит разрыв $P-O_{LG}$ связи, а затем образование связи $P-Nu$ (розовый цвет)

Позднее данная классификация типов механизма реакций фосфорорганических соединений была применена для ферментативных реакций. Прародителем таких исследований стало изучение механизма реакции гидролиза гуанозинтрифосфата (ГТФ) до гуанозиндифосфата (ГДФ) в активном центре белкового комплекса Ras-GAP. Первоначально рассчитанный механизм реакции методом эмпирической валентной связи (EVB) отнесли к ассоциативному типу реакции [23]. В связи с биомедицинской

значимостью данной системы, а также развитием вычислительных методов рос интерес к дальнейшему изучению этой реакции. Так, в 2010 году механизм реакции был пересмотрен в нескольких исследованиях с использованием комбинированных методов квантовой механики/молекулярной механики [24,25] и EVB более высокого уровня [26], что позволило более точно воспроизвести механизм и отнести реакцию гидролиза ГТФ к диссоциативному типу.

Последующий растущий интерес к изучению механизмов ферментативного разрыва P-O_{LG} связи фосфорорганических соединений привел к активному использованию терминологии классификации типов механизмов и сделал ее общепринятой [15,27]. Однако, наблюдались и противоречивые результаты по определению типа механизма реакции. Например, механизм реакции гидролиза АТФ до аденоzinифосфата в активном центре миозина первоначально был классифицирован как ассоциативный [28–30]. Однако, позднее в других исследованиях [31–33] был доказан диссоциативный тип реакции.

В связи с тем, что экспериментально определить тип механизма реакции практически невозможно, обычно используются другие подходы. В частности, проводятся кинетические измерения для гомологических рядов и определяются линейные соотношения свободной энергии (LFER) [34]. Кроме того, для изучения механизма реакции может использоваться анализ электростатических сил [35], действующих на два атома кислорода в переходном состоянии, однако он требует определения стационарной точки на поверхности потенциальной энергии (ППЭ). Также для определения типа механизма можно рассчитывать кинетический изотопный эффект и энталпию/энтропию активации [36–38], а также проводить молекулярное моделирование. Для этого требуется расчет полного энергетического профиля с использованием комбинированных методов квантовой механики/молекулярной механики, что может быть использовано для расчетов стационарных точек, отвечающих минимумам и переходным состояниям на ППЭ, либо для молекулярно-динамического моделирования на поверхности свободной энергии.

Кроме того, одним из способов определения типа механизма является использование уравнения Полинга [39], которое позволяет оценить дробное число связей (n):

$$D(n) = D(l) - 0,6 \log n, \quad (1.3.1)$$

где $D(n)$ – среднее значение разницы между длинами разрываемой и образующейся связей в переходном состоянии, $D(l)$ – средняя длина Р-О связи, значение которой составляет 1,73 Å. Значение n определяет собой вероятность разрыва Р-О_{LG} связи по ассоциативному механизму.

1.4. Фосфотриэстераза из бактерии *Pseudomonas diminuta* (Pd-PTE)

1.4.1. Активный центр фосфотриэстеразы Pd-PTE

Фосфотриэстераза из бактерии *Pseudomonas diminuta* (Pd-PTE) представляет собой гомодимер с молекулярной массой 72 кДа, каждый мономер которого состоит из 329 аминокислотных остатка и сворачивается в (α/β)₈-бочку (ТИМ-бочка) [40]. Активный центр фермента расположен на С-конце центрального ядра β -листа и содержит биметаллический центр (Рисунок 1.4.1) [41–49]. Нативным металлом активного центра является цинк.

Известно, что в металлоферментах наиболее распространённым лигандом для каталитических цинковых центров выступают остатки гистидина. Две пары аминокислотных остатков гистидина His55/His57 и His201/His230 являются бидентатными лигандами, причем первая пара связывается с первичным каталитическим центром Zn_α, а вторая – со вторичным Zn_β. Помимо гистидинов His55 и His57 катион Zn_α координирован с аминокислотным остатком аспарагиновой кислоты Asp301. Кроме того, оба катиона цинка связаны друг с другом через мостиковый гидроксид-анион и карбаматную функциональную группу карбоксилированного лизина Lys169. Таким образом, первичный центр Zn_α имеет тригонально-бипирамидальную координацию, а вторичный Zn_β – тетраэдрическую и в большей степени подвержен влиянию растворителя [50].

Для изучения роли гистидиновых остатков в каталитической активности Pd-PTE семь аминокислотных остатков были по отдельности заменены на аспарагин с помощью сайт-направленного мутагенеза [51]. Сравнение каталитической активности мутантных

форм фермента с его диким типом показало, что только аминокислотный остаток His123 никак не связан с реакционной активностью или структурной целостностью Pd-PTE. Замены аминокислотных остатков His257 и His254 оказали слабое влияние на каталитические свойства фермента.

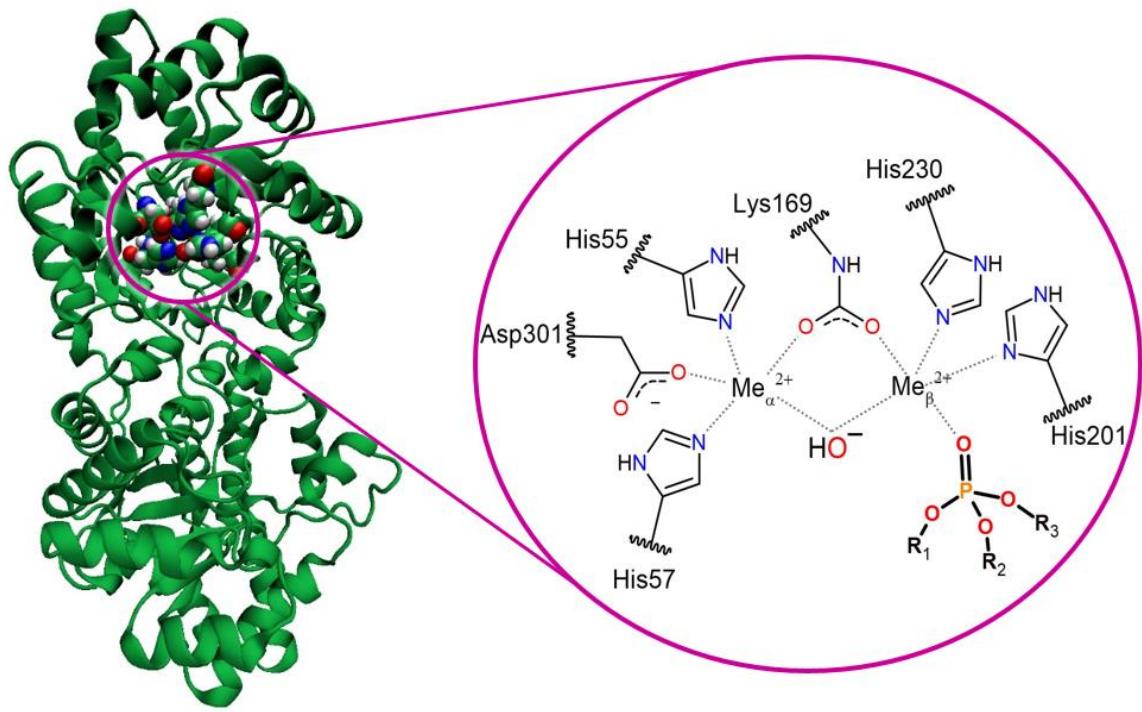


Рисунок 1.4.1. Слева: структура фосфотриэстеразы из бактерии *Pseudomonas diminuta* (Pd-PTE), в которой атомы активного центра показаны сферами. Справа: активный центр Pd-PTE с органофосфатом, где пунктирными линиями показаны координационные связи α и β катионов металла Me^{2+}

Наиболее изученным органоfosфатом, гидролиз которого катализируется фосфотриэстеразой Pd-PTE, является параоксон (диэтил-4-нитрофенилfosфат). Для комплекса параоксона в активном центре фосфотриэстеразы были получены кристаллические структуры, а также проведены различные исследования по изучению связывания параоксона в активном центре Pd-PTE и механизма реакции его гидролиза. Установлено, что в активном центре фермента доступно три кармана для связывания трех fosфатных групп (Рисунок 1.4.2): малый карман (Gly60, Ile106, Leu303 и Ser308), большой (His254, His257, Leu271 и Met317) и выходной (Trp131, Phe132, Phe306 и Tyr309) карманы [52,53]. Боковые этильные заместители параоксона связываются в большом и малом карманах, а уходящая группа органоfosфата связывается в выходном кармане.

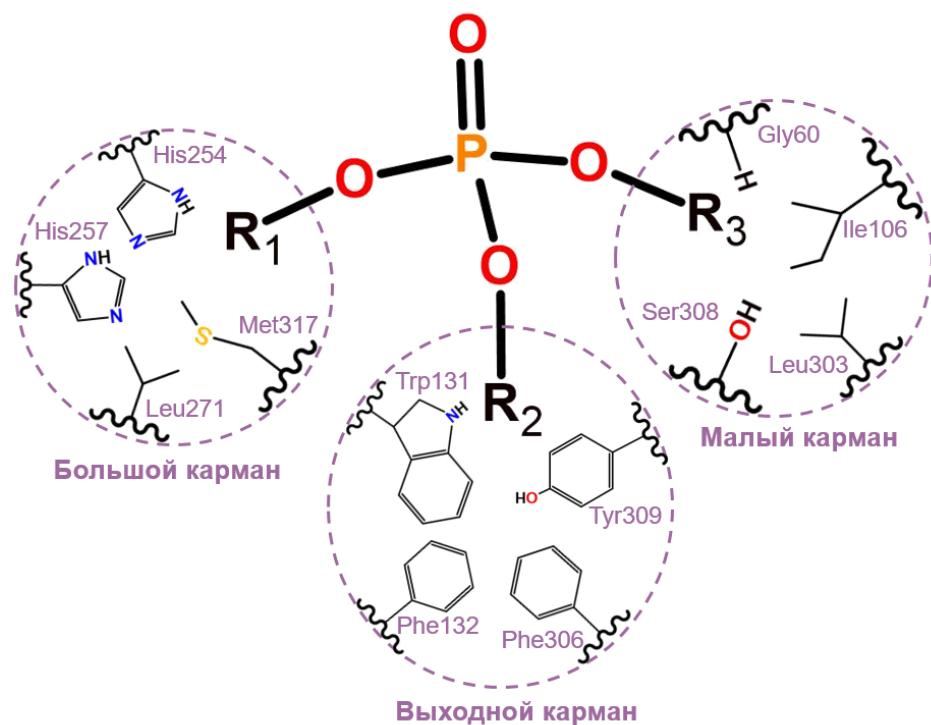


Рисунок 1.4.2. Карманы связывания в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE

1.4.2. Механизм реакции гидролиза органоfosфатов

Точный механизм гидролиза фосфорорганических соединений в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE не установлен. Установлено, что гидролиз органоfosфатов начинается с нуклеофильной атаки атома фосфора гидроксид-анионом с образованием интермедиата с пентакоординированным фосфором (Рисунок 1.4.3) [47,50,54–63]. На данный момент было проведено несколько работ молекулярного моделирования механизма реакции гидролиза параоксона в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE. Основной вопрос, поднимаемый в обсуждениях механизма данной реакции, связан со стадией образования интермедиата, а именно с переносом протона гидроксид-аниона. В ряде работ [54,59] было показано, что образование интермедиата сопровождается переносом протона с гидроксид-аниона на аспарагиновую кислоту Asp301 (Рисунок 1.4.3(Б)), тогда как в других работах [56,58,60] утверждается, что протон остается на нуклеофильном кислороде в ходе всей реакции и, таким образом, продуктом реакции является протонированная форма фосфорорганического продукта (Рисунок 1.4.3(А)). Также в работе [56] показали, что различия в природе уходящей группы могут определять

состояния продукта (протонированная или депротонированная форма). Для этого были проведены оценки состояния протонирования продукта реакции с помощью расчетов потенциалов средней силы (PMF). Оказалось, что в случае параоксона протонированное состояние продукта гидролиза на 5,5 ккал/моль стабильнее непротонированного, в то время как в случае диэтил-4-хлорфенилфосфата депротонированная форма стабильнее на 13,2 ккал/моль.

Кроме того, был предложен механизм реакции гидролиза параоксона с участием «центральной» молекулы воды (Рисунок 1.4.3(В)), расположенной между двумя катионами цинка и гидроксид-анионом, который в свою очередь координируется Zn₂₊ [61,62]. Однако, было показано, что гидроксид-анион обладает достаточной нуклеофильностью для прямой атаки на фосфорной центре и энергетические барьеры реакции в таком случае оказываются ниже [54,59].

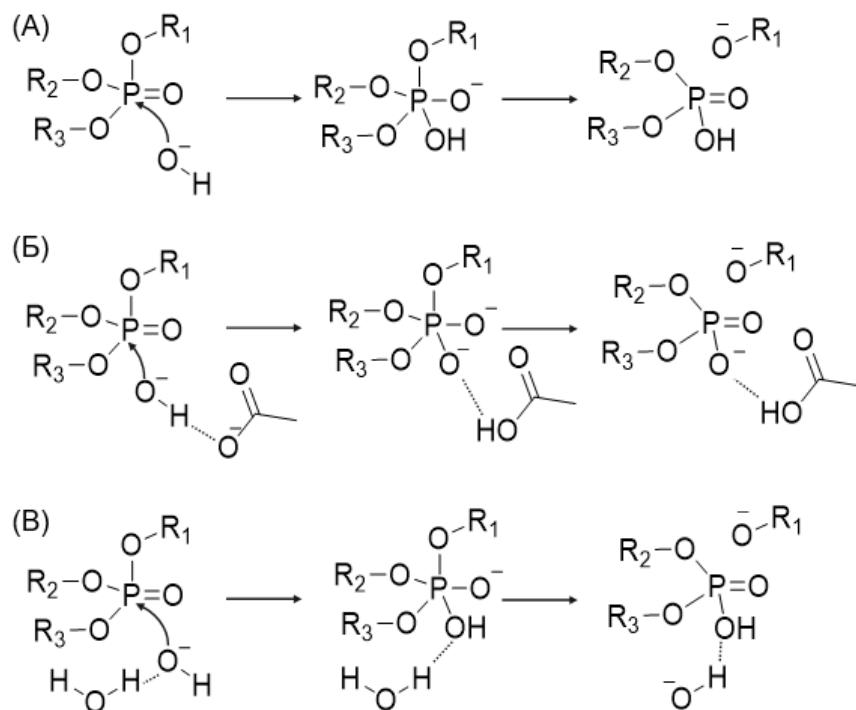


Рисунок 1.4.3. Предполагаемые механизмы гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы. (А) Реакция протекает без переноса протона с гидроксид-аниона, что приводит к образованию протонированного продукта реакции. (Б) В ходе образования интермедиата происходит перенос протона с гидроксид-аниона на аспарагиновую кислоту Asp301 и образуется депротонированный продукт. (В) Механизм аналогичный механизму (А), но включающий «центральную» молекулу воды, стабилизирующую гидроксид-анион

Стоит отметить, что среди всех указанных вычислительных исследований продукты реакции стабилизированы относительно реагентов только в работе [59], в других случаях продукты реакции дестабилизированы относительно фермент-субстратного комплекса на энергетических профилях. В работах [56,58,60] использовался двухуровневый подход, который заключался в получении геометрических конфигураций полуэмпирическими методами (AM1 или PM3), а для дальнейшей корректировки полученных энергий использовали теорию функционала электронной плотности Кона-Шэма (ТФП) с функционалом B3LYP. Однако, известно, что полуэмпирические методы, в частности AM1 и PM3 имеют ограничения для расчетов фосфорсодержащих соединений [64,65] и металлоферментов [66]. По словам авторов, данный подход был выбран в связи с тем, что использование ТФП требовало высоких временных и ресурсных затрат. Развитие современных вычислительных мощностей позволяет использовать более широкий спектр методов теории функционала электронной плотности для описания большого числа систем [67].

В работе [63] было проведено сравнение каталитических констант k_{kam} и k_{kam}/K_m для изучения кинетической роли Asp301. Для этого эти константы были определены спектрофотометрически для фермента дикого типа и мутантных форм Asp301Ala и Asp301Asn. Замена заряженного аминокислотного остатка аспарагиновой кислоты на незаряженный аланин или аспарагин приводит к падению каталитической активности фермента на 2-3 порядка по сравнению с ферментом дикого типа. Понижение каталитической активности при замене аспарагиновой кислоты на незаряженные аминокислотные остатки, может объясняться отсутствием акцептора для протона гидроксид-аниона.

1.4.3. Каталитические свойства

Определение ферментативной активности Pd-PTE для гидролиза некоторых органофосфатов было проведено в работе [68]. Кинетические константы схемы Михаэлиса-Ментен представлены в таблице 1.4.1. Согласно этим данным фосфотриэстераза Pd-PTE гидролизует параоксон с $k_{kam} = 2230 \text{ с}^{-1}$ и дибутил-4-

нитрофенилфосфат с $k_{kam} = 570 \text{ c}^{-1}$ и не проявляет каталитической активности с такими органофосфатами, как дибутилфенилфосфат и трифенилфосфат. Таким образом, каталитическая активность Pd-PTE сильно зависит от pK_a уходящей группы.

Таблица 1.4.1. Кинетические константы гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE при температуре 30°C [68]

Органофосфат	k_{kam}, c^{-1}	$K_m, \text{мкМ}$	$k_{kam}/K_m, M^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$
параоксон	2230 ± 40	140 ± 10	$(2,4 \pm 0,2) \cdot 10^7$
дибутил-4-нитрофенилфосфат	570 ± 40	380 ± 30	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^6$
дибутилфенилфосфат	-	-	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^0$
трифенилфосфат	-	-	$< 10^{-3}$

Замена катионов цинка на другие двухвалентные металлы – кадмий, кобальт, марганец или никель не влияет на конформацию белка, но повышает каталитическую активность фермента [51]. Наблюдаемые константы скорости реакции гидролиза параоксона в активном центре Pd-PTE с различными катионами металлов (Таблица 1.4.2): $k_{kam} = 2300 \text{ c}^{-1}$ для цинкосодержащей Pd-PTE, $k_{kam} = 6000 \text{ c}^{-1}$ для Pd-PTE с кадмием в активном центре, $k_{kam} = 7800 \text{ c}^{-1}$ для кобальтсодержащей Pd-PTE.

Таблица 1.4.2. Кинетические константы гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE, содержащей различные катионы металлов при температуре 25°C [51]

Катионы	k_{kam}, c^{-1}	$K_m, \text{мкМ}$	$k_{kam}/K_m, M^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$
Zn^{2+}	2300	68	$3,4 \cdot 10^7$
Cd^{2+}	6000	460	$1,3 \cdot 10^7$
Co^{2+}	7800	130	$6,0 \cdot 10^7$

В работе [69] были получены графики Брёнстеда, связывающие pK_a уходящей группы с наблюдаемыми кинетическими параметрами, V_{max} и V/K_m . Таким образом, было показано, что лимитирующей стадией может являться как химическая реакция, так и физический процесс в зависимости от уходящей группы органофосфата. То есть, гидролиз субстратов, у которых $pK_a < 7$, может быть ограничен каким-либо физическим процессом. Это может быть связано с конформационными изменениями или

диффузионными ограничениями, вызванными связыванием субстрата и/или диссоциацией продукта с поверхности фермента. В частности, было показано, что гидролиз параоксона ($pK_a = 7,14$) протекает со скоростью очень близкой к скорости диффузионно-контролируемой реакции.

1.5. Протеинкиназа А (РКА)

1.5.1. Роль протеинкиназы А в глутаматергической системе мозга человека

Нормальная деятельность центральной нервной системы (ЦНС) обеспечивается балансом глутаминовой кислоты (Glu) и γ -аминомасляной кислоты (ГАМК): глутаминовая кислота является главным возбуждающим медиатором, ответственным за проведение основных потоков информации в ЦНС (сенсорные сигналы, двигательные команды, память), а ГАМК – главным тормозным медиатором, запрещающим проведение «ненужной» информации (внимание, двигательный контроль). Нарушение баланса между глутаминовой кислотой и ГАМК является причиной многих когнитивных отклонений – синдрома дефицита внимания и гиперактивности, повышенной нервозности и тревожности у взрослых, нарушения сна и бессонницы, эпилепсии. За поддержание этого баланса ответственна глутаматергическая система мозга – базовая система памяти и обучения [70–72].

Важнейшее значение для функционирования нейронной сети имеет взаимодействие молекул глутаминовой кислоты и N-ацетиласпартилглутамата (NAAG) с метаботропными рецепторами mGluR3 и mGluR2. Результатом взаимодействия NAAG с mGluR3 является активация кальций-зависимого фермента аденилаткиназы, который катализирует химическую реакцию преобразования АТФ в цАМФ с отщеплением пироfosфата (Рисунок 1.5.1). В свою очередь, молекула цАМФ взаимодействует с регуляторными доменами фермента протеинкиназы А (РКА), передавая сигнал в каталитические домены РКА для фосфорилирования гидроксильных групп серина или треонина в калиевом канале, что приводит к освобождению катионов калия (K^+) через ионный канал и к генерации потенциала на мембране. Фосфорилирование РКА

субъединиц АМРА-рецепторов регулирует синаптическую передачу, лежащую в основе нейропластичности, возбуждения нейронов и преобразования внешних стимулов в электрические сигналы.

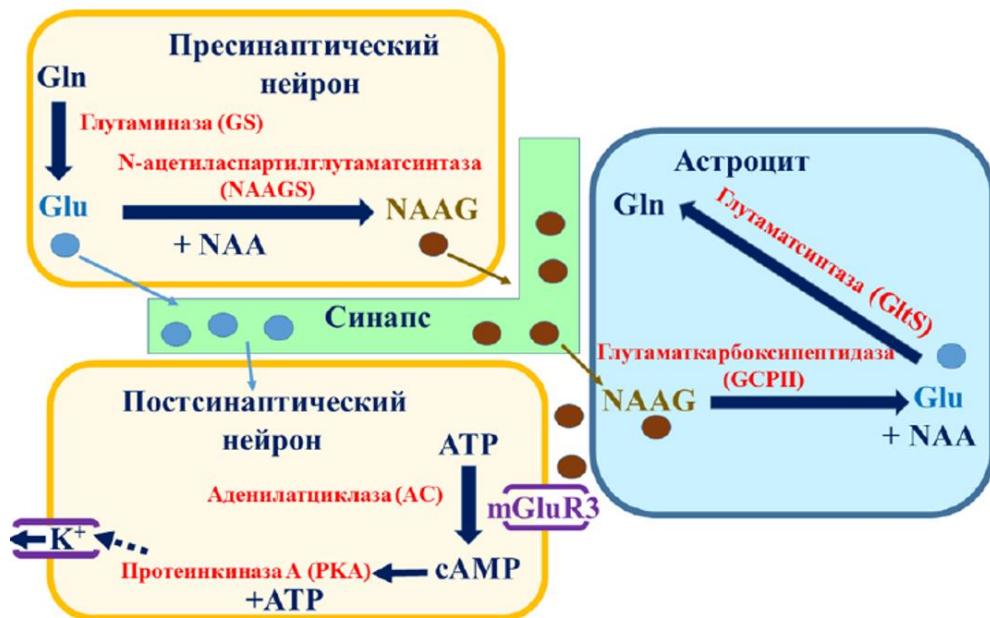


Рисунок 1.5.1. Схема взаимосвязанных молекулярных процессов в глутаматергической системе мозга человека [70]

1.5.2. Структура и активный центр PKA

Протеинкиназа А (PKA) представляет собой гетеротетramer, состоящий из регуляторного димера и двух каталитических субъединиц [73,74]. Каталитические субъединицы активируются при связывании циклического аденоцимонофосфата (цАМФ) с регуляторным димером, что приводит к диссоциации тетрамера. Каталитическая субъединица состоит из малой доли (N-доли), большой доли (C-доли) и щели между ними (Рисунок 1.5.2). Малая доля, включающая большое количество аминокислотных остатков, обеспечивает место связывания для АТФ. Большая доля содержит открытую поверхность, доступную для связывания пептидных субстратов, а также содержит ключевые каталитические аминокислотные остатки (каталитическая петля из аминокислотных остатков 166-171). Основание щели между малой и большой долями образует глубокий гидрофобный карман для связывания аденинового кольца.

АТФ. Именно в этой щели происходит каталитическая реакция фосфорилирования субстрата молекулой АТФ.

Молекула АТФ играет роль связующего звена между малой и большой долями, благодаря образованию водородных связей с аминокислотными остатками в этой области [75]. Одним из наиболее гибких сегментов каталитического ядра является глицин-богатая петля (остатки 50-55), которая играет ключевую роль в позиционировании γ -фосфата АТФ [76]. С другой стороны, петля, позиционирующая Mg^{2+} (остатки 184-187), содержащая мотив DFG (Asp184-Phe185-Gly186), является одним из наиболее консервативных сегментов, входящих в состав каталитического ядра [77].

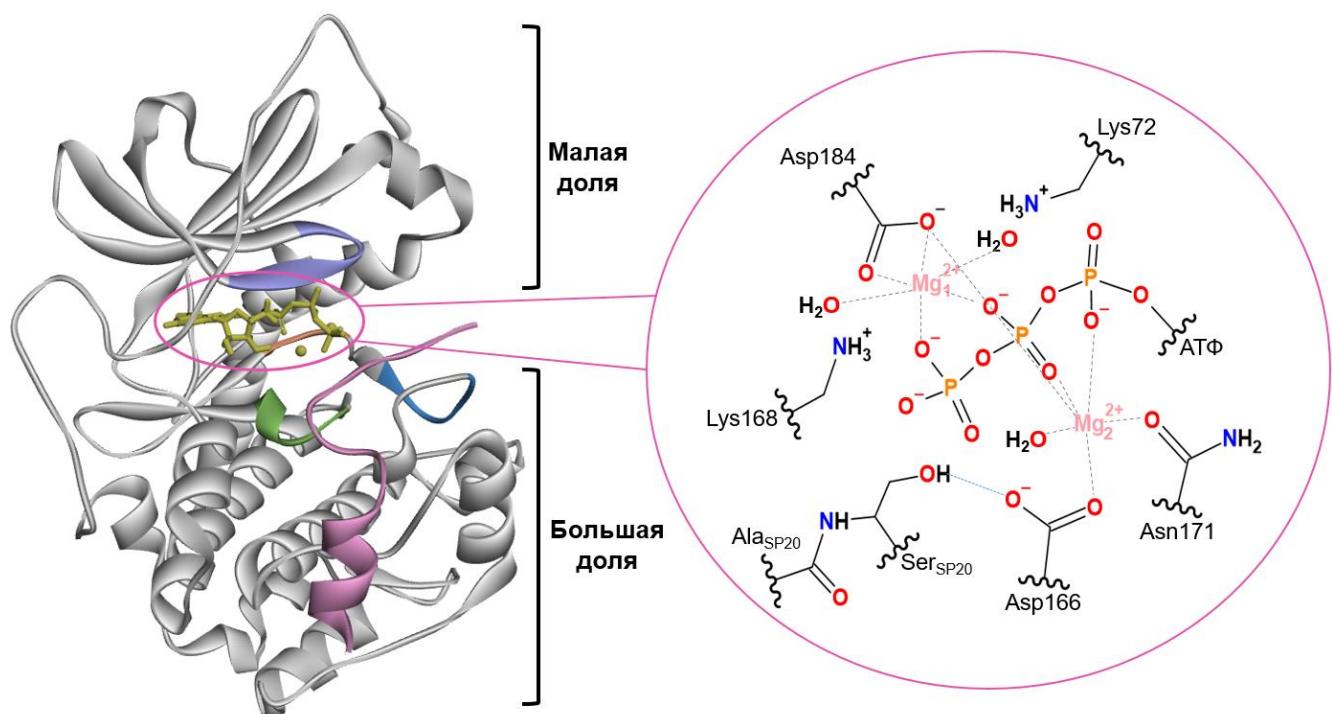


Рисунок 1.5.2. Слева: структура протеинкиназы А. Структурные мотивы обозначены цветом: щель активного центра – желтый, активационная петля – синий, каталитическая петля – зеленый, глицин-богатая петля – фиолетовый и мотив DFG – оранжевый. Субстрат SP20 представлен розовым цветом. Справа: активный центр протеинкиназы А. Пунктирными линиями обозначены координационные связи, точечной синей линией обозначена водородная связь между водородом гидроксо-группы субстрата и остатком Asp166

Каталитический центр РКА (Рисунок 1.5.2), как и большинство киназ, содержит катионы магния, которые необходимы для каталитической реакции, поскольку магний увеличивает сродство фермента к АТФ [78]. Катионы магния считаются физиологическим кофактором из-за их высокой концентрации в клетке по сравнению с

другими ионами двухвалентных металлов. Однако, другие катионы двухвалентных металлов могут замещать Mg^{2+} в активном центре. Например, катионы марганца, кобальта, кальция, стронция и кадмия способствуют связыванию АТФ, но каталитическая активность при этом наблюдается только с катионами марганца, кобальта и кадмия в активном центре РКА [77]. Кроме того, каталитическая активность фермента в присутствии катионов магния в 2-10 раз выше, чем в присутствии катионов других металлов.

Один из катионов магния (Mg_1) образует координационные связи с β - и γ -фосфатами АТФ, аминокислотным остатком аспарагиновой кислоты Asp184 и двумя молекулами воды. Второй катион магния (Mg_2) координируется аминокислотными остатками аспарагиновой кислоты Asp184, аспарагина Asn171, молекулой воды, а также α - и γ -фосфатами АТФ. Кроме того, активный центр РКА содержит каталитическую триаду, включающую в себя аминокислотные остатки лизина Lys72, глутаминовой Glu91 и аспарагиновой кислот Asp184. Помимо этого, ключевым аминокислотным остатком в активном центре протеинкиназы А является аспарагиновая кислота Asp166, которая является акцептором протона в каталитической реакции [79–81]. Его замена на незаряженный аминокислотный остаток аланин показывает снижение каталитической активности фермента. Также отмечается важная роль аминокислотных остатков лизина Lys72 и Lys168 в связывании АТФ и возможной последующей стабилизации переходного состояния реакции фосфорилирования [79,82–84]. Исследования по замене лизина Lys72 показали снижение каталитической активности фермента, тогда как, аминокислотный остаток Lys168 не является консервативным и может быть заменен на аланин без потери каталитической активности фермента.

1.5.3. Механизм реакции фосфорилирования в активном центре РКА

Протеинкиназа А фосфорилирует остатки серина или треонина в белковых субстратах, содержащих специфичные консенсусные последовательности типа [85]: Arg-Arg-X-Ser/Thr-Y и Arg-X-X-Arg-X-X-Ser/Thr-Y, где X – любой аминокислотный остаток, Y – большой гидрофобный остаток (Рисунок 1.5.3). Каноническим псевдосубстратом

является кемптид [86], получаемый в результате фосфорилирования РКА в пируваткиназе с последовательностью Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly. Также известен термостабильный ингибитор протеинкиназы (РКИ) [87], состоящий из 75 аминокислотных остатков и имеющий высокое сродство к РКА. Часть этого ингибитора (аминокислотные остатки 5-24), IP20, является высокоаффинным пептид-ингибитором протеинкиназы А. В связи с тем, что IP20 в сайте фосфорилирования (Р) содержит аланин вместо серина или треонина, он считается псевдосубстратом. Для превращения его в субстрат достаточно провести аминокислотную замену аланина на серин в сайте фосфорилирования. Такую последовательность демонстрирует субстрат PKS (аминокислотный ряд 14-22) [88]. Однако при изучении РКИ было обнаружено, что замена аспарагина на аланин в положении Р-1 снижает степень связывания ингибитора, что может способствовать изучению кинетических особенностей протеинкиназы [89]. Таким образом был синтезирован субстрат SP20. Для субстратов кемптид и PKS экспериментально определены кинетические константы реакции фосфорилирования: $k_{kam} = 400 \text{ c}^{-1}$ для кемптид и $k_{kam} = 170 \text{ c}^{-1}$ для PKS [88].

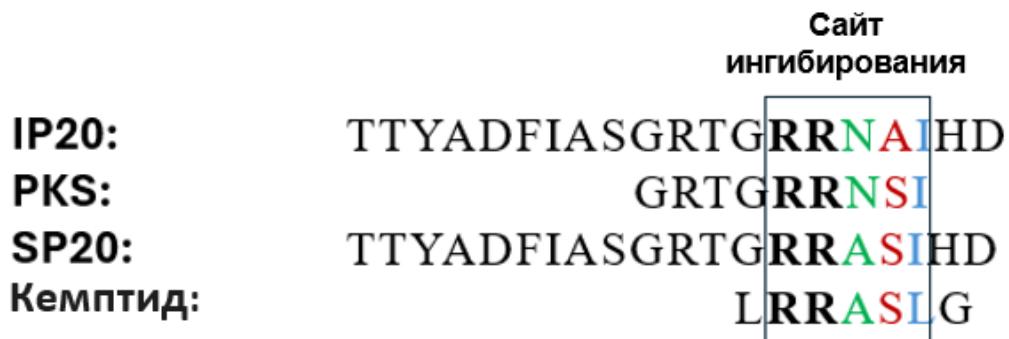


Рисунок 1.5.3. Аминокислотные последовательности ингибитора РКИ и субстратов PKS, SP20 и кемптида, связывающиеся с каталитическим сайтом РКА. Черная рамка показывает общий для них сайт ингибиования, занимающий позиции от Р-3 до Р+1. Красным цветом обозначены остатки, занимающие сайт фосфорилирования, синим – гидрофобный остаток, зеленым – аминокислотный остаток X

Реакция фосфорилирования, сопровождающаяся разрывом Р-О связи, может протекать по диссоциативному или ассоциативному механизму. В диссоциативном переходном состоянии разрыв связи между фосфорным центром и атомом уходящей группы происходит раньше, чем образование связи с атомом нуклеофила. Таким образом,

переходное состояния представляет собой метафосфат. И наоборот, при ассоциативном механизме образуется пентакоординированное переходное состояние.

В работе [90] были проанализированы профили потенциальной энергии для двух этих возможных механизмов реакции фосфорилирования субстрата SP20 в активном центре РКА. Таким образом, авторами было показано, что диссоциативный механизм энергетически более выгоден, чем ассоциативный. Причем, было установлено, что при ассоциативном механизме, реакция протекает в одну стадию с переносом протона с гидроксо-группы серина субстрата на кислород АТФ. И в зависимости от того, какой из кислородов АТФ является акцептором, были получены энергетические барьеры в 27,00 и 33,81 ккал/моль. В случае диссоциативного механизма авторы предполагают, что реакция происходит в два этапа: 1) фосфорилирование субстрата и перенос протона гидроксильной группы серина на остаток Asp166, 2) обратное протонирование фосфорилированного субстрата. Энергетические барьеры этих стадий реакции равны 9,22 и 5,32 ккал/моль (или 12,82 ккал/моль для другого кислорода АТФ) соответственно.

Во многих протеинкиназах этап переноса фосфорила считается лимитирующей стадией каталитического цикла. На скорость переноса фосфорила могут влиять такие факторы, как расположение каталитических аминокислотных остатков, катионов магния и расположение субстрата в активном центре фермента. Однако, высвобождение продуктов – АДФ и фосфорилированного субстрата – также может быть лимитирующей стадией в данных реакциях [78].

1.6. Белок открытой рамки считывания 2 (ORF2p)

1.6.1. Обратная транскрипция в активном центре ORF2p

Длинный диспергированный ядерный элемент-1 (LINE-1) принадлежит к ретротранспонозонам с недлинными концевыми повторами (non-LTR), которые используют стратегию «копирования и вставки» для саморепликации [91]. Их активность может способствовать aberrантной транскрипции, инсерционному мутагенезу,

повреждению ДНК и нестабильности генома [92,93]. Эти процессы играют ключевую роль в патофизиологии рака, аутоиммунных заболеваний и процессов старения. Каждый человек наследует около 100 потенциально активных копий LINE-1 среди полумиллиона неактивных копий LINE-1, что составляет 17% генома человека [94]. Полностью функциональный LINE-1 кодирует три белка: ORF0p, ORF1p и ORF2p [95]. Последние два белка участвуют в ретротранспозиции. ORF1p обладает активностью нуклеинового шаперона. Тогда как ORF2p обладает эндонуклеазной и обратной транскриптазной ферментативной активностью, что делает его потенциальной терапевтической мишенью

1.6.2. Структура и активный центр ORF2p

Фермент ORF2p состоит из семи доменов (Рисунок 1.6.1): N-концевой эндонуклеазы (EN, остатки 1-238), карбоксиконцевого домена (CTD, остатки 1061-1275) и пяти основных доменов ORF2p, к которым относятся три канонических домена обратной транскриптазы: пальцы (остатки 440-557), ладонь (остатки 558-775) и большой палец (остатки 776-862), а также два уникальных для ORF2p домена: башня (остатки 239-439) и запястье (остатки 863-1061) [96]. EN домен является наиболее изученным и отвечает за образование разрывов ДНК, используемых доменами обратной транскриптазы для инициации синтеза кДНК, что приводит к образованию вставок LINE-1 *de novo*. Домены EN демонстрируют толерантность к одиночным и множественным точечным мутациям без существенного нарушения их способности вызывать повреждения ДНК. Домены обратной транскриптазы используют 3-гидроксильную цепь ДНК, расщепленную хромосомой, для создания двухцепочечной ДНК. Домен башни имеет спирали и гибкий линкер с доменом EN, при этом аминокислотные остатки 270-274 отвечают за снижение цитотоксичности ORF2p. Домен CTD контактирует с РНК-матрицей и способствует раскручиванию РНК.

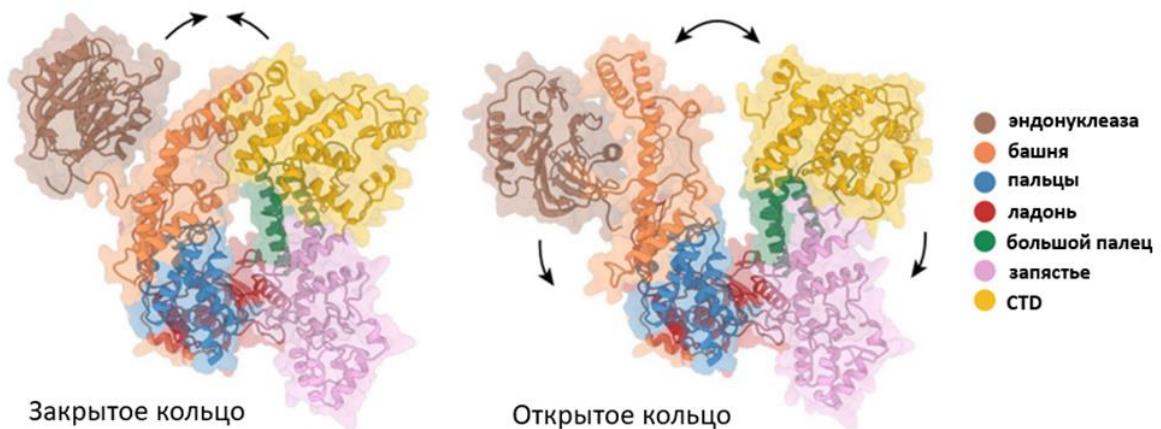


Рисунок 1.6.1. Структура белка ORF2p: слева – открытая конформация, справа – закрытая конформация. Цветами обозначены семь доменов ORF2p

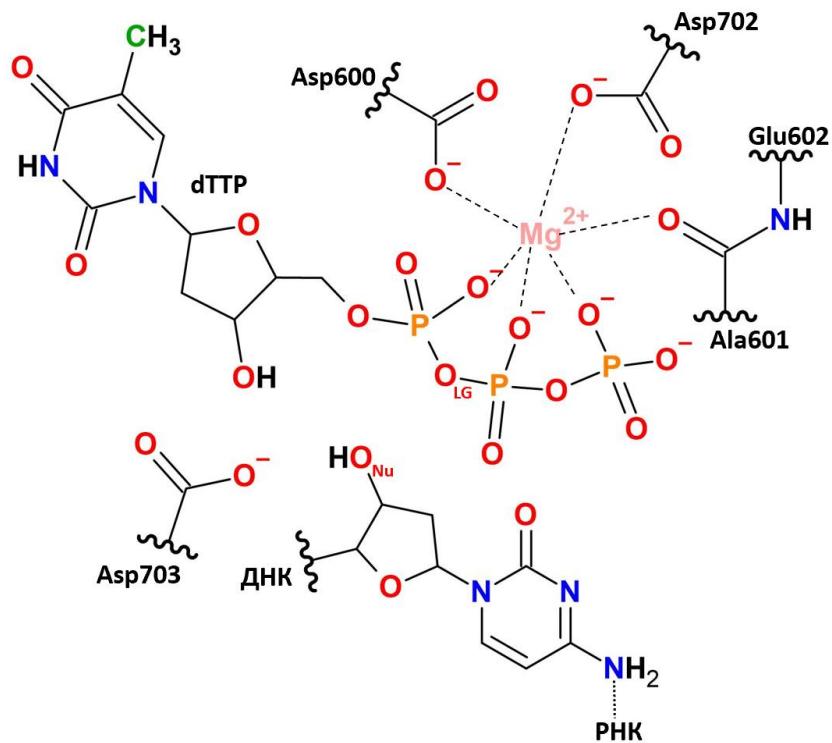


Рисунок 1.6.2. Активный центр ORF2p, включающий в себя каталитическую триаду из трех аспарагиновых кислот и катион магния, который координирует нуклеотид тимидинтрифосфат (dTTP). Пунктирными линиями обозначены координационные связи катиона магния, точечной линией обозначена водородная связь с РНК

Структурные особенности белка ORF2p, а именно его конформации, сильно влияют на его активности. В открытой конформации (или открытое кольцо) ORF2p склонен к ретротранспозиции, а закрытая конформация (или закрытое кольцо), в которой домены башня и CTD расположены близко к друг другу, способствует удержанию РНК. Также

выделяют две конформации ORF2p, отличающиеся пространственным расположением доменов обратной транскриптазы (пальцы, ладонь, большой палец) относительно друг друга: «большой палец вверх» и «большой палец вниз». Конформация «большой палец вверх» активна и обеспечивает доступ к активному центру для РНК-матрицы, тогда как конформация «большой палец вниз», наоборот, неактивна. При этом, в конформации «большой палец вниз» домен большой палец располагается в активном центре и занимает сайт связывания нуклеиновых кислот.

Процесс обратной транскрипции происходит в активном центре (Рисунок 1.6.1), который расположен в домене ладони. Активный центр включает в себя каталитическую триаду из трех аспарагиновых кислот Asp600, Asp702 и Asp703 и катион магния, который отвечает за связывание и координацию трифосфатов, из которых в дальнейшем достраивается ДНК.

Глава 2. Методы молекулярного моделирования

2.1. Методы молекулярной механики

В процессе молекулярного моделирования системы могут описываться с применением положений классической механики (молекулярной механики) или квантовой механики в зависимости от специфики задачи и масштабов исследуемой системы. Для изучения больших молекулярных систем, таких как биологические макромолекулы используются подходы молекулярной механики [97].

Основополагающим предположением, на котором базируются методы молекулярной механики, является адиабатическое приближение Борна-Оппенгеймера [98]. Это приближение позволяет разделить движение ядер и электронов, представляя энергию системы как функцию исключительно ядерных координат. Таким образом, молекулярные структуры представляются как совокупность атомов, связанных гармоническими силами.

В молекулярной механике применяются два ключевых допущения: аддитивность и переносимость. Первое допущение предполагает, что потенциальная энергия системы может быть выражена как сумма потенциалов, описывающих ковалентные (растяжение связей, изменение валентных и торсионных углов) и нековалентные (электростатические взаимодействия, дисперсионные силы Ван-дер-Ваальса и другие) взаимодействия. Второе допущение утверждает, что функции потенциальной энергии, разработанные для ограниченного набора молекул, могут быть применены на другие молекулы с аналогичными функциональными группами.

Совокупность функций и набора параметров, которые используются для расчета потенциальной энергии системы в рамках молекулярной механики, называется силовым полем [99]. Конкретное разложение потенциальной энергии на составляющие зависит от силового поля, но общая форма полной энергии может быть записана как:

$$E_{\text{общ}} = E_{\text{св.}} + E_{\text{уг.}} + E_{\text{торс.}} + E_{\text{ВdB}} + E_{\text{Эл.}} + E_{\text{др.}} \quad (2.1.1)$$

где первые три вклада относятся к ковалентным взаимодействиям. Вклады $E_{\text{св.}}$ и $E_{\text{уг.}}$ отвечают за растяжение связей и изменение валентных углов и часто описываются простым гармоническим потенциалом. Слагаемое $E_{\text{торс.}}$ отвечает за деформацию двугранных углов и задается тригонометрической функцией. К нековалентным взаимодействиям относятся вклады Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий ($E_{\text{ВДВ}}$), часто описываемых потенциалом Леннард-Джонса, электростатических взаимодействий ($E_{\text{эл.}}$), определяемых законом Кулона. Кроме того, свой вклад в энергию системы могут давать и другие специфические взаимодействия ($E_{\text{др.}}$), куда могут входить энергии водородных связей или перекрёстные слагаемые, описывающие взаимное влияние вышеперечисленных взаимодействий друг на друга. Тогда более развернутое выражение для полной энергии системы может быть представлено:

$$E_{\text{общ.}} = \sum_{\text{св.}} k_r (d - d_e)^2 + \sum_{\text{уг.}} k_\varphi (\varphi - \varphi_e)^2 + \sum_{\text{торс.}} k_\theta (1 + \cos(n_i \theta - \theta_e)) + \\ + \sum_{\text{ВДВ}} \varepsilon_{ij} \left(\left(\frac{R_{min_{ij}}}{R_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{min_{ij}}}{R_{ij}} \right)^6 \right) + \sum_{\text{эл.}} \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \frac{q_i q_j}{R_{ij}} + E_{\text{др.}} \quad (2.1.2)$$

где d, φ, θ – текущие значения длины связи, величины валентного и двугранного углов соответственно, k_r, k_φ, k_θ – силовые константы соответствующих потенциалов, d_e, φ_e – равновесные значения длины связи и валентного угла, n_i, θ_e – кратность и фаза торсионного угла. В потенциале Леннард-Джонса: R_{ij} – расстояние между несвязанными атомами i и j , ε_{ij} – параметр, отвечающий за глубину потенциальной ямы, $R_{min_{ij}}$ – расстояние между атомами i и j при минимальной потенциальной энергии. В законе Кулона: q_i, q_j – точечные заряды на атомах i и j , ε_0 – диэлектрическая постоянная.

На данный момент разработано множество силовых полей. Наиболее популярные силовые поля для описания биомолекулярных систем – CHARMM [100], AMBER [101], GROMOS [102] и OPLS [103].

2.2. Методы квантовой химии

Для изучения химических реакций на молекулярном уровне, включая механизм реакции и энергетические барьеры, необходимо использовать подходы квантовой химии,

в формализме которой молекулярная система представляет собой устойчивую систему ядер и электронов. В методах квантовой химии энергия системы определяется из приближенного решения стационарного уравнения Шредингера [104]:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (2.2.1)$$

где \hat{H} – гамильтониан системы представляется как сумма кинетической энергии ядер и электронов, потенциальной энергии межъядерных взаимодействий, потенциальной энергии взаимодействия ядер и электронов и потенциальной энергии электрон-электронного взаимодействия.

Современные методы решения уравнения Шредингера можно разделить на три большие группы: неэмпирические или *ab initio* методы, методы теории функционала электронной плотности (ТФП) и полуэмпирические методы.

Неэмпирические методы основаны на решении уравнения Шредингера путем последовательного применения приближений. К неэмпирическим методам относятся: метод Хартри-Фока (HF или XФ), методы теории возмущений Мёллера-Плессета (MP2, MP4 и др.), методы связанных кластеров (CC и их варианты CCSD, CCSD(T)) и методы конфигурационного взаимодействия (CI, CIS, CISD, MCSCF, CASSCF). Хотя точность метода Хартри-Фока не удовлетворяет современным требованиям к точности расчетов, однако является основополагающим для других методов квантовой химии.

В отличие от методов *ab initio*, которые напрямую решают приближенные варианты уравнения Шрёдингера, полуэмпирические подходы используют упрощённые модели и эмпирические параметры, частично заменяя расчёты экспериментальными данными или заранее рассчитанными более точными методами значениями, что заметно ускоряет расчет. Однако полуэмпирические методы имеют ряд существенных недостатков: меньшая точность по сравнению с *ab initio* методами, необходимость тщательного подбора параметров для каждой системы, ограниченная применимость для некоторых типов химических реакций и свойств. Наиболее известными полуэмпирическими методами являются: PM3 и его разновидности (PM6, PM7), AM1, ZINDO и его разновидность (ZINDO/S).

Другим важным методом квантовой химии является теория функционала электронной плотности (ТФП), в которой электронная энергия выражается не через

волновую функцию, а как функция электронной плотности по теореме Хоэнберга-Кона [105]:

$$E_e[\rho(\mathbf{r})] = V_{en}[\rho(\mathbf{r})] + J[\rho(\mathbf{r})] + T[\rho(\mathbf{r})] + Q[\rho(\mathbf{r})] \quad (2.2.2)$$

где $V_{en}[\rho(\mathbf{r})]$ – потенциальная энергия, описывающая притяжение электронов к ядрам, $J[\rho(\mathbf{r})]$ – классическая энергия электрон-электронного отталкивания, $T[\rho(\mathbf{r})]$ – кинетическая энергия электронов и $Q[\rho(\mathbf{r})]$ – неклассическая энергия взаимодействия электронов. Вид первых двух слагаемых известен и определяется следующим образом:

$$V_{en}[\rho(\mathbf{r})] = - \sum_{A=1}^M \int \frac{z_A}{|\mathbf{r} - \mathbf{R}_A|} \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (2.2.3)$$

$$J[\rho(\mathbf{r})] = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \quad (2.2.4)$$

Однако вид слагаемых $T[\rho(\mathbf{r})]$ и $Q[\rho(\mathbf{r})]$ неизвестен.

На практике используется орбитальный вариант ТФП (формализм Кона-Шэма) [106], в основе которого лежит идея о том, что сложные системы можно описать, рассматривая движение каждого электрона независимо от других, с учётом эффективного потенциала, созданного остальными электронами и ядрами. В данном варианте ТФП используется кинетическая энергия невзаимодействующих электронов, которая записывается в виде:

$$T_{K-W} = - \frac{1}{2} \sum_i^n \int \phi_i^*(\mathbf{r}) \nabla^2 \phi_i(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (2.2.5)$$

Поскольку кинетическая энергия невзаимодействующих электронов не равна $T[\rho(\mathbf{r})]$, разница между этими величинами в сумме с неклассической энергией взаимодействия электронов определяет обменно-корреляционную энергию:

$$E_{xc}[\rho(\mathbf{r})] = T[\rho(\mathbf{r})] - T_{K-W} + Q[\rho(\mathbf{r})] \quad (2.2.6)$$

Таким образом, в теории функционала электронной плотности Кона-Шэма единственным неизвестным параметром остается обменно-корреляционный функционал, который, как правило, представляется в виде суммы обменного функционала ($E_x[\rho(\mathbf{r})]$), описывающего взаимодействие электронов с одинаковыми спинами, и корреляционного функционала ($E_c[\rho(\mathbf{r})]$), характеризующего мгновенные отталкивающие взаимодействия электрона с остальными электронами.

За последние 40 лет было разработано множество полуэмпирических и неэмпирических функционалов электронной плотности, каждый из которых обладает определенными достоинствами и недостатками и часто ориентирован на применение к различным системам [107]. Можно выделить следующие группы функционалов: приближение локальной плотности (Local Density Approximation, LDA), приближение локальной спиновой плотности (Local Spin Density Approximation, LSDA), обобщенно-градиентное разложение плотности (Generalized gradient approximation, GGA), мета-GGA и гибридные функционалы.

Установлено, что при использовании функционалов GGA для расчёта механизмов ферментативных реакций получаются недостоверные результаты с завышенными значениями энергетических барьеров. Для расчётов ферментативных реакций более эффективными оказываются двойные гибридные функционалы [108]. Однако их применение ограничено размерами активного центра фермента. Наиболее часто применяют гибридные функционалы (PBE0 и B3LYP). В сочетании с дисперсионной поправкой и с базисным набором, включающим поляризационные функции на всех атомах (6-31G** или cc-pVDZ и другие базисы аналогичного размера), такие функционалы показывают результаты, сопоставимые с экспериментальными данными [107,109].

В рамках данной работы преимущественно использовался гибридный функционал—PBE0 [110], содержащий 25% точной обменной энергии Хартри-Фока. Данный функционал в настоящее время популярен и обеспечивает хорошую точность вычислений для расчетов биомакросистем:

$$E_{xc}^{PBE0} = 0,25E_x^{\chi\Phi} + 0,75E_x^{PBE} + E_c^{mPW91} \quad (2.2.7)$$

2.3. Комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики

Для моделирования ферментативных реакций, сопровождающихся разрывом и образованием химических связей, необходимо применять методы квантовой химии. Однако применение этих методов ограничено вычислительными ресурсами. Даже самые современные и мощные вычислительные системы не способны проводить расчеты для

больших молекулярных систем с использованием методов квантовой химии. В связи с этим, в расчетах механизмов ферментативных реакций нашел широкое применение и развитие комбинированный подход квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ) [111].

В рамках данного методологического подхода молекулярная система подвергается разделению на две взаимосвязанные подсистемы [112]. Первая из них, квантово-механическая (КМ) подсистема, охватывает активный центр фермента, где непосредственно протекает химическая реакция, и других участников реакции. Вторая подсистема, молекулярно-механическая (ММ), включает в себя оставшуюся часть белковой макромолекулы и сольватную оболочку, обеспечивающие структурную и функциональную поддержку ферментативного процесса.

Вопрос выбора квантово-механической подсистемы (КМ-подсистемы), определения её оптимального состава и размера в настоящее время представляет собой нетривиальную задачу. Очевидно, что использование квантово-механических подсистем большего размера обеспечивает более точное описание взаимодействий в активном центре. Однако это также может привести к значительному увеличению вычислительных затрат. В связи с этим, типичные размеры квантовой подсистемы составляют от 100 до 200 атомов. Общие рекомендации по выбору состава квантовой подсистемы включают следующие аспекты: необходимо учитывать фрагменты, непосредственно участвующие в процессах разрыва и образования химических связей, близлежащие заряженные остатки, а также фрагменты, формирующие ключевые водородные связи в активном центре.

В расчётах биологических систем с использованием методов КМ/ММ граница между квантовой и молекулярно-механической частями проходит через ковалентную связь. В результате на атоме в квантовой части образуется свободная валентность. Для компенсации этой валентности используются различные подходы, например, добавление связующих атомов (*link*-атомов) или применение метода локализованных орбиталей. Наибольшее распространение получили *link*-атомы, которые добавляются в квантовую часть на линию разрыва ковалентной связи и явно участвуют в расчётах. В качестве таких атомов обычно используются атомы водорода.

Полная энергия системы в методе КМ/ММ может определяться с использованием:

- субтрактивного подхода (схема вычитания):

$$E_{\text{КМ/ММ}} = E_{\text{ММ}}(\text{ММ} + \text{КМ}) + E_{\text{КМ}}(\text{КМ}) - E_{\text{ММ}}(\text{КМ}) \quad (2.3.1)$$

где $E_{\text{ММ}}(\text{ММ} + \text{КМ})$ и $E_{\text{ММ}}(\text{КМ})$ – энергии всей системы и КМ-подсистемы соответственно, рассчитанные методами молекулярной механики, $E_{\text{КМ}}(\text{КМ})$ – энергия КМ-подсистемы, рассчитанная методами квантовой механики.

- аддитивного подхода (схема сложения):

$$E_{\text{КМ/ММ}} = E_{\text{ММ}}(\text{ММ}) + E_{\text{КМ}}(\text{КМ}) + E_{\text{КМ-ММ}}(\text{КМ}, \text{ММ}) \quad (2.3.2)$$

где $E_{\text{ММ}}(\text{ММ})$ – энергия ММ-подсистемы, рассчитанная методами молекулярной механики, а $E_{\text{КМ-ММ}}(\text{КМ}, \text{ММ})$ – энергия взаимодействия КМ- и ММ- подсистем.

В настоящее время в молекулярном моделировании с использованием методов КМ/ММ наиболее часто используется схема сложения.

Энергия взаимодействия между квантово-механической и молекулярно-механической подсистемами может быть определена на различных уровнях сложности, которые различаются степенью взаимной поляризации. Эти уровни классифицируются как механическое, электростатическое и поляризационное внедрения. Схема механического внедрения не учитывает электростатическое поле, создаваемое белковой средой и растворителем. Однако это поле может существенно влиять на протекание химической реакции. В связи с этим для расчетов в белковых системах чаще применяется схема электростатического внедрения. В этой схеме задается определенное расстояние от КМ-подсистемы, в пределах которого учитываются заряды ММ-подсистемы. Выбранные точечные заряды молекулярно-механической подсистемы включаются в квантово-механический гамильтониан в виде одноэлектронных членов. Наиболее полное понимание электростатического взаимодействия может быть достигнуто с использованием метода поляризационного внедрения. В рамках этого подхода, КМ- и ММ-подсистемы способны взаимно поляризоваться друг друга. Однако на данный момент не существует унифицированных силовых полей для моделирования данного взаимодействия, а итерационные самосогласованные расчеты значительно усложняют вычислительные процессы.

2.4. Поверхность потенциальной энергии

Как упоминалось в разделе 2.2, в квантово-химических методах применяется приближение Борна-Оппенгеймера. Оно заключается в том, что движение ядер происходит значительно медленнее, чем движение электронов. Таким образом, задача сводится к изучению движения электронов в поле фиксированных ядер. Решение электронного уравнения для различных координат ядер дает поверхность потенциальной энергии (ППЭ) [113]. Каждому значению координат ядер отвечает определенная потенциальная энергия и некоторая геометрическая конфигурация молекулы.

В процессе исследования поверхности потенциальной энергии могут быть обнаружены стационарные точки, в которых производная функции по координатам равна нулю. Тип стационарной точки (максимум, минимум или седловая точка) определяется с помощью гессиана — матрицы вторых производных. С физической точки зрения гессиан представляет собой матрицу силовых постоянных молекулы, которая в гармоническом приближении определяет энергию и частоты нормальных колебаний ядер. В точке минимума на поверхности потенциальной энергии матрица вторых производных имеет только положительные собственные значения, что означает, что все частоты колебаний являются действительными числами. В седловой точке среди положительных значений появляются одно или несколько отрицательных собственных значений, что приводит к появлению мнимой частоты колебания. Количество мнимых частот определяет порядок седловой точки. Седловые точки первого порядка соответствуют энергетическим барьерам ППЭ.

Поиск точек локальных минимумов на поверхности потенциальной энергии называется оптимизацией геометрии. Данный процесс представляет собой итеративную процедуру, которая может быть реализована с применением различных алгоритмов, отличающихся порядком использующихся производных: методы нулевого порядка, методы первого порядка (или градиентные методы), методы второго порядка.

Алгоритмы, основанные на производных второго порядка, известные как ньютоновские методы, применяют не только градиенты, но и гессиан для оптимизации. Тем не менее, использование таких методов требует значительных вычислительных

ресурсов. В связи с этим более распространены квазиньютоновские методы, которые используют аппроксимации и осуществляют расчет обратного гессиана исключительно для успешных итераций, что позволяет снизить вычислительную нагрузку.

В настоящий момент в квантово-химических программах наиболее часто используется алгоритм Брайдена-Флетчера-Гольдфарба-Шанно (BFGS) [114] или его разновидности (L-BFGS, L-BFGS-B).

2.5. Дескрипторы электронной плотности и анализ порядка связи

Одной из задач настоящего исследования являлось определение критерия, позволяющего классифицировать механизмы разрыва связи Р–О в активных центрах биомолекул. Для этого проводился детальный анализ фермент-субстратных комплексов не только с использованием геометрических характеристик, но дескрипторов электронной плотности в активных центрах.

Дескрипторы электронной плотности рассчитываются их электронной плотности молекулярной системы и могут характеризовать как определенные точки в пространстве, например, градиент электронной плотности, так и кумулятивное свойство, например заряд на атоме.

Критические точки связи (КТС) в квантовых системах были выявлены с применением теории атомов в молекулах (QTAIM) [115], которая основывается на анализе градиентного поля электронной плотности (ЭП). Эта теория позволяет идентифицировать расположение атомных бассейнов в молекулярной структуре. В рамках QTAIM выделяются критические точки на поверхности электронной плотности, где значение градиента ЭП равно нулю.

Критические точки связи могут классифицироваться по различным типам в зависимости от значений гессиана ЭП. Их обозначение имеет вид (A, B), где A представляет собой размерность пространства (как правило, 3), а B — сумму знаков градиентов ЭП по координатным осям пространства. В результате существуют четыре невырожденные критические точки электронной плотности:

- (3, -3) — соответствуют локальным максимумам ЭП и совпадают с положениями ядер атомов.
- (3, -1) — представляют собой седловые точки. В этой точке два собственных значения гессиана ЭП принимают отрицательные значения.
- (3, 1) — являются циклическими критическими точками, в которых собственные векторы, соответствующие двум положительным собственным значениям гессиана, формируют поверхность с минимальным значением ЭП. Этот тип критических точек характерен для циклических молекул.
- (3, +3) — соответствуют локальным минимумам ЭП и встречаются в клеточных молекулах.

Критическая точка типа (3, -1) называется критической точкой связи.

В данной работе использовались следующие дескрипторы электронной плотности, которые успешно ранее использовались для выявления различий в реакционной способности различных соединений в ферментативных реакциях [116–119]:

- Электронная плотность:

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_i \eta_i |\varphi_i(\mathbf{r})|^2 \quad (2.5.1)$$

где η_i – степень заполнения i -й орбитали, φ – орбитальная волновая функция.

- Лапласиан электронной плотности:

$$\nabla^2 \rho(\mathbf{r}) = \frac{\partial^2 \rho(\mathbf{r})}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \rho(\mathbf{r})}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \rho(\mathbf{r})}{\partial z^2} \quad (2.5.2)$$

Положительное и отрицательное значение этой функции соответствует локальной деконцентрации и концентрации электронной плотности соответственно.

- Эллиптичность электронной плотности:

$$\varepsilon(\mathbf{r}) = \frac{\lambda_1(\mathbf{r})}{\lambda_2(\mathbf{r})} - 1 \quad (2.5.3)$$

где λ_1 и λ_2 – наименьшее и второе наименьшее собственные значения гессиана ρ . В критической точке связи λ_1 и λ_2 оба отрицательны и отображают кривизну электронной плотности в двух ортогональных направлениях, перпендикулярных связи. Значение эллиптичности электронной плотности в КТС является индикатором асимметричного

распределения электронной плотности вокруг связи: чем больше отклонение от симметричного распределения, тем больше значение.

- Плотность энергии электронов:

$$H = E(\mathbf{r}) = -K(\mathbf{r}) = \frac{1}{2} \sum_i \eta_i \varphi_i^*(\mathbf{r}) \nabla^2 \varphi_i(\mathbf{r}) \quad (2.5.4)$$

где $K(\mathbf{r})$ – плотность кинетической энергии Гамильтона.

- Функция локализации электронов (Electron localization function, ELF) [120,121]:

$$ELF(\mathbf{r}) = \frac{1}{1 + [D(\mathbf{r})/D_0(\mathbf{r})]^2} \quad (2.5.5)$$

где для систем с закрытой оболочкой:

$$D(\mathbf{r}) = \frac{1}{2} \sum_i \eta_i |\nabla \varphi_i(\mathbf{r})|^2 - \frac{1}{8} \frac{|\nabla \rho(\mathbf{r})|^2}{\rho(\mathbf{r})} \quad (2.5.6)$$

$$D_0(\mathbf{r}) = \frac{3}{10} (3\pi^2)^{2/3} \rho(\mathbf{r})^{5/3} \quad (2.5.7)$$

Функция локализации электронов принимает значения от 0 до 1 и определяет пространственную локализацию электронов. Чем больше значение ELF, тем сильнее локализованы электроны, что указывает на наличие ковалентной связи, неподелённой пары или внутренних оболочек атома.

- Локализованный орбитальный локатор (Localized orbital locator, LOL) [122]:

$$LOL(\mathbf{r}) = \frac{\tau(\mathbf{r})}{1 + \tau(\mathbf{r})} \quad (2.5.8)$$

$$\text{где } \tau(\mathbf{r}) = \frac{D_0(\mathbf{r})}{1/2 \sum_i \eta_i |\nabla \varphi_i(\mathbf{r})|^2} \quad (2.5.9)$$

Локализованный орбитальный локатор имеет схожее выражение с ELF и одинаковый диапазон значений от 0 до 1. Качественно LOL и ELF дают сопоставимые результаты, хотя LOL может передавать более четкую и ясную картину [123].

Кроме того использовались следующие методы анализа порядка связи:

- Порядок связи Лапласа (Laplacian bond order, LBO) [124]:

$$L_{A,B} = -10 \times \int_{V^2 \rho < 0} w_A(\mathbf{r}) w_B(\mathbf{r}) \nabla^2 \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (2.5.10)$$

где w – плавно меняющаяся весовая функция, представляющая собой нечеткое атомное пространство. Таким образом, чем больше величина интеграла по области, где $\nabla^2 \rho < 0$, тем более концентрированной будет электронная плотность в области связи и, следовательно, тем прочнее будет ковалентная связь.

- Индекс внутренней прочности связи (Intrinsic bond strength index, IBSI) [125]:

$$IBSI = \frac{1/d^2 \int \delta g^{pair} dr}{1/a_{H_2}^2 \int \delta g^{H_2} dr} \quad (2.5.11)$$

где d – расстояние между двумя атомами, δg – индекс атомной пары, а знаменатель содержит данные для системы отсчета. Индекс внутренней прочности связи был предложен как способ количественной оценки прочности химических связей, а также может использоваться для сравнения прочности более слабых взаимодействий.

2.6. Метод молекулярной динамики

Для изучения конформационного пространства и эволюции системы во времени используется молекулярная динамика (МД) [126]. Моделирование методом молекулярной динамики заключается в численном пошаговом решении классических уравнений движения Ньютона:

$$m_i \ddot{\mathbf{r}}_i = F_i(\mathbf{r}), \text{ где } F_i(\mathbf{r}) = -\frac{\partial U}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (2.6.1)$$

На основе начальных координат и скоростей вычисляются силы, представляющие собой градиент потенциальной энергии, и ускорения. Расчет сил в зависимости от конкретной задачи можно проводить с помощью методов молекулярной механики, квантовой химии или комбинированного подхода КМ/ММ (КМ/ММ-МД). В качестве исходных координат молекул обычно используются экспериментальные данные рентгеноструктурного анализа (РСА) и ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Начальные скорости определяются с применением теоремы о равнораспределении кинетической энергии по степеням свободы, которая выражается формулой:

$$\langle E_{\text{кин}} \rangle = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N} m_i v_i^2 = \frac{1}{2} (3N) k_B T \quad (2.6.2)$$

На каждом временном шаге молекулярной динамики, соответствующем моменту времени t , новые координаты и скорости рассчитываются на основе производной потенциальной энергии по координатам. Затем атомы перемещаются в новые положения в соответствии с этими значениями. Результатом выполнения молекулярной динамики является молекулярно-динамическая траектория, представляющая собой зависимость координат системы от времени.

Алгоритм Верле [127] является наиболее широко применяемым методом интегрирования дифференциальных уравнений, обеспечивающим оптимальное соотношение между точностью и вычислительной эффективностью. В процессе выполнения алгоритма Верле осуществляется суммирование разложений Тейлора для $\mathbf{r}(t + \Delta t)$ и $\mathbf{r}(t - \Delta t)$ относительно времени t , которое имеет следующий вид:

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t) + \frac{1}{m}\mathbf{F}_i(t)(\Delta t)^2 \quad (2.6.3)$$

Скорость, которая в явном виде не указана в алгоритме Верле, может быть получена следующим образом:

$$\mathbf{v}_i(t) = \frac{\mathbf{r}_i(t + \Delta t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t)}{2\Delta t} \quad (2.6.4)$$

В формулах (2.6.3) и (2.6.4) Δt – шаг интегрирования. Определение шага интегрирования — это ключевой момент в процессе моделирования, поскольку слишком маленький шаг не позволит охватить большое конформационное пространство, а слишком большой шаг может вызвать проблемы с устойчивостью модели. Выбор временного шага интегрирования определяется целью исследования. Оптимальным считается шаг, который на порядок меньше периода самого быстрого движения в системе. Временные характеристики некоторых процессов включают: колебания связи – 1 фемтосекунда (фс), конформационные переходы – от 1 пикосекунды (пс), ферментативный катализ – микросекунды (мкс) – миллисекунды (мс), связывание с лигандом – мкс – мс, сворачивание белка – мс – секунды (с). В связи с этим, для моделирования химических реакций применяется временной шаг интегрирования в 1 фс.

Для того чтобы рассчитать макроскопические характеристики системы, необходимо использовать совокупность конформаций, которая включает в себя множество различных состояний системы. В зависимости от того, насколько система изолирована от

окружающей среды, можно выделить разные ансамбли: от полностью изолированных систем (микроканонический ансамбль, NVE) до полностью открытых (большой канонический ансамбль, μVT). Поскольку эксперименты часто проводятся при постоянной температуре и/или постоянном давлении, рекомендуется молекулярно-динамическое моделирование проводить в каноническом ансамбле (NVT ансамбль), где допускается изменение полной энергии при постоянной температуре, или в изотермически-изобарическом ансамбле (NPT ансамбль), где помимо температуры поддерживается постоянство давления.

Для обеспечения стабильных значений температуры и давления применяются вычислительные специальные схемы, так называемые термостаты и баростаты. К числу наиболее распространенных термостатов и баростатов относятся термостат/баростат Нозе-Гувера, Берендсена, Ланжевена и Андерсона. В рамках данного научного исследования использовались термостат Ланжевена и баростат Нозе-Гувера.

Термостат Ланжевена основан на использовании уравнений движения броуновской динамики. В рамках данного подхода в уравнение движения Ньютона вводятся дополнительные компоненты: сила трения, которая способствует отводу кинетической энергии из системы, и случайная сила, обеспечивающая передачу кинетической энергии в систему. Это позволяет поддерживать средний уровень кинетической энергии частиц на заданном значении, соответствующем требуемой температуре:

$$m_i \ddot{\mathbf{r}}_i = F_i(\mathbf{r}) - m_i \Gamma_i \dot{\mathbf{r}}_i + \xi_i(t) \quad (2.6.5)$$

где Γ_i – коэффициент трения, $\xi_i(t)$ – случайная сила, которая обладает гауссовым распределением.

Баростат Нозе-Гувера представляет собой комбинацию метода Нозе-Гувера [128] с постоянным давлением и с контролем колебаний поршня, реализованным с помощью динамики Ланжевена [129].

Для проведения молекулярно-динамического моделирования необходимо выбрать соответствующие граничные условия [126]. В открытой системе частицы могут перемещаться без ограничений. В случае замкнутых границ значительная часть частиц будет сосредоточена вблизи поверхностей, что может привести к значительному влиянию поверхностных эффектов. Наиболее часто применяемым методом являются

периодические граничные условия, при которых расчетная область воспроизводится для создания бесконечной решетки, заполняющей все пространство. В рамках этого подхода молекулы в каждом из воспроизведенных блоков могут двигаться аналогично исходным молекулам, а при выходе молекулы из центрального поля её зеркальное изображение появляется в противоположном поле.

2.7. Метод зонтичной выборки

При проведении молекулярно-динамического моделирования стабильные и метастабильные состояния обладают высокой заселенностью, в то время как высокоэнергетические переходные области характеризуются крайне низкой заселенностью. Кроме того, для полного исследования конфигурационного пространства требуются значительные временные и вычислительные ресурсы. Для решения данных проблем в рамках классической молекулярно-динамической методологии разработано множество подходов и методов ускоренного сэмплирования [130], позволяющих получить профиль свободной энергии (под термином «свободная энергия» подразумевается энергия Гиббса или энергия Гельмгольца) вдоль коллективных переменных или координаты реакции. Одним из таких методов является метод зонтичной выборки (umbrella sampling, US).

В методе зонтичной выборки [131] весь исследуемый интервал значений координаты реакции (ξ_a, ξ_b) разбивает на N «окон» с центрами ξ_0 в каждом. В каждом окне проводится молекулярно-динамический расчет с наложением смещающего гармонического потенциала:

$$V_i(\xi) = \frac{k_i}{2}(\xi - \xi_{0,i})^2 \quad (2.7.1)$$

где k_i – константа жёсткости, $\xi_{0,i}$ – центр i -ого окна. Наложенные потенциалы уменьшают барьеры на поверхности свободной энергии, и система с большей вероятностью может их преодолеть.

Для анализа результатов сэмплирования рассматриваются конфигурационные интегралы для системы без приложенного потенциала:

$$P(\xi) = \frac{\int \delta(\xi(r) - \xi) e^{-\beta U(r)} dr}{\int e^{-\beta U(r)} dr} \quad (2.7.2)$$

и для системы с приложенным потенциалом:

$$P_b(\xi) = \frac{\int \delta(\xi(r) - \xi) e^{-\beta[U(r) + V(\xi(r))]} dr}{\int e^{-\beta[U(r) + V(\xi(r))]} dr} \quad (2.7.3)$$

где \mathbf{r} – координаты атомов, $U(\mathbf{r})$ – потенциальная энергия, $V(\xi(\mathbf{r}))$ – смещающий гармонический потенциал, $\xi(\mathbf{r})$ – координата реакции.

Поскольку приложенный потенциал зависит только от координаты реакции, а интегрирование выполняет по всем координатам реакции из интегралов (2.7.2) и (2.7.3) можно получить следующее выражение:

$$\begin{aligned} P(\xi) &= \frac{\int \delta(\xi(r) - \xi) e^{-\beta U(r)} e^{-\beta V(\xi(r))} e^{\beta V(\xi(r))} dr}{\int e^{-\beta U(r)} dr} \frac{\int e^{-\beta[U(r) + V(\xi(r))]} dr}{\int e^{-\beta[U(r) + V(\xi(r))]} dr} = \\ &= P_b(\xi) e^{\beta V(\xi(r))} \frac{\int e^{-\beta[U(r) + V(\xi(r))]} dr}{\int e^{-\beta U(r)} dr} = P_b(\xi) e^{\beta V(\xi(r))} \langle e^{-\beta V(\xi(r))} \rangle \end{aligned} \quad (2.7.4)$$

Тогда свободная энергия вдоль координаты реакции ξ для каждого окна определяются как:

$$F_i(\xi) = -kT \ln P_{b,i}(\xi) - V_i(\xi) + f_i \quad (2.7.5)$$

Для оценки f_i и объединения окон используются дополнительные методы, такие как зонтичное интегрирование (umbrella integration, UI) и метод взвешенных гистограмм (Weighted Histogram Analysis Method, WHAM).

В методе WHAM [132] распределение координаты вычисляется как взвешенная сумма распределений отдельных окон ($P_i(\xi)$), где веса (p_i) подбираются для минимизации статистической погрешности:

$$P(\xi) = \sum_i p_i(\xi) P_i(\xi) \quad (2.7.6)$$

Веса $p_i(\xi)$, с учетом их нормализации, выражаются следующим образом:

$$p_i(\xi) = \frac{N_i e^{-\beta V_i(\xi) + \beta f_i}}{\sum_j N_j e^{-\beta V_j(\xi) + \beta f_j}} \quad (2.7.7.)$$

где N_i – число кадров в i -том окне. Таким образом, используя выражения (2.7.5), (2.7.6) и (2.7.7), итерационно находятся константы f_i и распределение $P(\xi)$ до тех пор пока не будет достигнута сходимость.

Метод взвешенных гистограмм требует перекрывания распределений между окнами и, кроме того, чувствителен к ширине ячеек, на которые разбивается координата реакции.

В то время как в методе WHAM усредняются распределения, в методе зонтичного интегрирования [133] усредняется свободная энергия, для этого рассматривается ее производная:

$$\frac{dF}{d\xi} = -kT \frac{d\ln P_i(\xi)}{d\xi} - k_i(\xi - \xi_{0,i}) \quad (2.7.8)$$

При разложении $F(\xi)$ в степенной ряд до квадратичного члена распределения в окнах становятся нормальными и их производные можно выразить явно:

$$\frac{dF_i}{d\xi} = kT \frac{\xi - \bar{\xi}}{\sigma_i^2} - k_i(\xi - \xi_{0,i}) \quad (2.7.9)$$

где $\bar{\xi}$ и σ_i^2 – среднее и дисперсия распределения координаты реакции в i -том окне. Для объединения окон весь диапазон координаты реакции разбивается на ячейки, в пределах которых производная свободной энергии принимается постоянной и суммируется по всем окнам:

$$\left. \frac{dF}{d\xi} \right|_{\xi_{0,j}} = \sum_i p_i(\xi) \left. \frac{dF_i}{d\xi} \right|_{\xi_{0,j}} \quad (2.7.10)$$

где $\xi_{0,j}$ – координата центра j -ой ячейки, $p_i(\xi) = N_i P_i(\xi) / \sum_j N_j P_j(\xi)$ – вес окна. Таким образом, из значений производных в каждом окне численным интегрированием рассчитывается свободная энергия.

В отличие от метода взвешенных гистограмм, который выполняется итеративно, метод зонтичного интегрирования является аналитическим методом восстановления профиля свободной энергии. Это позволяет избежать проблем со сходимостью и временем расчета, однако UI имеет явный недостаток, связанный с предположением о нормальном распределении координаты реакции в каждом окне.

Методы ускоренного сэмплирования, в том числе метод зонтичной выборки, обычно рассматривают в NVT -ансамбле и рассчитывают свободную энергию Гельмгольца.

Однако, при молекулярно-динамическом моделировании в *NPT*-ансамбле объем рассматриваемой системы меняется незначительно, что позволяет с хорошей точностью считать, что $G(\xi) \approx F(\xi)$ и рассчитывать энергию Гиббса.

Глава 3. Ферментативный разрыв Р-О связи: критерии диссоциативного и ассоциативного механизмов

Результаты, представленные в данной главе, изложены в работе [15,134]¹.

3.1. Классификация модельных систем

Задачей данного исследования являлась разработка критериев определения типа механизма ферментативных реакций, сопровождающихся разрывом Р-О связи, по структурно-динамическим характеристикам фермент-субстратного комплекса и особенностям электронного строения его активного центра. Для этого было рассмотрено четырнадцать систем с известными механизмами реакций. К выбранным реакциям относятся гидролиз гуанозинтрифосфата (ГТФ) до гуанозиндифосфата (ГДФ) и фосфата в активных центрах Ras-GAP [24], Ran-GAP [135] и Arl3-RP2 [136]; гидролиз циклического димерного гуанозинмонофосфата (ц-ди-ГМФ) в активном центре каталитического домена EAL белка BlrP1 [137]; превращение аденоzinтрифосфата (АТФ) в циклический аденоzinмонофосfat (цАМФ) в активном центре аденилаткиназы млекопитающих (mAC) [138] и фотоактивированной бактериальной аденилаткиназы (bPAC) [139]; гидролиз аденоzinтрифосфата до аденоzinдифосфата (АДФ) в активных центрах F₁-АТФазы [140], мевалонаткиназы (MVK) [141], мевалонатдифосфатдекарбоксилазы (MDD) [142] и миозина [143]; реакция гидролиза фосфата в активном центре нуклеотидпирофосфотазы/фосфодиэстеразы (NPP) [35]; гидролиз фосфодиэфирных связей ДНК в рибонуклеазе Н человека (РНКаза Н(h)) [144] и бактериальной рибонуклеазе Н (РНКаза Н(b) с гидроксид-анионом или молекулой воды

¹ При описании данной главы диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2-2.5 Положение о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

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 Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Мулашкиной Т.И. составил 65%
 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.Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Мулашкиной Т.И. составил 85%

в качестве нуклеофила) [145]. Механизмы этих реакций были классифицированы по типам на основе известных данных и рассчитанных энергетических профилей в соответствующих исследованиях (Таблица 3.1.1). Кроме того, были выбраны системы с неизвестными типами механизмов (реакция фосфорилирования в аденилаткиназах ECAK, MtAK, APAK) [146–148] для валидации разработанных критериев.

Таблица 3.1.1. Классификация модельных систем по механизму разрыва Р-О связи. Указаны ссылки на исследования, по которым проведена классификация

	Диссоциативный механизм	Ассоциативный механизм
Ступенчатый	Arl3- RP2 [136]	EAL [137]
	Ran-GAP [135]	РНКаза H(h) [144]
	Ras-GAP [24]	
	F ₁ -ATPase [140]	
Согласованный	NPP [35]	mAC [138]
	MVK [141]	РНКаза H(b) + OH ⁻ [145]
	Миозин [143]	РНКаза H(b) + H ₂ O [145]
	MDD [142]	bPAC [139]

3.2. Подготовка систем и протоколы расчетов

В качестве начальных координат фермент-субстратных комплексов были взяты данные из кристаллографических данных структур PDB ID: 1WQ1 [149], 1K5D [150], 3BH7 [151], 3GG0 [152], 1CJK [153], 5M2A [154], 1E79 [155], 1KVK [156], 4DPW [157], 1VOM [158], 2GSO [159], 2QKK [160], 1ZBL [161], 1AKE [162], 2CDN[146] и 6LN3 [148]. Неразрешенные фрагменты (Gly73-Leu88 в MVK, Ala205-Ser208 в миозине и Asp62-His66 в F₁-АТФазе) были достроены вручную. Атомы водорода были добавлены в структуры с помощью программы Reduce [163] таким образом, чтобы протонированные состояния аминокислотных остатков соответствовали нейтральному pH. Все остатки лизина и аргинина в полученных системах были протонированы, а также протонированным

оказался остаток His20 в MVK, тогда как все остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот были в депротонированном состоянии. Полученные комплексы были сольватированы молекулами воды таким образом, чтобы расстояния от атомов белка до границы ячейки в виде прямоугольного параллелепипеда составляло не менее 10 Å. Подготовка и визуализация полноатомных моделей систем проводилась с использованием программы VMD [164].

Для релаксации сольватной оболочки для всех модельных систем было проведено молекулярно-динамическое моделирование в течении 2 нс с фиксированными атомами белка и субстрата в программном пакете NAMD [165]. Далее была проведена релаксация белкового окружения в течение 5 нс без ограничений. Для дальнейшего исследования были отобраны репрезентативные структуры, полученные за последние 2 нс. Для ферментов, оснований ДНК и фосфорорганических соединений использовалось силовое поле CHARMM [166–168], для молекул воды – модель TIP3P [169].

Следующим этапом являлось проведение МД-моделирования с использованием комбинированного метода квантовой механики/молекулярной механики. Квантовая часть, как правило, включала субстрат, ключевые аминокислотные остатки активного центра, катион металла и его координационную сферу, а также молекулу нуклеофила. На границе разрыва C-C связей добавляли link-атомы (атомы водорода). Подробная информация о КМ подсистемах, их размеров и зарядов представлена в таблице 3.2.1, а их вид показан на рисунке 3.2.1. Для описания квантовых подсистем использовали теорию функционала плотности Конна-Шэма с гибридным функционалом PBE0 [110] и дисперсионной поправкой D3 [170] и базисный набор с поляризационными функциями – 6-31G**.

Профиль энергии Гиббса переноса фосфатной группы от АТФ к АМФ в активном центре MtAK был рассчитан с помощью КМ/ММ-МД моделирования с добавлением смешающего потенциала методом зонтичной выборки [131]. В качестве координаты реакции была выбрана разница между длиной разрываемой связи между атомом фосфора и кислородом уходящей группы ($d(P-O_{LG})$) и расстоянием нуклеофильной атаки ($d(P-O_{Nu})$). Координата реакции была разбита на 11 окон с центрами в значениях -1,6, -1,2, -0,8, -0,4, -0,1, 0,1, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6 и 2,3 Å. Силовая константа приложенных потенциалов составляла 40 ккал/моль/Å², вблизи переходного состояния (для окон с

центрами -0,1 и 0,1) – 80 ккал/моль/Å². Анализ полученных распределений координаты реакции осуществлялся с помощью методов WHAM [132] и UI [133].

Для молекулярно-динамического моделирования использовался программный пакет NAMD [165], а для квантово-химических расчетов использовался интерфейс [171] программного пакета TeraChem [172]. Все МД расчеты выполнялись с шагом интегрирования 1 фс в изобарно-изотермическом ансамбле *NPT* при p = 1 атм и T = 298 K, которые поддерживались за счет баростата Нозе-Гувера [173] и терmostата Ланжевена [127].

Из траекторий молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами были построены распределения расстояний нуклеофильной атаки ($d(P-O_{Nu})$) и длины разрываемой связи ($d(P-O_{LG})$). Структуры фермент-субстратных комплексов (ES), отвечающие максимумам этих распределений, были выбраны в качестве стартовых точек для дальнейшей КМ/ММ оптимизации. Для получения равновесных геометрических конфигураций сольватные оболочки модельных систем были усечены таким образом, чтобы фермент-субстратный комплекс был окружен молекулами воды на расстоянии не менее 4 Å. КМ/ММ оптимизация проводилась с использованием программного пакета Tcl ChemShell [174] с эффективным оптимизатором DL-FIND [175] и квантово-химического пакета TURBOMOLE [176]. Квантовая подсистема и ее описание были выбраны аналогично предыдущему этапу.

В равновесных геометриях фермент-субстратного комплекса были рассчитаны дескрипторы электронной плотности и порядок связи в программном пакете Multiwfn [177].

Таблица 3.2.1. Модельные системы, рассмотренные в данном исследовании, классифицированные по типу механизма. Приведены PDB ID, использованные в качестве данных о начальных координатах, КМ части, а также число атомов и заряд КМ части

Система	PDB ID	КМ часть	Число атомов	Заряд КМ части
Диссоциативный ступенчатый механизм				
Arl3-RP2	3BH7	GTP, Mg ²⁺ , Asp26, Asn27, Lys30, Thr31, Pro47, Thr48, Gln49, Gly69, Gly70, Gln71, Arg118, 3 H ₂ O	115 (103+12)	0
Ran-GAP	1K5D	GTP, Mg ²⁺ , Gly19, Gly20, Lys23, Thr24, Tyr39, Ala41, Thr42, Leu43, Ala67, Gly68, Gln69, 5 H ₂ O	124 (113+11)	-1
Ras-GAP	1WQ1	GTP, Mg ²⁺ , Ala11, Gly12, Gly13, Lys16, Ser17, Pro34, Thr35, Ile36, Ala59, Gly60, Gln61, Arg789, 3 H ₂ O	126 (114+12)	0
F ₁ -АТФаза	1E79	ATФ, Mg ²⁺ , Lys162, Thr163, Glu188, Arg189, Glu192, 7 H ₂ O	80 (73+7)	-2
Диссоциативный согласованный механизм				
NPP	2GSO	Метил-п-нитрофенилfosфат (MNP), 2 Zn ²⁺ , Asp54, Leu89, Thr90, Phe91, Asn111, Asp210, His214, Asp257, His258, His383, 3 H ₂ O	121 (111 + 10)	-1
MVK	1KVK	Мевалонат (MV), АТФ, Mg ²⁺ , Lys13, Ser146, Asp204, Arg241, 7 H ₂ O	94 (89+5)	-2
Миозин	1VOM	АТФ, Mg ²⁺ , Ser181, Thr186, Ser236, Ser237, Arg238, Glu459, 4 H ₂ O	74 (66+8)	-2
MDD	4DPW	MVAPP, АТФ, 2 Mg ²⁺ , Ser107, Ser141, Lys188, Ser192, Asp283	109 (104+5)	-4
Associative stepwise mechanism				
EAL	3GG0	ц-ди-ГМФ, 2 Mg ²⁺ , Glu188, Asn239, Glu272, Asp302, Asp303, Glu359, Gln379, 7 H ₂ O	144 (137+7)	-3
РНКаза H(h)	2QKK	A4, C5, C6, 2 Mg ²⁺ , Asp145, Glu186, Asp210, Asp274, 7 H ₂ O	93 (85+8)	-2
Ассоциативный согласованный механизм				
mAC	1CJK	АТФ, 2 Mg ²⁺ , Asp396, Asp440, Arg484, Glu518, Ser1028, Arg1029, Lys1065, 14 H ₂ O	135 (127+8)	0
РНКаза H(b) OH	1ZBL	A4, C5, C6, 2 Mg ²⁺ , OH ⁻ , Asp71, Glu109, Asp132, Asp192, 8 H ₂ O	98 (90+8)	-3
РНКаза H(b) H ₂ O	1ZBL	A4, C5, C6, 2 Mg ²⁺ , Asp71, Glu109, Asp132, Asp192, 5 H ₂ O	87 (79+8)	-2
bPAC	5M2A	АТФ, 2 Mg ²⁺ , Asp157, Asp201, Glu280, Arg278, 6 H ₂ O	84 (79+5)	-2
Киназы				
APAK	6LN3	АТФ, AMP, Mg ²⁺ , Lys18, Thr19, Arg58, His99, Arg145, Arg147	114 (106+8)	+1
ECAK	1AKE	АТФ, AMP, Mg ²⁺ , Lys13, Arg36, Arg88, Arg123, Arg156	111 (104+7)	+1
MtAK	2CDN	АТФ, AMP, Mg ²⁺ , Lys13, Arg88, Arg127, Arg129, Arg140	105 (98+7)	+1

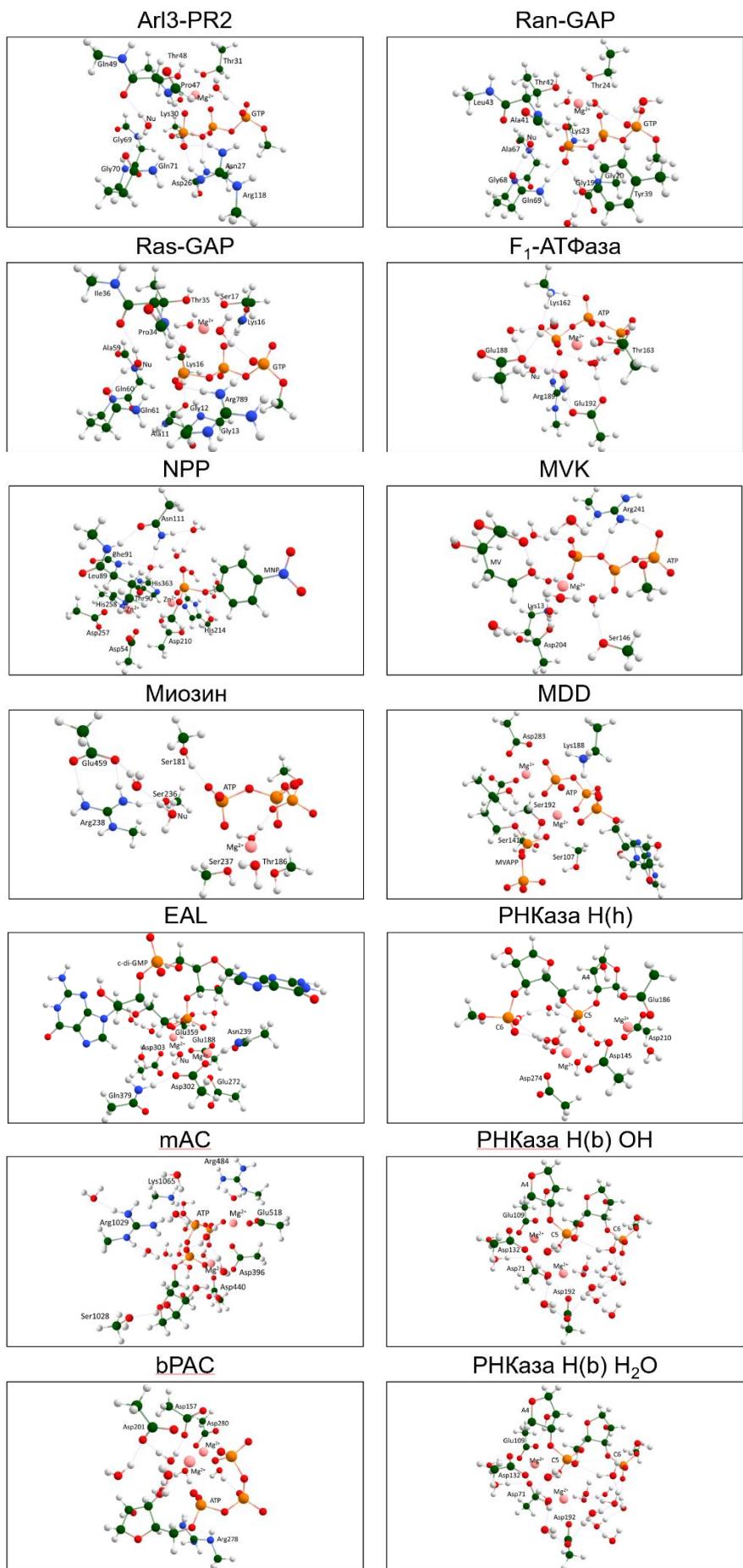


Рисунок 3.2.1. Квантовые части модельных систем

3.3. Сравнение активных центров ферментов

Разрыв Р-О связи происходит в активных центрах металлизависимых ферментов. В исследуемых системах в активных центрах встречаются либо катионы магния (Mg^{2+}) либо цинка (Zn^{2+}). В некоторых ферментах (Ras-GAP, Ran-GAP, Arl3-RP2, миозин, F₁-АТФаза, bPAC, mAC) эти катионы координируют отрицательно заряженные фосфатные группы, в других же ферментах (NPP, MVK, MDD, EAL, РНКаза H(h), РНКаза H(b)) катионы активируют нуклеофил, позиционируя его относительно фосфата. Эти функции катионов металлов не коррелируют с типом механизма реакции.

Аминокислотное окружение активного центра может быть как сильно заряженным (например, четыре отрицательно заряженных остатка в РНКаза H(h), РНКаза H(b) и NPP), так и незаряженным (например, F₁-АТФаза, mAC, MDD и миозин). Из имеющихся данных можно предположить, что ферменты с большим количеством положительно заряженных аминокислотных остатков в активном центре, скорее инициируют реакцию, протекающую по диссоциативному механизму. Однако, явных корреляций между строением активных центров ферментов и типом механизма протекающей в ней реакции установить не удалось.

Для того, чтобы учесть возможное влияние белкового окружения и молекул растворителя на тип протекающей реакции, было проведено сравнение электростатического потенциала (Таблица 3.3.1). Значения электростатического потенциала рассчитывались на основе зарядов из силовых полей CHARMM и TIP3P и усреднялись по всей траектории молекулярной динамики. Определить тип механизма на основе электростатического потенциала или его разности ($\Delta\phi(P-O_{Nu})$ или $\Delta\phi(P-O_{LG})$) оказалось невозможным.

Таблица 3.3.1. Электростатический потенциал (в а.е.), рассчитанный на атоме фосфора $\phi(P)$, атомах кислорода нуклеофила $\phi(O_{Nu})$ и уходящей группы $\phi(O_{LG})$, а также разность потенциалов $\Delta\phi(P-O_{Nu})$ и $\Delta\phi(P-O_{LG})$

Системы	$\phi(P)$	$\phi(O_{Nu})$	$\phi(O_{LG})$	$\Delta\phi(P-O_{Nu})$	$\Delta\phi(P-O_{LG})$
Диссоциативный ступенчатый механизм					
Arl3-RP2	-1,066 ± 0,014	0,049 ± 0,015	0,003 ± 0,015	-1,115 ± 0,016	-1,068 ± 0,012
Ran-GAP	-0,982 ± 0,015	0,146 ± 0,015	0,079 ± 0,016	-1,128 ± 0,015	-1,060 ± 0,012
Ras-GAP	-1,021 ± 0,015	0,099 ± 0,014	0,050 ± 0,015	-1,120 ± 0,015	-1,071 ± 0,013
F ₁ -АТФаза	-1,209 ± 0,015	-0,077 ± 0,017	-0,153 ± 0,014	-1,132 ± 0,021	-1,056 ± 0,012
Диссоциативный согласованный механизм					
NPP	-0,510 ± 0,015	0,402 ± 0,021	0,224 ± 0,020	-0,912 ± 0,019	-0,734 ± 0,015
MVK	-0,762 ± 0,021	0,308 ± 0,023	0,241 ± 0,020	-1,071 ± 0,023	-1,003 ± 0,016
Миозин	-0,935 ± 0,013	0,182 ± 0,016	0,135 ± 0,014	-1,118 ± 0,016	-1,070 ± 0,012
MDD	-0,819 ± 0,021	0,155 ± 0,023	0,163 ± 0,016	-0,973 ± 0,025	-0,982 ± 0,017
Ассоциативный ступенчатый механизм					
EAL	-0,842 ± 0,017	0,397 ± 0,028	0,050 ± 0,020	-1,238 ± 0,025	-0,892 ± 0,014
РНКаза H(h)	-0,934 ± 0,016	0,290 ± 0,020	-0,014 ± 0,015	-1,224 ± 0,021	-0,920 ± 0,012
Ассоциативный согласованный механизм					
mAC	-0,893 ± 0,017	0,110 ± 0,018	0,231 ± 0,019	-1,003 ± 0,018	-1,124 ± 0,015
РНКаза H(b) OH	-1,353 ± 0,022	-0,144 ± 0,025	-0,375 ± 0,029	-1,209 ± 0,034	-0,978 ± 0,016
РНКаза H(b) H ₂ O	-1,157 ± 0,022	-0,004 ± 0,024	-0,204 ± 0,023	-1,152 ± 0,024	-0,953 ± 0,015
bPAC	-0,731 ± 0,017	0,275 ± 0,017	0,396 ± 0,018	-1,006 ± 0,018	-1,127 ± 0,014

3.4. Анализ ключевых межатомных расстояний в активных центрах систем

В обзорной статье [15] было высказано предположение, что распределение расстояний нуклеофильной атаки и длины разрываемой связи может служить геометрическим критерием для определения типа механизма реакции. В связи с этим, из данных траекторий КМ/ММ-МД для фермент-субстратных комплексов всех систем были построены распределения расстояний между атомом фосфора и атомами кислорода нуклеофила и уходящей группы. Полученные распределения представлены на рисунке 3.2.1, а средние значения и стандартные отклонения для этих расстояний

представлены в таблице 3.4.1. Видно, что для систем, реакция в которых протекает по ассоциативному пути, $d(P-O_{LG})$ варьируется от 1,5 до 1,75 Å, тогда как $d(P-O_{Nu})$ варьируется от 2,8 до 4,0 Å. Для систем с диссоциативным механизмом реакции эти расстояния находятся в диапазоне от 1,6 до 1,9 Å и от 2,4 до 3,6 Å соответственно. Можно отметить, что распределения для расстояния нуклеофильной атаки сильно перекрываются для систем, в которых реакция происходит по диссоциативному и ассоциативному механизму. Из чего следует, что расстояние $d(P-O_{Nu})$ не является ключевым межатомным расстоянием, определяющим механизм реакции. В связи с этим, далее был проведен более подробный анализ именно разрывающейся связи $d(P-O_{LG})$.

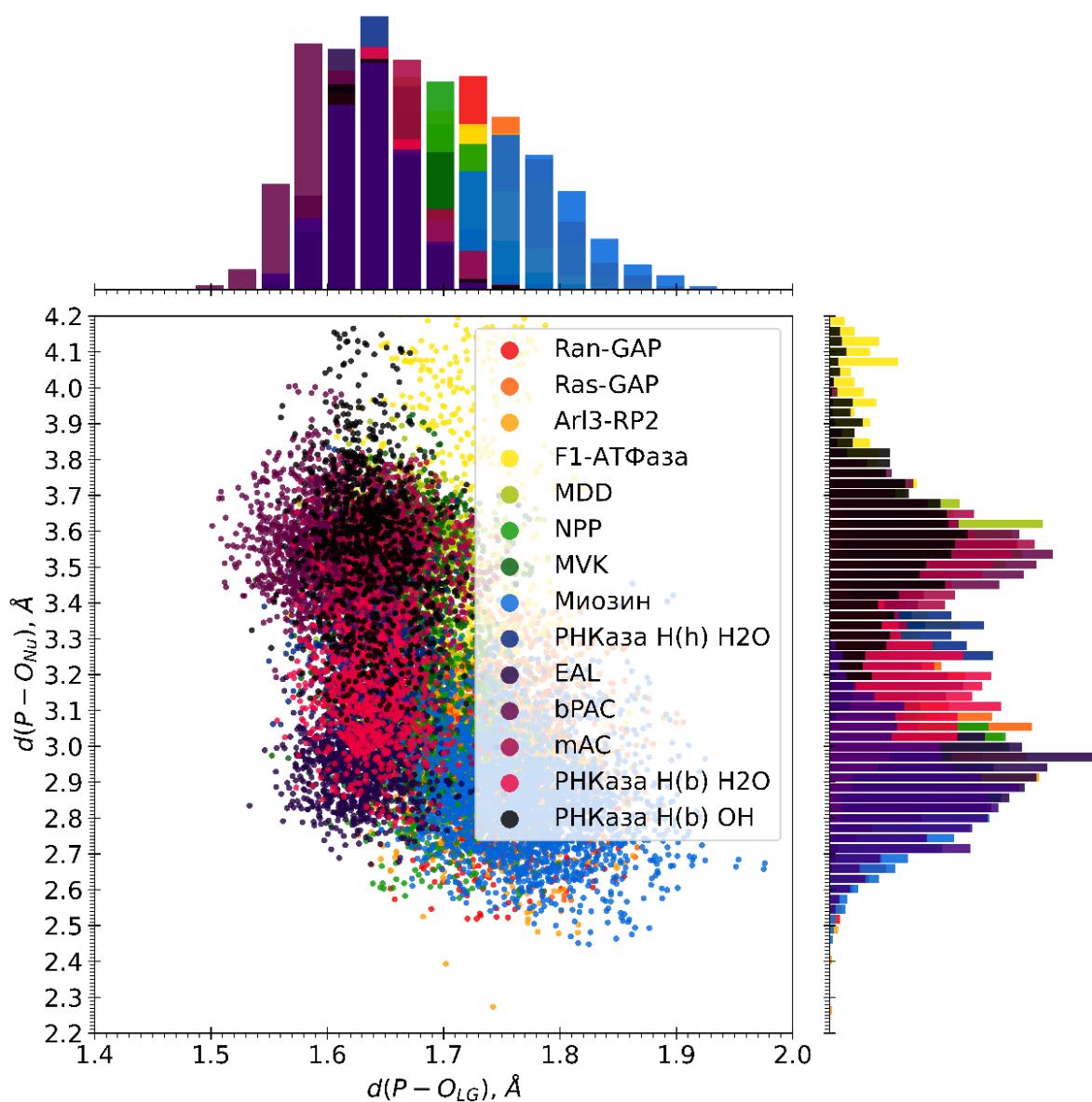


Рисунок 3.4.1. Распределения расстояния нуклеофильный атаки $d(P-O_{Nu})$ и длины разрываемой связи $d(P-O_{LG})$ в фермент-субстратных комплексах, полученные из траекторий КМ/ММ-МД

Таблица 3.4.1. Средние значения и стандартные отклонения (в Å) расстояния нуклеофильной атаки $d(P-O_{Nu})$ и длины разрываемой связи $d(P-O_{LG})$ полученные для фермент-субстратных комплексов КМ/ММ-МД моделированием

Диссоциативный механизм			Ассоциативный механизм			
Система	$d(P-O_{LG})$	$d(P-O_{Nu})$	Система	$d(P-O_{LG})$	$d(P-O_{Nu})$	
Ступенчатый	Arl3-RP2	1,74±0,05	2,93±0,15	EAL	1,63±0,03	2,95±0,11
	Ran-GAP	1,73±0,04	2,90±0,15	РНКаза H(h)	1,64±0,03	3,28±0,17
	Ras-GAP	1,75±0,05	3,07±0,16			
	F ₁ -АТФаза	1,71±0,04	3,91±0,57			
Согласованный	NPP	1,70±0,04	3,04±0,17	mAC	1,63±0,04	3,45±0,11
	MVK	1,67±0,04	3,31±0,23	РНКаза H(b) OH	1,64±0,03	3,18±0,17
	Миозин	1,76±0,04	2,87±0,16	РНКаза H(b) H ₂ O	1,64±0,03	3,18±0,17
	MDD	1,67±0,04	3,53±0,14	bPAC	1,59±0,03	3,56±0,12

На рисунке 3.4.2 представлены распределения $d(P-O_{LG})$ для всех четырнадцати систем. 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. Что может говорить о том, что разрываемая связь фосфорорганических соединений более гибкая и слабая в активных центрах ферментов, в которых реакция протекает по диссоциативному пути.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что длина разрываемой связи $d(P-O_{LG})$ является ключевым геометрическим критерием, определяющим тип механизма. Кроме того, этот критерий был оценен и в стационарных точках фермент-субстратных комплексов (Таблица 3.4.2). Можно считать, что граница критерия проходит около 1,66 Å: более высокие значения соответствуют системам с диссоциативном механизме реакции, а более низкие – с ассоциативным. Эта классификация надежна как для больших, так и для малых длин связей, однако для значений в пограничной области выводы менее убедительны (например, для систем MDD и MVK). В связи с этим, далее были рассмотрены и другие возможные критерии, связанные с электронно-плотностными характеристиками, для определения типа механизма.

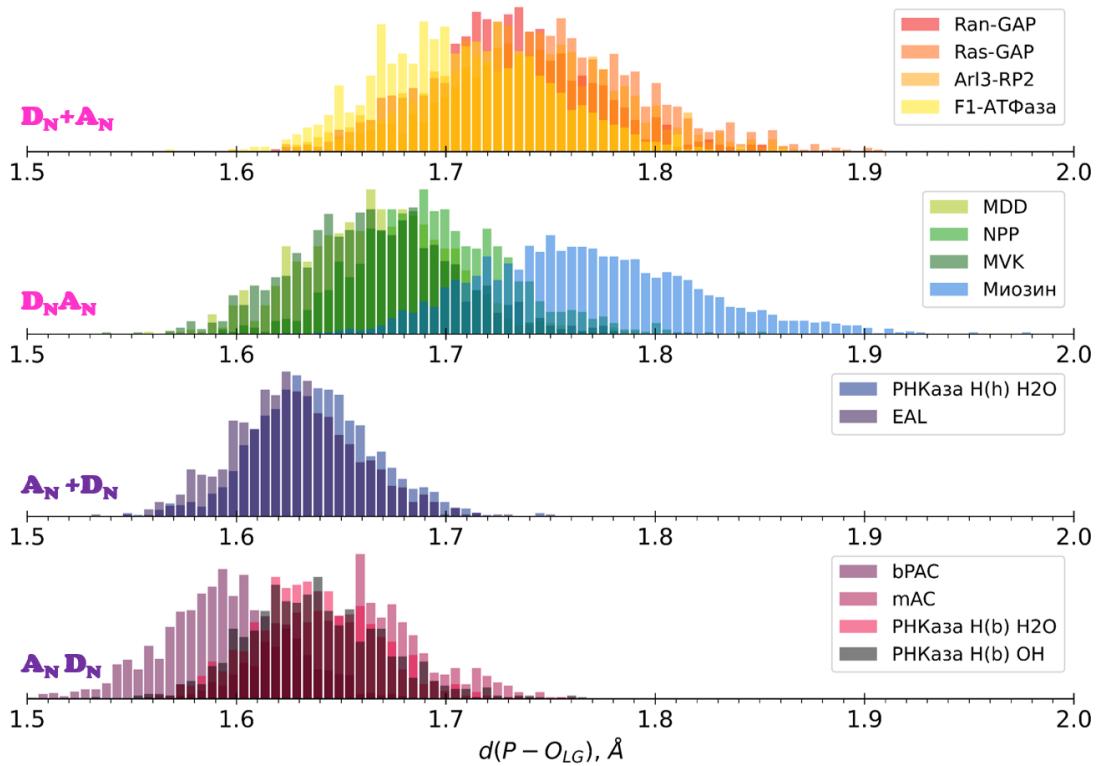


Рисунок 3.4.2. Распределение расстояний разрываемой связи $d(P-O_{LG})$ в фермент-субстратных комплексах четырнадцати рассматриваемых систем. Схемы сгруппированы по механизмам согласно таблице 3.1.1. Две верхние панели, обозначенные как D_N+A_N и $D_N A_N$, представляют диссоциативный тип механизма, две нижние панели (A_N+D_N , $A_N D_N$) – ассоцииативный тип механизма

Таблица 3.4.2. Расстояние нуклеофильной атаки $d(P-O_{Nu})$ и длина разрываемой связи $d(P-O_{LG})$ в Å, полученные в стационарных точках фермент-субстратных комплексов

Диссоциативный механизм			Ассоцииативный механизм			
Система	$d(P-O_{Nu})$, Å	$d(P-O_{LG})$, Å	Система	$d(P-O_{Nu})$, Å	$d(P-O_{LG})$, Å	
Ступенчатый	Arl3-RP2	2,87	1,74	EAL	2,93	1,62
	Ran-GAP	2,86	1,73	РНКаза H(h)	3,04	1,63
	Ras-GAP	3,03	1,73			
	F1-АТФаза	2,87	1,68			
Согласованный	NPP	3,33	1,69	mAC	3,28	1,64
	MVK	3,52	1,66	РНКаза H(b) OH	3,44	1,64
	Миозин	2,75	1,75	РНКаза H(b) H ₂ O	3,16	1,65
	MDD	3,60	1,67	bPAC	3,16	1,63

Кроме того, была проверена чувствительность результатов к изменению гибридного функционала ТФП. На рисунке 3.4.3А представлены распределения $d(P-O_{LG})$ и $d(P-O_{Nu})$, полученные с использованием функционалов PBE0-D3, B3LYP-D3 и ω B97X с одинаковым базисным набором. Видно, что в рамках рассматриваемых методов распределения практически одинаковы.

Также, было проведено сравнение распределений (Рисунок 3.4.3В) для межатомных расстояний $d(P-O_{LG})$ и $d(P-O_{Nu})$ для системы РНКазы с двумя возможными нуклеофилами (гидроксидом-анионом и молекулой воды). В обоих фермент-субстратных комплексах распределение разрываемой связи лежит в диапазоне от 1,55 до 1,75 Å. Однако, распределение нуклеофильной атаки существенно различается. В системе с гидроксид-анионом, в качестве нуклеофила, это расстояние больше, а разница между максимумами распределений в двух системах составляет около 0,5 Å. Таким образом, независимо от нуклеофила, длина разрываемой связи указывает на ассоциативный тип механизма.

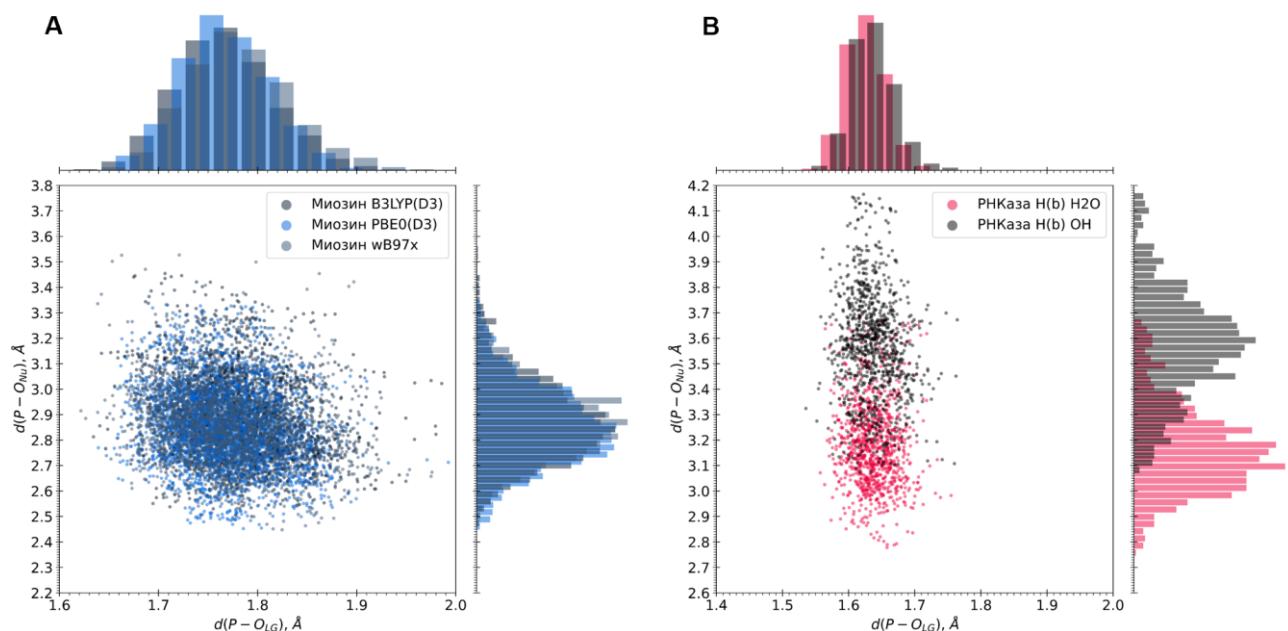


Рисунок 3.4.3. Сравнение распределений $d(P-O_{Nu})$ и $d(P-O_{LG})$ в фермент-субстратных комплексах в ходе КМ/ММ-МД моделирования: А – миозин с субстратом АТФ в активном центре, рассчитанный в разных функционалах ТФП Кона-Шэма B3LYP-D3 (темно-серый цвет), PBE0-D3 (синий цвет) и ω B97X (серый цвет). В – РНКаза Н с фрагментом ДНК с водой (розовой цвет) или гидроксид-анионом (серый цвет) в качестве нуклеофила

3.5. Анализ дескрипторов электронной плотности и порядка связи

В стационарных точках фермент-субстратных комплексов модельных систем были рассчитаны различные дескрипторы электронной плотности и проведен анализ порядков связи. Дескрипторы электронной плотности, такие как лапласиан электронной плотности и ELF, были рассчитаны в плоскости разрываемой связи и атома кислорода нуклеофила. На картах лапласиана электронной плотности (Рисунок 3.5.1) для систем, относящихся к разным типам механизмов, обнаружены существенные различия в области разрываемой связи. В случае диссоциативного механизма наблюдается деконцентрация электронной плотности, а при ассоциативном механизме – концентрация электронной плотности. Сравнение карт ELF (Рисунок 3.5.2) не выявило существенных различий.

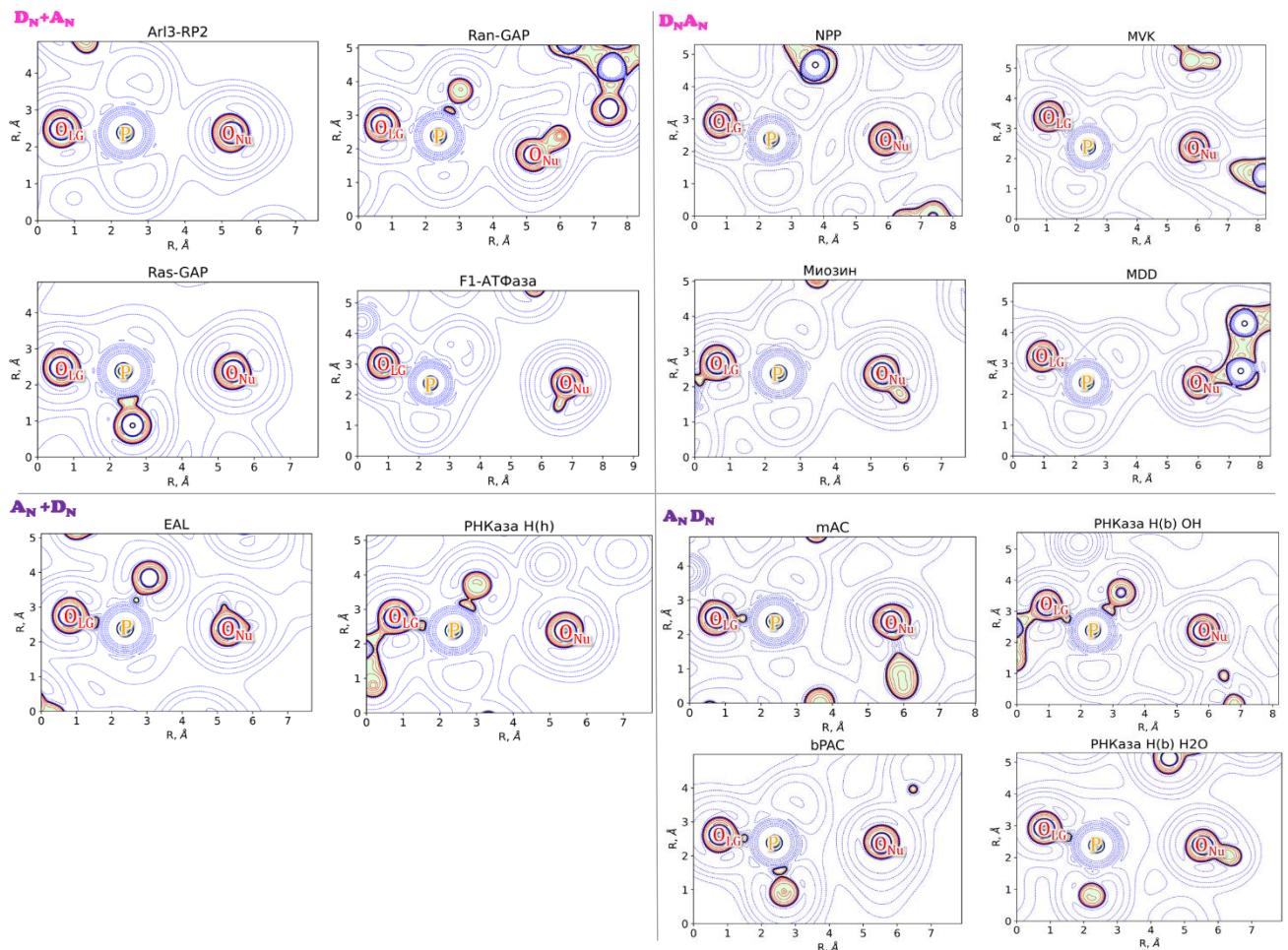


Рисунок 3.5.1. Карты лапласиана электронной плотности, рассчитанные в плоскости атома фосфора P, атомов кислорода уходящей группы O_{LG} и нуклеофила O_{Nu} для модельных систем. Карты сгруппированы по механизмам согласно таблице 3.1.1. Две верхние панели, обозначенные как D_N+A_N и D_NA_N, представляют диссоциативный тип механизма, две нижние панели (A_N+D_N, A_ND_N) – ассоциативный тип механизма. Контурные линии имеют значения $\pm(2;4;8) \cdot 10^{-1}$ а.е., $-2 \leq n \leq 1$, синие пунктирные контурные линии обозначают области пониженной электронной плотности ($\nabla^2\rho(\mathbf{r}) > 0$), красные сплошные линии – области концентрации электронной плотности ($\nabla^2\rho(\mathbf{r}) < 0$), а зеленая сплошная линия соответствует $\nabla^2\rho(\mathbf{r}) = 0$. Область с $\nabla^2\rho(\mathbf{r}) < 0$ окрашена в светло-зеленый цвет

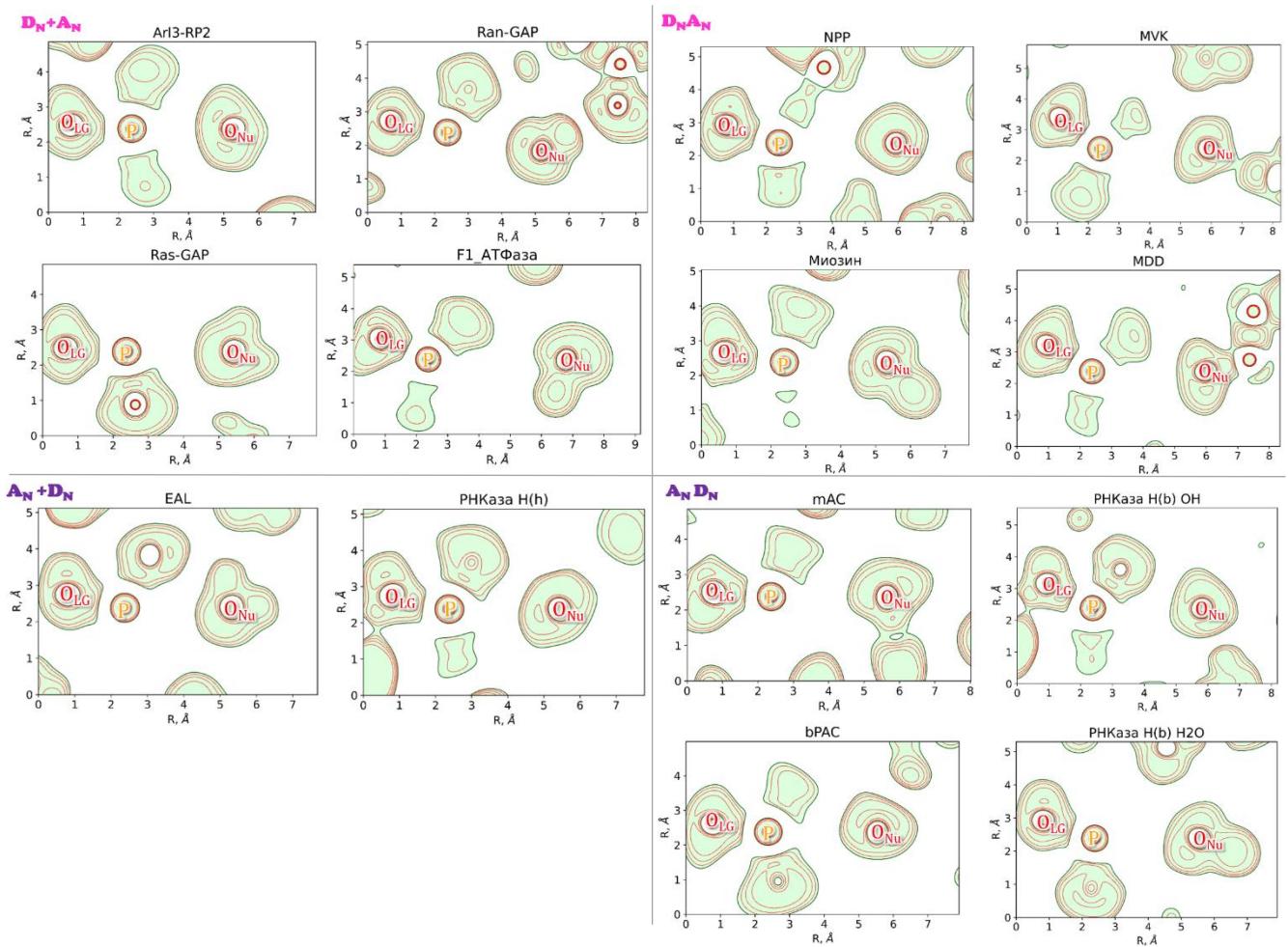


Рисунок 3.5.2. Карты ELF модельных систем. Карты сгруппированы по механизмам согласно таблице 3.1.1. Две верхние панели, обозначенные как D_N+A_N и D_NA_N , представляют диссоциативный тип механизма, две нижние панели (A_N+D_N , A_ND_N) – ассоцииативный тип механизма. Контурные линии обозначены: зеленым цветом – 0,5, красным – 0,6, 0,7, 0,8, 0,9. Область с $ELF > 0,5$ окрашена в светло-зеленый цвет

В связи с тем, что и анализ геометрических параметров и карт лапласиана электронной плотности показали, что ключевым дескриптором выступает разрываемая связь P-O_{LG}, дальнейший анализ был сконцентрирован именно на свойствах этой связи. На рисунке 3.5.3 представлен лапласиан электронной плотности вдоль разрываемой связи P-O_{LG}. Для реакций, протекающих по ассоциативному механизму, $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ принимает отрицательные значения на расстояниях от 0,8 до 1,3 Å от атома фосфора. Напротив, для систем, соответствующих диссоциативному пути, $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ положителен в этой области. Таким образом, лапласиан электронной плотности вдоль разрываемой связи может быть использован в качестве бинарного критерия для определения типа механизма реакции.

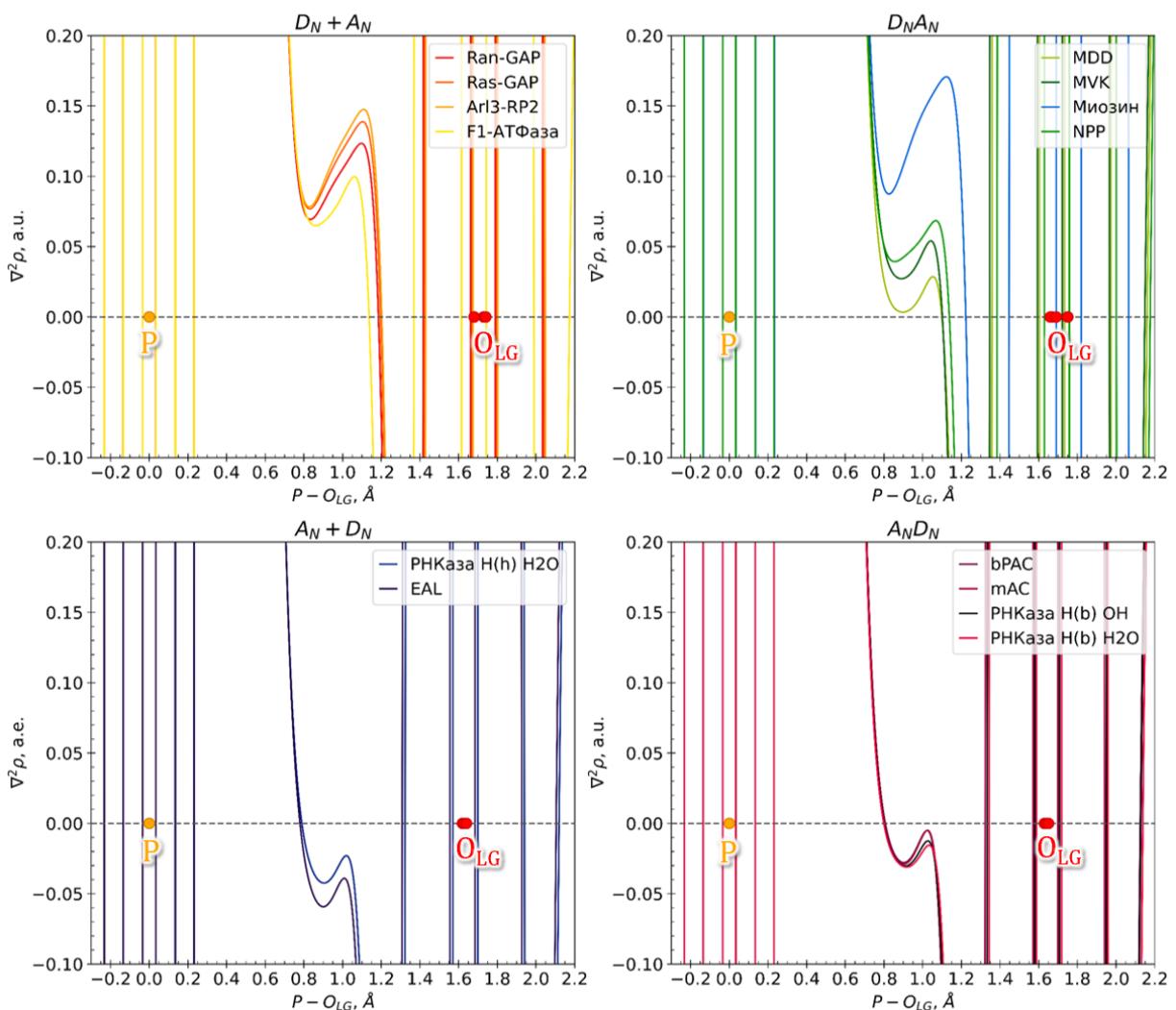


Рисунок 3.5.3. Лапласиан электронной плотности $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ вдоль разрываемой связи P-O_{LG} в фосфорорганических соединениях в активных центрах фермент-субстратных комплексов. Две верхние панели, обозначенные как D_N+A_N и D_{NA}N, представляют диссоциативный тип механизма, две нижние панели (A_N+D_N, A_{ND}N) – ассоциативный тип механизма

В таблице 3.5.1 представлены различные дескрипторы электронной плотности исследованных систем, рассчитанные в критической точке связи P-O_{LG}. Анализ этих значений показал, что некоторые дескрипторы различаются для диссоциативных и ассоциативных механизмов. Например, электронная плотность систем с ассоциативным механизмом больше 0,14 а.е., а плотность электронной энергии для них меньше -0,075 а.е. Хотя некоторые из дескрипторов могут служить в качестве критерия определения типа механизма, они недостаточно репрезентативны по сравнению с лапласианом электронной плотности вдоль разрываемой связи.

Таблица 3.5.1. Дескрипторы электронной плотности в критической точке разрываемой связи: электронная плотность, ρ (а.е.), лапласиан электронной плотности, $\nabla^2\rho$ (а.е.), эллиптичность электронной плотности, ϵ , плотность энергии электронов, H (а.е.), локализованный орбитальный локатор, **LOL**, и функция локализации электронов, **ELF**

Система	ρ	$\nabla^2\rho$	ϵ	H	LOL	ELF
Диссоциативный ступенчатый механизм						
Arl3-RP2	0,115	0,340	0,028	-0,065	0,342	0,028
Ran-GAP	0,118	0,373	0,026	-0,066	0,339	0,026
Ras-GAP	0,116	0,353	0,021	-0,065	0,341	0,021
F ₁ -АТФаза	0,127	0,518	0,038	-0,066	0,320	0,182
Диссоциативный согласованный механизм						
NPP	0,128	0,455	0,061	-0,072	0,335	0,061
MVK	0,135	0,595	0,039	-0,069	0,318	0,039
Миозин	0,110	0,305	0,032	-0,062	0,345	0,032
MDD	0,136	0,546	0,029	-0,075	0,328	0,192
Ассоциативный ступенчатый механизм						
EAL	0,263	0,729	0,065	-0,069	0,318	0,179
РНКаза H(h)	0,198	1,375	0,024	-0,110	0,299	0,154
Ассоциативный согласованный механизм						
mAC	0,144	0,669	0,059	-0,076	0,318	0,179
РНКаза H(b) OH	0,145	0,630	0,054	-0,080	0,325	0,188
РНКаза H(b) H ₂ O	0,143	0,594	0,057	-0,081	0,329	0,193
bPAC	0,144	0,678	0,036	-0,076	0,317	0,178

Также в стационарных точках фермент-субстратных комплексов был проведен анализ порядка связи P-OLG (Таблица 3.5.2). Для систем, в которых реакция проходит по ассоциативному пути, значения LBO и IBSI больше, чем для систем, реагирующих по диссоциативному механизму. Если LBO больше 0,2 или IBSI больше 0,23, реакция протекает по ассоциативному механизму, напротив, если LBO и IBSI меньше указанных значений, то реакция идет по диссоциативному пути. Таким образом, порядки связи, рассчитанные методами LBO и IBSI, могут выступать в качестве критериев определения типа механизма. Однако, использование лапласиана электронной плотности вдоль разрываемой связи выглядит более удобным и наглядным критерием, который обеспечивает четкую бинарную классификацию.

Таблица 3.5.2. Порядок разрываемой P-OLG связи в фермент-субстратных комплексах, рассчитанный методами LBO (порядок связи Лапласа) и IBSI (индекс внутренней прочности связи)

	Диссоциативный механизм			Ассоциативный механизм		
	Система	LBO	IBSI	Система	LBO	IBSI
Ступенчатый	Arl3-RP2	0,127	0,193	EAL	0,249	0,249
	Ran-GAP	0,134	0,200	РНКаза H(h)	0,235	0,246
	Ras-GAP	0,126	0,199			
	F ₁ -АТФаза	0,160	0,220			
Согласованный	NPP	0,183	0,211	mAC	0,193	0,245
	MVK	0,177	0,226	РНКаза H(b) OH	0,212	0,246
	Миозин	0,118	0,182	РНКаза H(b) H ₂ O	0,210	0,244
	MDD	0,174	0,174	bPAC	0,202	0,247

3.6. Применение методики к определению механизма реакции переноса фосфорила в аденилаткиназах

Полученные критерии классификации механизма (распределение длины связи d(P-OLG) (Рисунок 3.6.1), $\nabla^2 \rho(\mathbf{r})$ вдоль разрываемой связи (Рисунок 3.6.2), порядки связи LBO и IBSI (Таблица 3.6.1)) были применены для определения механизма реакции

переноса фосфатной группы с АТФ на АМФ в активных центрах трех аденилаткиназ ЕСАК, MtAK и APAK. Все критерии показали, что реакция протекает по диссоциативному пути: $\nabla^2 \rho(\mathbf{r}) > 0$, $d(P-O_{LG}) \in [1,55; 1,87]$, $LBO < 0,2$ и $IBSI < 0,23$.

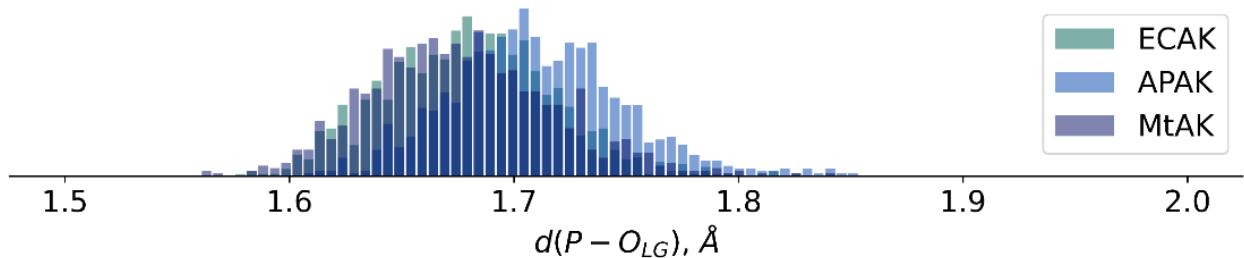


Рисунок 3.6.1. Распределения длины разрываемой связи $P-O_{LG}$ АТФ в активных центрах аденилаткиназ ЕСАК, APAK, MtAK

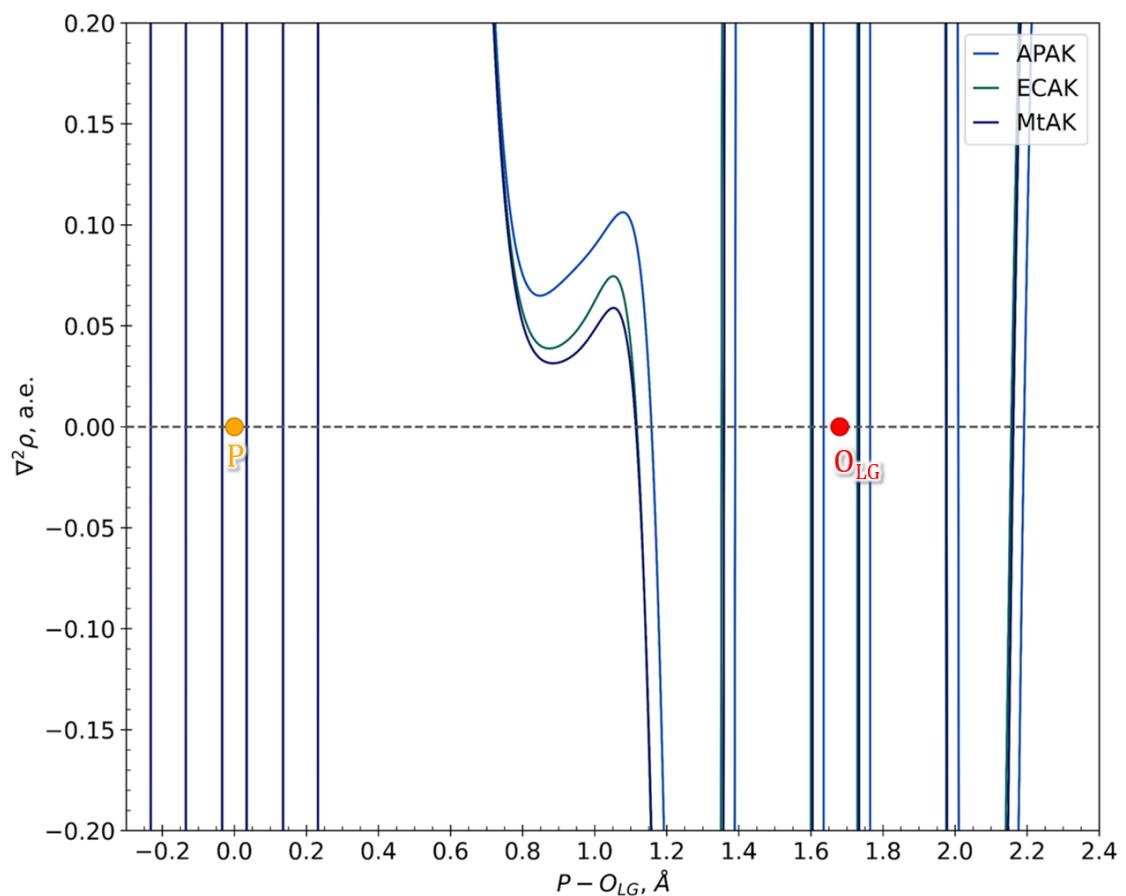


Рисунок 3.6.2. Лапласиан электронной плотности вдоль разрываемой связи $P-O_{LG}$ в минимуме поверхности потенциальной энергии для АТФ в активных центрах аденилаткиназ ЕСАК, APAK, MtAK

Таблица 3.6.1. Порядок разрываемой P-O_{LG} связи в фермент-субстратных комплексах аденилаткиназ ЕСАК, APAK и MtAK, рассчитанный методами LBO (порядок связи Лапласа) и IBSI (индекс внутренней прочности связи)

Система	LBO	IBSI
ECAK	0,170	0,219
APAK	0,149	0,213
MtAK	0,171	0,219

Для проверки предложенных критериев было проведено КМ/ММ-МД моделирование с добавлением смещающего потенциала методом зонтичной выборки для определения механизма реакции в активном центре MtAK. Полученный профиль энергии Гиббса и структура, отвечающая переходному состоянию реакции, представлены на рисунке 3.6.3.

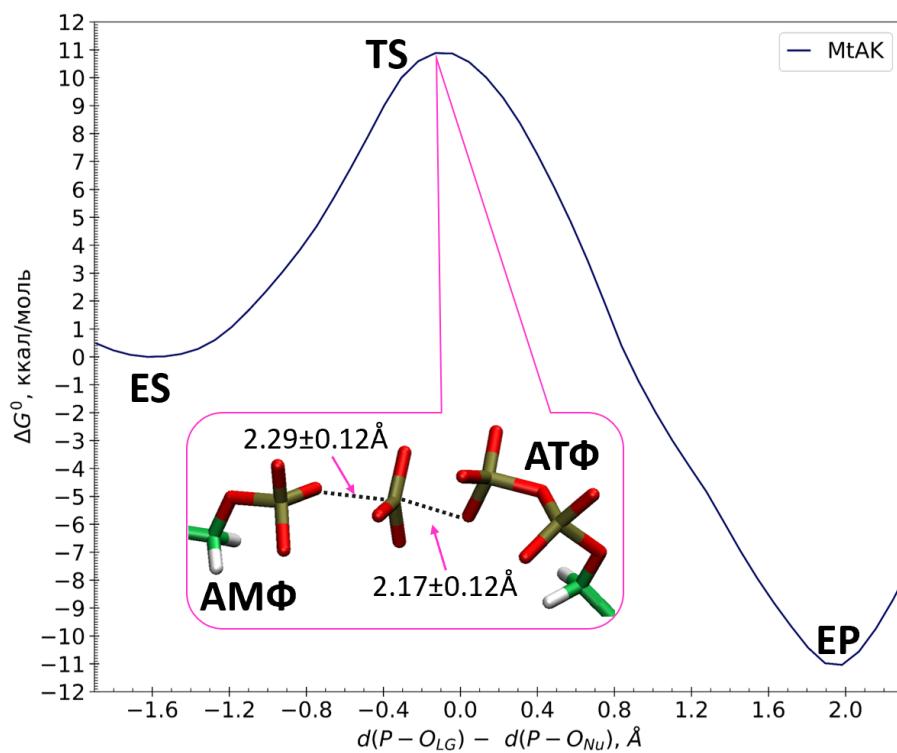


Рисунок 3.6.3. Профиль энергии Гиббса реакции переноса фосфата в активном центре аденилаткиназы MtAK. Структура переходного состояния показана в сноске. ES – фермент-субстратный комплекс, TS – переходное состояние, EP – комплекс фермент-продукт

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 MtAK сопровождается образованием $P\bar{O}_3^-$. А вероятность разрыва связи Р-О по ассоциативному механизму, рассчитанная по формуле Полинга [39], составляет $0,16 \pm 0,06$. Таким образом, реакция переноса фосфатной группы с АТФ на АМФ в аденилаткиназах протекает по диссоциативному типу, что подтверждает предложенные критерии для определения типа механизма.

Глава 4. Гидролиз фосфорорганических соединений в активном центре фосфотриэстеразы бактерии *Pseudomonas diminuta*

Результаты, представленные в данной главе, изложены в работах [178–180]².

4.1. Подготовка модельных систем и протокол расчетов

В качестве начальных координат неводородных атомов использовались данные кристаллической структуры (PDB ID: 3CAK [50]) димера фосфотриэстеразы бактерии *Pseudomonas diminuta* (Pd-PTE). Атомы водорода были добавлены в структуру с помощью программы Reduce [163] так, чтобы протонированные состояния аминокислотных остатков белка отвечали нейтральному pH. Таким образом, в обоих мономерах Pd-PTE все остатки гистидина, кроме His254, оказались нейтральными. Кроме того, аминокислотный остаток Lys169 был модифицирован на карбоксилированную форму, что позволяет координировать оба катиона металла в активном центре фермента. В качестве субстратов были выбраны четыре органофосфата (Рисунок 4.1.1) с уходящими группами разной лабильности: с хорошей уходящей группой – дибутил-4-нитрофенилфосфат (1) и диэтил-4-нитрофенилфосфат (2) и с плохой уходящей группой – дибутилфенилфосфат (3) и трифенилфосфат (4). Данные субстраты, а также нуклеофильный гидроксид-анион добавляли в структуру аналогично комплексу фосфотриэстеразы Pd-PTE с параоксоном в активном центре [50]. Все четыре комплекса

² При описании данной главы диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2-2.5 Положение о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

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. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Мулашкиной Т.И. составил 65%

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. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Мулашкиной Т.И. составил 85%

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. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Мулашкиной Т.И. составил 85%

в активном центре фермента содержали катионы кобальта Co^{2+} , а также были подготовлены комплексы Pd-PTE с субстратами (1) и (3) с нативным металлом (катионами цинка Zn^{2+}) в активном центре фермента. Подготовленные таким образом системы были сольватированы молекулами воды, а для нейтрализации системы были добавлены три хлорид-иона. Подготовка полноатомных моделей, а также их визуализация и последующий анализ проводился в программе VMD [164].

Все молекулярно-динамические расчеты проводились с шагом интегрирования в 1 фс в *NPT*-ансамбле при давлении 1 атм и температуре 300 К, постоянство которых поддерживалось с помощью баростата Нозе-Гувера [173] и термостата Ланжевена [129].

Для молекулярно-механического описания систем использовались: силовое поле CHARMM [166–168] для описания фермента, CGenFF [181,182] для описания субстратов и карбоксилированной формы Lys169 и модель TIP3P [169] для описания молекул воды.

Для релаксации сольватной оболочки проводилось классическое МД-моделирование с фиксированными атомами белка и субстрата в течении 1 нс. Затем была проведена релаксация белкового окружения без ограничений в течении 100 нс. Для дальнейшего исследования были выбраны наиболее репрезентативные структуры за последние 40 нс.

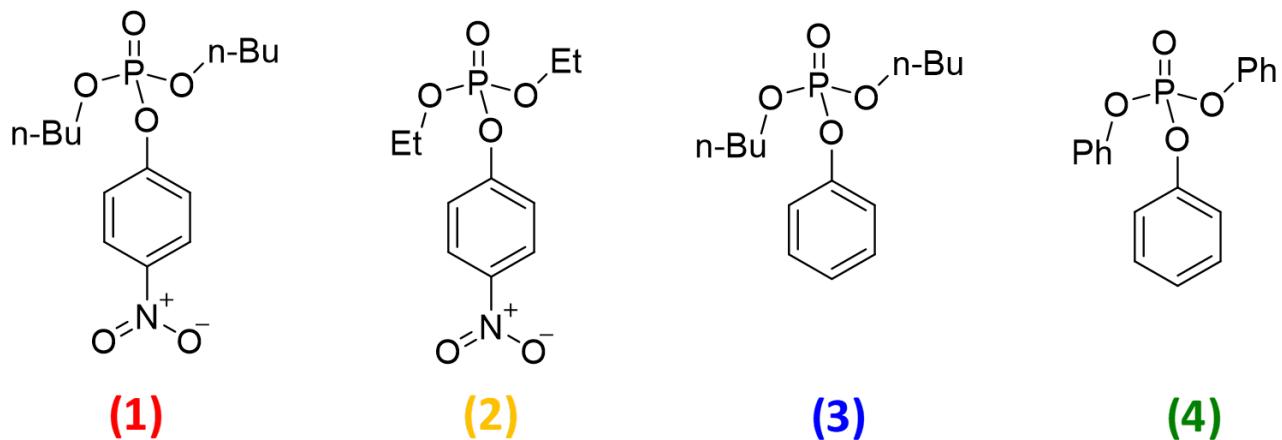


Рисунок 4.1.1. Субстраты, рассматриваемые в данном исследовании: дибутил-4-нитрофенилфосфат (1) и диэтил-4-нитрофенилфосфат (2) с хорошими уходящими группами; дибутилфенилфосфат (3) и трифенилфосфат (4) с плохими уходящими группами

Все дальнейшие расчеты проводились с использованием комбинированного метода квантовой механики/молекулярной механики. Квантовая часть (Рисунок 4.1.2) включала

в себя активный центр фермента: гидроксид анион, субстрат, катионы металлов (Co^{2+} или Zn^{2+}) и их координационные сферы, представленные боковыми цепями пяти гистидинов – His55, His57, His201, His230 и His254, карбоксилированного лизина Lys169 и аспарагиновой кислоты Asp301. Таким образом, размер квантовой подсистемы составил: с субстратом (1) – 127 атомов, с субстратом (2) – 113 атомов, с субстратом (3) – 125 атомов и с субстратом (4) – 119 атомов. Суммарный заряд КМ-части каждой модельной системы был +2. Системы с катионами цинка в активном центре фермента рассчитывались в синглетном состоянии. Так как известно, что катионы кобальта обычно в схожей координационной геометрии принимают высокоспиновое состояние [183–185], для систем, содержащих катионы кобальта в активном центре фермента, расчеты проводились с мультиплетностью 7.

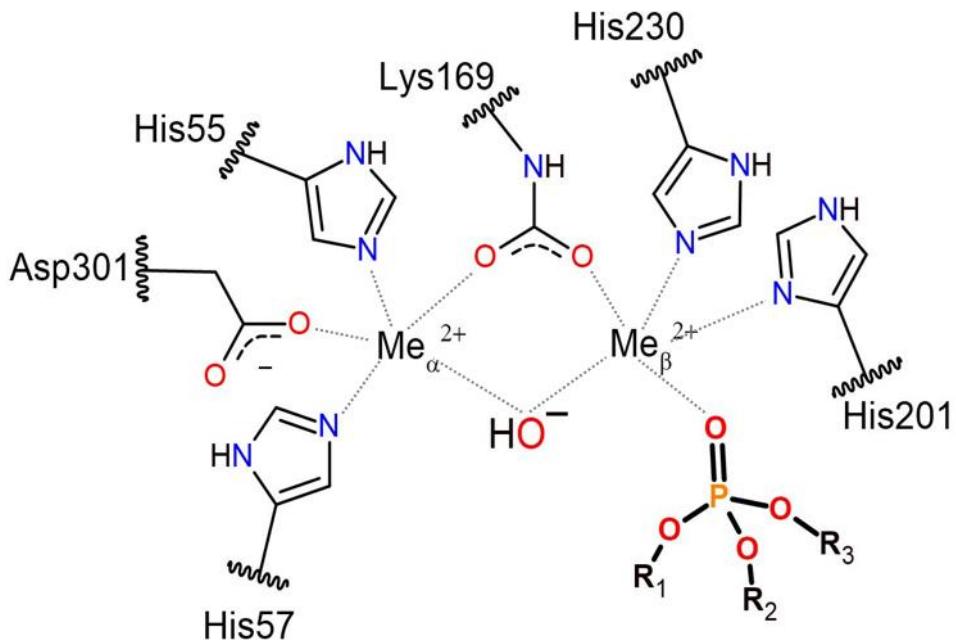


Рисунок 4.1.2. Квантовая подсистема: активный центр фосфотриэстеразы Pd-PTE с органофосфатом и нуклеофильным гидроксид-анионом. Пунктирные линии обозначают координационные связи

Квантовая подсистема описывалась с помощью теории функционала электронной плотности (ТФП) Конна-Шэма с гибридным функционалом PBE0 [110] и дисперсионной поправкой D3 [170] и базисным набором с поляризационными функциями 6-31G**. Катионы кобальта и цинка описывались с использованием псевдопотенциала LANL2DZ [186]. Для систем с Zn^{2+} использовался ограниченный вариант ТФП, а для

систем с Co^{2+} – неограниченный вариант. На границе квантово-механической и молекулярно-механической подсистем использовались аддитивная схема с электростатическим внедрением и водородные link-атомы.

Для определения типа механизма реакции гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE применялись критерии, предложенные в Глава 3. Для этого было проведено КМ/ММ-МД моделирование в течении 5 пс фермент-субстратных комплексов в активном центре Pd-PTE и КМ/ММ оптимизация комплекса с дибутил-4-нитрофенилфосфатом.

Кроме того, проводилась КМ/ММ оптимизация параоксона (диэтил-4-нитрофенилфосфата) в активном центре фермента, содержащего катионы цинка.

Механизм реакции гидролиза в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE определялся с помощью КМ/ММ-МД моделирования с добавлением смещающего потенциала [131]. В качестве координаты реакции для первой стадии было взято расстояние между атомом фосфора и кислородом нуклеофила ($d(\text{P}-\text{O}_{\text{Nu}})$), а для второй стадии – расстояние между атомом фосфора и кислородом уходящей группы ($d(\text{P}-\text{O}_{\text{LG}})$). Диапазон значений координат реакции составил от 1,8 до 3,2 Å и от 1,8 до 3,6 Å и был разбит на 8 и 10 окон для первой и второй стадии соответственно. На каждое окно накладывался смещающий потенциал центрированный на определенном значении координаты реакции с константами жесткости 40 ккал/моль/Å вблизи областей локальных минимумов и 80 ккал/моль/Å и 120 ккал/моль/Å в областях, отвечающих переходным состояниям. Длина каждой траектории составила около 5 пс. Для построения профилей энергии Гиббса данные обрабатывались методом взвешенных гистограмм WHAM [132] и зонтичного интегрирования UI [133].

Для сравнения динамического поведения интермедиатов реакции всех рассматриваемых систем было проведено 5 пс КМ/ММ-МД моделирование. Начальные геометрии которых были выбраны из структур, соответствующих областям минимумов на профилях энергии Гиббса. Из полученных молекулярно-динамических траекторий были получены распределения ключевых межатомных расстояния ($d(\text{P}-\text{O}_{\text{LG}})$ и $d(\text{P}-\text{O}_{\text{Nu}})$), а также проведен анализ карт лапласиана электронной плотности, рассчитанных в плоскости атома фосфора и атомов кислорода нуклеофила и уходящей группы.

Молекулярно-динамические расчеты выполнялись в программном пакете NAMD [165]. А также для КМ/ММ-МД моделирований использовалась комбинация программ NAMD для МД расчетов и TeraChem [172] для квантово-механических расчетов, взаимодействие которых обеспечивалось специальным интерфейсом [171]. Оптимизация КМ/ММ проводились с использованием программы Tcl ChemShell [174] с эффективным оптимизатором DL-FIND [175] и квантово-химическим программным пакетом TURBOMOLE [176]. Дескрипторы электронной плотности рассчитывались в программе Multiwfn [177].

4.2. Применение критериев определения типа механизма

Для определения типа механизма реакции гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE были применены предложенные в Глава 3 критерии определения типа механизма. А именно, распределение разрываемой связи Р-O_{LG} в фермент-субстратном комплексе дибутил-4-нитрофенилфосфата (1) в активном центре Pd-PTE, полученное из КМ/ММ-МД траекторий (Рисунок 4.2.1), а также лапласиан вдоль линии разрываемой связи в структуре ES, отвечающей минимуму на поверхности потенциальной энергии (Рисунок 4.2.2).

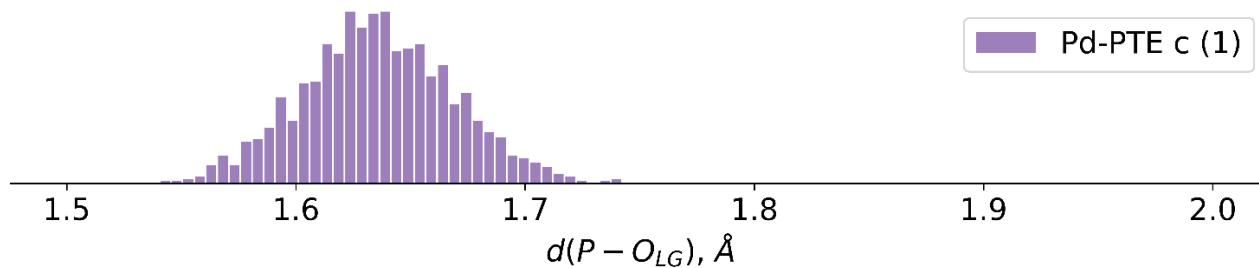


Рисунок 4.2.1. Распределения длины разрываемой связи Р-O_{LG} в дибутил-4-нитрофенилфосфат (субстрат (1)) в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE, содержащей катионы кобальта

Видно, что значения длины связи Р-O_{LG} лежат в диапазоне от 1,55 Å до 1,75 Å, что соответствует системам, в которых реакция протекает по ассоциативному пути. Тип механизма также подтверждается значениями лапласиана вдоль разрываемой связи (Рисунок 4.2.2), так как в области, когда связь Р-O_{LG} принимает значения от 0,8 до 1,3 Å наблюдается деконцентрация электронной плотности.

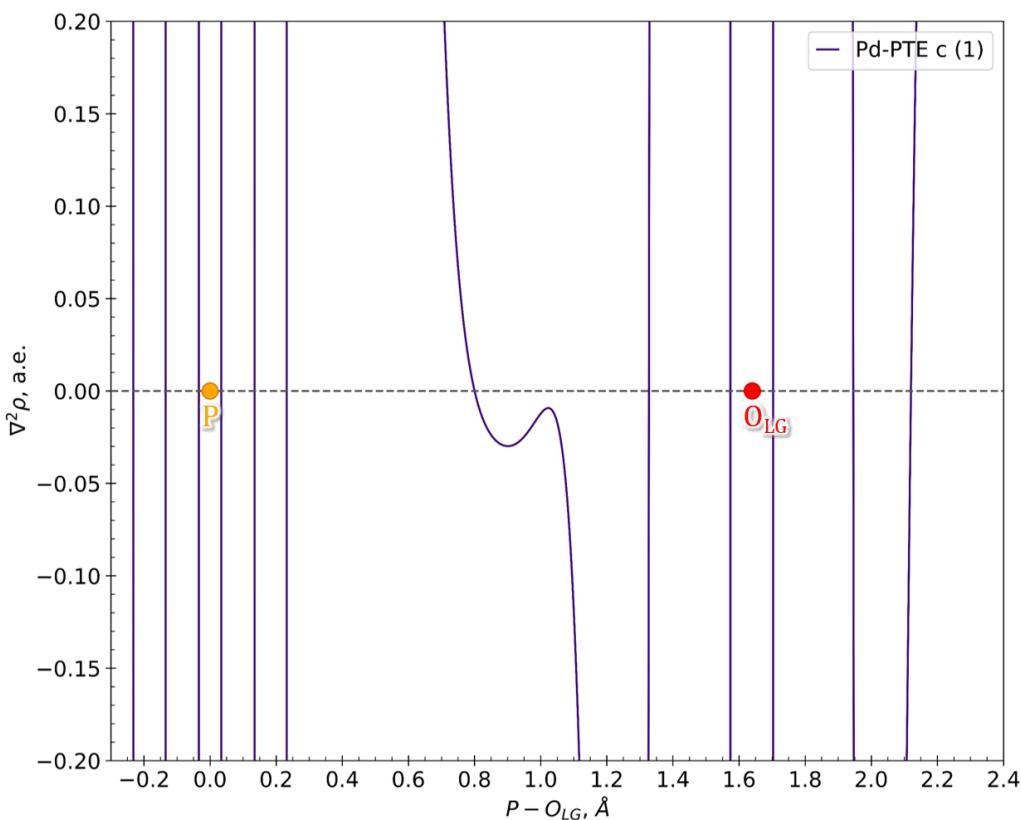


Рисунок 4.2.2. Лапласиан электронной плотности вдоль разрываемой связи P-O_{LG} в минимуме поверхности потенциальной энергии соответствующему фермент-субстратному комплексу для дибутил-4-нитрофенилфосфата (субстрат (1)) в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE, содержащей катионы кобальта

4.3. Механизм реакции гидролиза органофосфатов в активном центре Pd-PTE и профили энергии Гиббса

По результатам КМ/ММ-МД моделирования с наложением смешающих потенциалов методом зонтичной выборки были получены сечения профилей энергии Гиббса для реакции гидролиза четырех органофосфатов: двух с хорошими уходящими группами (1) и (2) и двух других с плохими уходящими группами (3) и (4) в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE с катионами кобальта (Рисунок 4.3.1). А также для изучения влияния на механизм реакции катиона металла в активном центре проводилось сравнение профилей реакции гидролиза субстратов (1) и (3) в активном центре Pd-PTE, содержащий катионы цинка или кобальта (Рисунок 4.3.3).

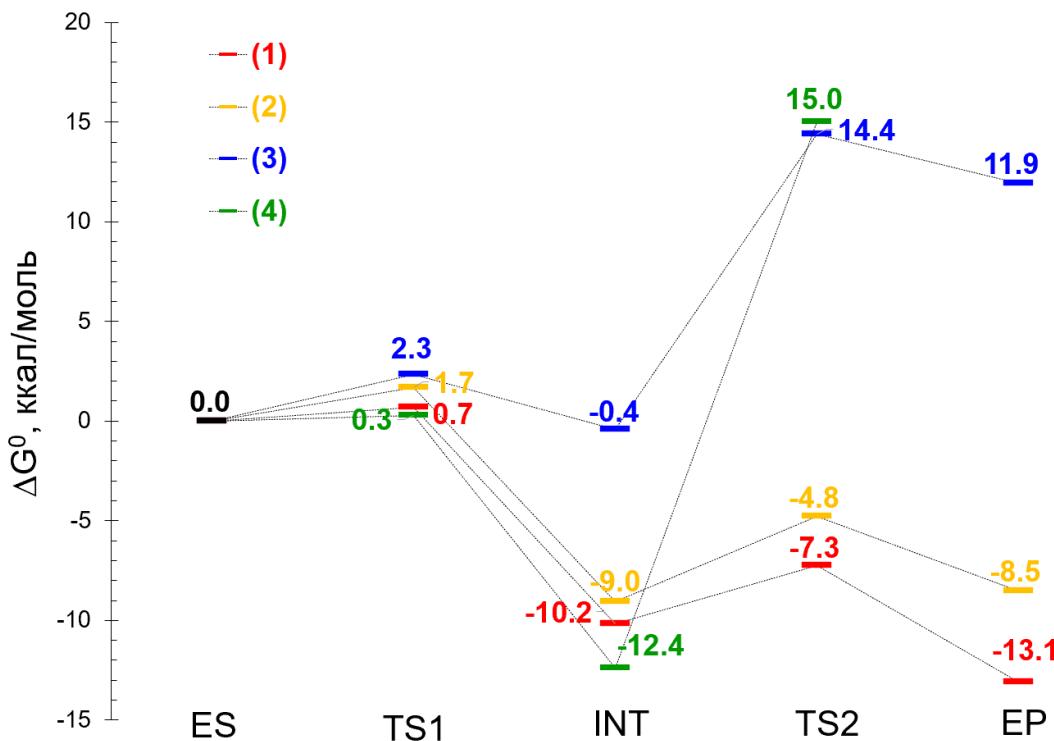


Рисунок 4.3.1. Профили энергии Гиббса, рассчитанные для реакции гидролиза четырех субстратов: (1) -красный цвет, (2) – желтый цвет, (3) – синий цвет и (4) – зеленый цвет в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE, содержащей катионы кобальта. Здесь и далее: ES – фермент-субстратный комплекс, TS1 и TS2 – переходные состояния, INT – промежуточный интермедиат и EP – комплекс фермент-продукт

Для всех рассмотренных систем был получен двухстадийный механизм реакции. Причем, первая стадия реакции, а именно нуклеофильная атака, протекает с низким энергетическим барьером (< 3 ккал/моль). Вторая же стадия для субстратов (1) и (2) (органиофосфаты с хорошими уходящими группами) также протекает с низкими энергетическими барьерами, 3 ± 1 и 4 ± 1 ккал/моль соответственно. Тогда как, для субстратов с плохими уходящими группами (органиофосфаты (3) и (4)) наблюдаются высокие энергетические барьеры для второй стадии (14 ± 1 и 27 ± 1 ккал/моль соответственно). Кроме того, для субстратов (1) и (2) продукты реакции стабилизированы относительно фермент-субстратного комплекса, а для субстратов (3) и (4), наоборот, продукты дестабилизированы относительно ES. Полученные результаты качественно согласуются с кинетическими данными [68], из которых следует отсутствие каталитической активности Pd-PTE с дибутилфенилфосфатом (3) и трифенилфосфатом (4). Однако, для всех исследуемых субстратов с хорошими уходящими группами рассчитанные энергетические барьеры соответствуют значительно более высоким

константам скорости, чем наблюдаемые значения k_{kam} ($k_{kam} = 570 \pm 40 \text{ с}^{-1}$ для (1) и $k_{kam} = 2230 \pm 40 \text{ с}^{-1}$ для (2)) [68]. Из чего можно сделать предположение, что для субстратов с хорошими уходящими группами лимитирующей стадией является диффузия продукта, а не химическая стадия реакции, что согласуется с другими теоретическими исследованиями [50,57,59,63] и экспериментальными наблюдениями, согласно которым химическая стадия протекает довольно быстро и зависит от значения pK_a уходящей группы [69].

На рисунке 4.3.2 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). Образование интермедиата сопровождается 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 имеет ту же энергию, что и фермент-субстратный комплекс, то есть сильно дестабилизирован по сравнению с интермедиатами других соединений. На второй стадии происходит разрыв Р-O_{LG} связи. Таким образом, было установлено, что механизм реакции гидролиза органофосфатов с хорошими уходящими группами протекает по ступенчатому ассоциативному типу, что согласуется с применяемыми критериями в разделе 4.2.

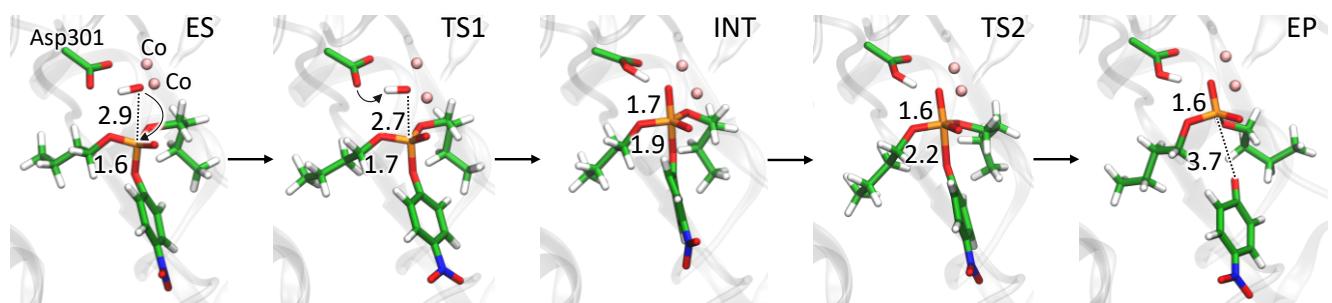


Рисунок 4.3.2. Механизм реакции гидролиза дибутил-4-нитрофенилфосфата (субстрат (1)) в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE. Цветовая кодировка: углерод – зеленый, кислород – красный, азот – синий, фосфор – оранжевый, водород – белый, кобальт - розовый

На рисунке 4.3.3 также показано сравнение профилей реакций, полученных для гидролиза субстратов (1) и (3) в активном центре Pd-PTE с двумя различными катионами

металлов Co^{2+} и Zn^{2+} . Видно, что энергетические барьеры практически не изменяются при замене катионов металла. Согласно экспериментальным исследованиям [51,187], катализическая активность фосфотриэстеразы с катионами кобальта выше примерно в три раза, чем Pd-PTE с катионами цинка в активном центре. В связи с тем, что выше был сделан вывод 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. Кроме того, более высокие значения $k_{\text{кат}}$ для Pd-PTE с Co^{2+} согласуются с тем, что экспериментальные исследования комплексообразования белков с Zn^{2+} и Co^{2+} показывают, что комплексы с катионами кобальта обычно имеют несколько более высокую константу диссоциации [188,189], то есть комплексы с кобальтом менее устойчивы.

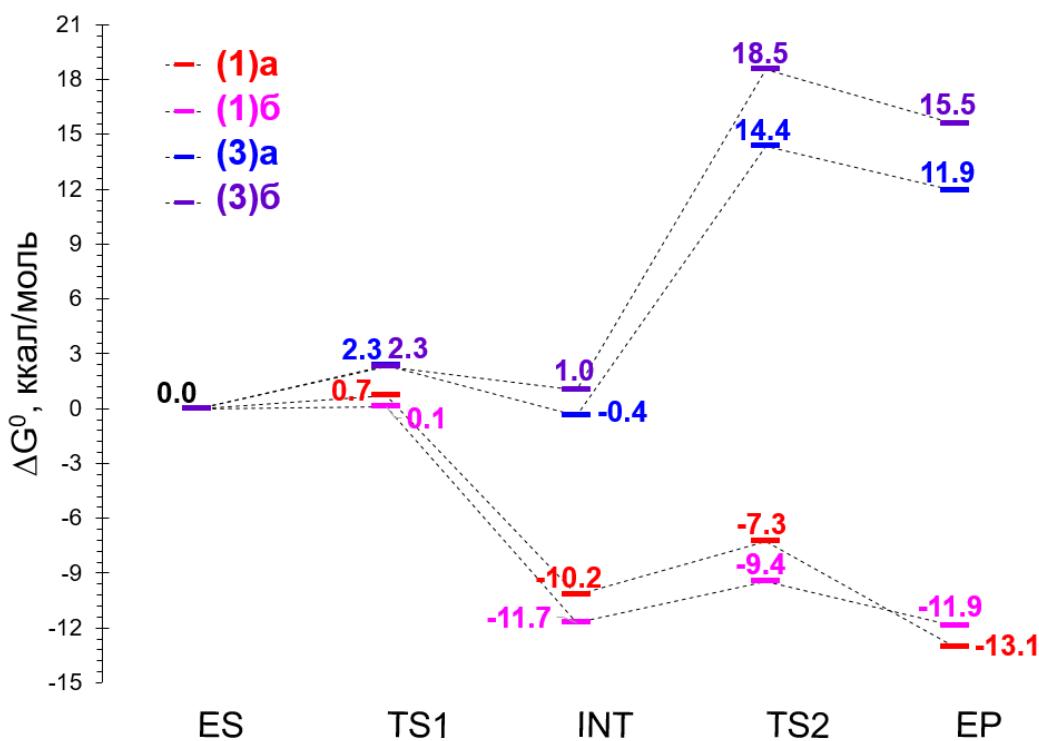


Рисунок 4.3.3. Сравнение профилей энергии Гиббса, полученных для гидролиза субстрата (1) ((1)а, красный) и (3) ((3)а, синий) в Pd-PTE с катионами кобальта в активном центре и (1) ((1)б, розовый) и (3) ((3)б, фиолетовый) в Pd-PTE с катионами цинка в активном центре

Для выявления природы различных энергетических ландшафтов для различных субстратов было проведено сравнение координат реакции в стационарных точках обеих стадий (Рисунок 4.3.4). На первой стадии в качестве координаты реакции выступало

расстояние нуклеофильной атаки $d(P-O_{Nu})$, а на второй стадии – расстояние между атомом фосфора и кислородом уходящей группы $d(P-O_{LG})$. Фермент-субстратный комплекс, соответствующий минимуму энергии Гиббса характеризуется расстояниями $d(P-O_{Nu})$ отличающимися на 0,3 Å в зависимости от субстрата. Наименьшее расстояние нуклеофильной атаки (2,65 Å) наблюдается для органоfosфата (2) с наименьшими заместителями (этильными). Для субстратов (1) и (3) с *n*-бутильными заместителями $d(P-O_{Nu})$ составляет 2,90 и 2,94 Å соответственно, а промежуточное значение в 2,8 Å соответствует субстрату (4) с промежуточными по размеру заместителями. Таким образом, можно сказать, что прочность фермент-субстратного комплекса зависит от боковых заместителей в субстратах. Аналогично, для комплекса фермент-продукт (EP) длина разрываемой связи короче для продукта гидролиза субстрата (2). Несмотря на то, что органоfosфат (1) имеет такую же уходящую группу, что и (2), но у него более крупные боковые заместители (бутилы), что приводит к удлинению расстояния $d(P-O_{LG})$ в комплексе EP на 0,6 Å.

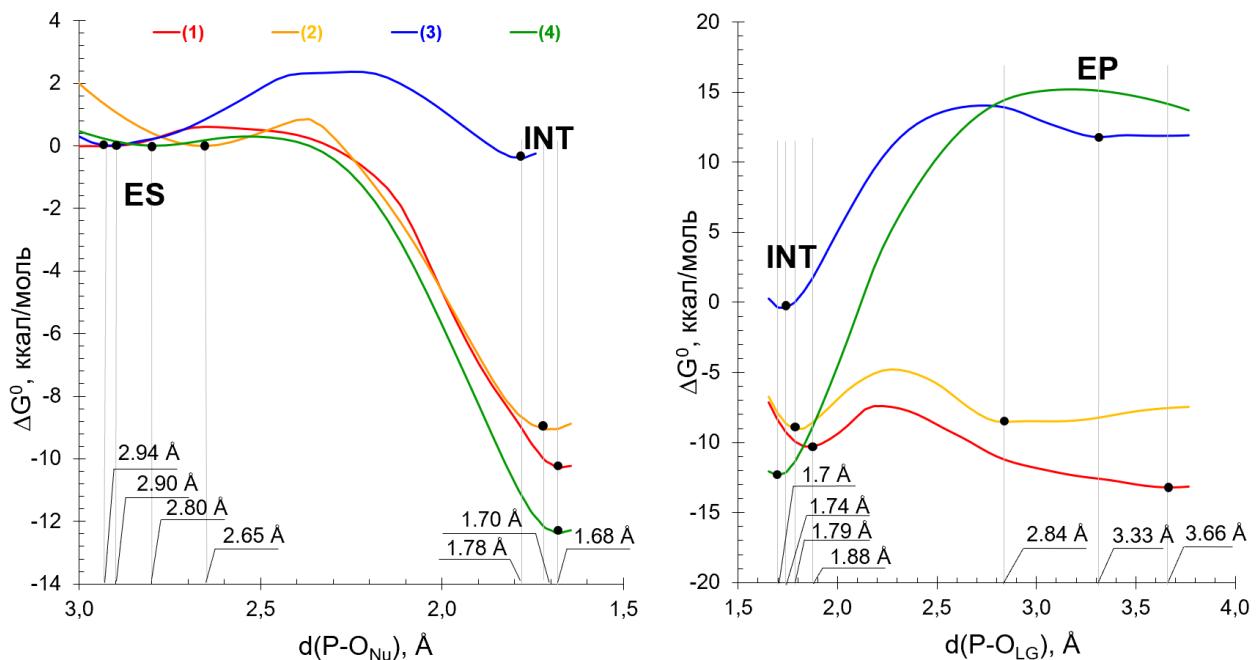


Рисунок 4.3.4. Профили энергии Гиббса для первой (слева) и второй (справа) стадий реакции гидролиза в активном центре кобальтосодержащей фосфотриэстеразы Pd-PTE. Черными точками отмечены стационарные состояния и указаны соответствующие значения координат реакции ($d(P-O_{Nu})$ для первой стадии и $d(P-O_{LG})$ для второй стадии)

4.4. Сравнение ключевых межатомных расстояний в фермент-субстратном комплексе параоксона в активном центре Pd-PTE, содержащей катионы цинка

В связи с тем, что механизм гидролиза параоксона в активном центре Pd-PTE, содержащей цинк, наиболее изучен, было проведено сравнение ключевых межатомных расстояний в структуре фермент-субстратного комплекса с другими имеющимися теоретическими исследованиями [54,56,58–60] (Таблица 4.4.1). Для этого была выбрана структура, отвечающая минимуму энергии Гиббса и проведена КМ/ММ оптимизация. Наиболее сильные различия наблюдаются для значений длины связи Р–О_{Nu}. В нашей модели расстояние нуклеофильной атаки составляет 2,65 Å, тогда как в других моделях оно превышает 3 Å. Что вероятно связано с особенностями пространственной ориентации гидроксид-аниона. В модели данного исследования наблюдается водородная связь между атомом водорода гидроксид-аниона и карбоксилатом аспарагиновой кислоты Asp301, что наблюдается и в двух других работах [54,59]. Во всех этих моделях наблюдается перенос протона с гидроксид-аниона на Asp301, а в тех работах, где нет этой водородной связи, перенос протона в ходе реакции не происходит [56,58,60].

Таблица 4.4.1. Ключевые межатомные расстояния в фермент-субстратном комплексе цинкосодержащей Pd-PTE и параоксона (субстрат (2))

	[59]	[60]	[58]	[56]	[54]	Данное исследование
Перенос протона	да	нет	нет	нет	да	да
P – O_{Nu}	3,42	$3,6 \pm 0,0$	$3,82 \pm 0,13$	$3,40 \pm 0,04$	3,2	2,65
H_{Nu} – O_{Asp301}	1,79	$2,4 \pm 0,7$		$3,96 \pm 0,38$	1,9	1,83
Zn_α – O_{Nu}	2,00	$2,1 \pm 0,1$	$2,00 \pm 0,03$	$1,97 \pm 0,05$		1,93
Zn_β – O_{Nu}	1,99	$2,1 \pm 0,1$	$2,00 \pm 0,03$	$4,41 \pm 0,15$		1,98
Zn_β – OG	2,24	$3,8 \pm 0,3$	$2,03 \pm 0,01$	$2,21 \pm 0,09$		2,17
P – O_{LG}		$1,6 \pm 0,0$	$1,70 \pm 0,04$	$1,66 \pm 0,03$		1,65
Zn_α – O_{Asp301}	2,14		$2,01 \pm 0,04$	$2,11 \pm 0,07$		2,12
Zn_α – O_{Lys169}		$2,4 \pm 0,4$	$2,01 \pm 0,03$	$5,12 \pm 0,20$		2,16
Zn_β – O_{Lys169}		$2,1 \pm 0,1$	$1,99 \pm 0,04$	$2,26 \pm 0,09$		1,98
Zn_α – Zn_β		$3,5 \pm 0,1$	3,71	$5,77 \pm 0,14$		3,39

4.5. Особенности геометрии и электронной плотности промежуточного интермедиата реакции гидролиза органофосфатов в активном центре Pd-PTE

Было проведено сравнение динамического поведения состояний интермедиатов (INT) для систем с рассматриваемыми субстратами и катионами кобальта и цинка в активном центре Pd-PTE. Для этого рассматривались расстояния между атомами фосфора и кислородами нуклеофила и уходящей группы, $d(P-O_{Nu})$ и $d(P-O_{LG})$ соответственно (Рисунок 4.5.1). Сравнение субстратов с одинаковыми заместителями, но различающихся уходящей группой (субстраты (1) и (3)) показало, что для органофосфата с хорошей уходящей группой расстояние $d(P-O_{LG})$ больше, чем нуклеофильная атака, а для органофосфата с плохой уходящей группой, наоборот, $d(P-O_{LG})$ значительно короче. Причем, эти же результаты наблюдаются и для систем с теми же субстратами, но в активном центре Pd-PTE, содержащей катионы цинка (Рисунок 4.5.2). Аналогичные распределения были построены и для субстратов (2) и (4). Видно, что как и для геометрий фермент-субстратных комплексов и комплексов фермент-продукт, обсуждаемых ранее, для субстратов с меньшими боковыми заместителями характерны более короткие расстояния нуклеофильной атаки в состоянии INT даже для субстрата с плохой уходящей группой (4). Ключевое расстояние разываемой связи зависит от лабильности уходящих групп. Видно, что для соединений (3) и (4) с плохими уходящими группами $d(P-O_{LG})$ составляет около 1,7 Å, тогда как для соединений (1) и (2) с хорошими уходящими группами это значение значительно больше, 1,9 и 1,8 Å соответственно. Таким образом, можно сделать вывод, что в состоянии интермедиата разываемая связь имеет большую тенденцию к разрыву в субстратах с хорошими уходящими группами.

Кроме того, были проанализированы карты лапласиана электронной плотности (Рисунок 4.5.3), рассчитанные в плоскости атомов фосфора и кислородов уходящей группы и нуклеофила. Для всех четырех органофосфатов были получены два типа карт: для наиболее вероятных структур (расстояния $d(P-O_{LG})$ и $d(P-O_{Nu})$ отвечают максимумам на распределениях на рисунке 4.5.1) и для структур, где расстояния $d(P-O_{LG})$ и $d(P-O_{Nu})$ почти одинаковые, 1,75 Å и 1,74 Å соответственно. Для субстратов с хорошей уходящей группой (соединения (1) и (2)) в наиболее вероятных структурах интермедиатов наблюдается деконцентрация электронной плотности на $P-O_{LG}$ связи, а для субстратов с

плохой уходящей группой (соединения (3) и (4)) в области разываемой связи, напротив, наблюдается концентрация электронной плотности, что указывает на стабильность связи.

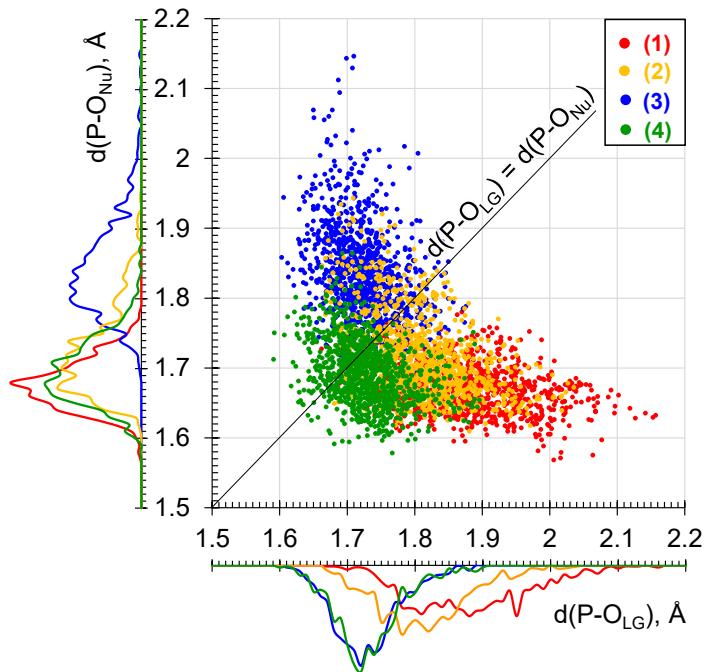


Рисунок 4.5.1. Распределение длин связей $d(P-O_{Nu})$ и $d(P-O_{LG})$ в КМ/ММ-МД траекториях для интермедиатов реакции субстратов с хорошими уходящими группами ((1) – красный цвет, (2) – оранжевый цвет) и с плохими уходящими группами ((3) – синий цвет, (4) – зеленый цвет) в активном центре кобальтосодержащей фосфотриэстеразы Pd-PTE

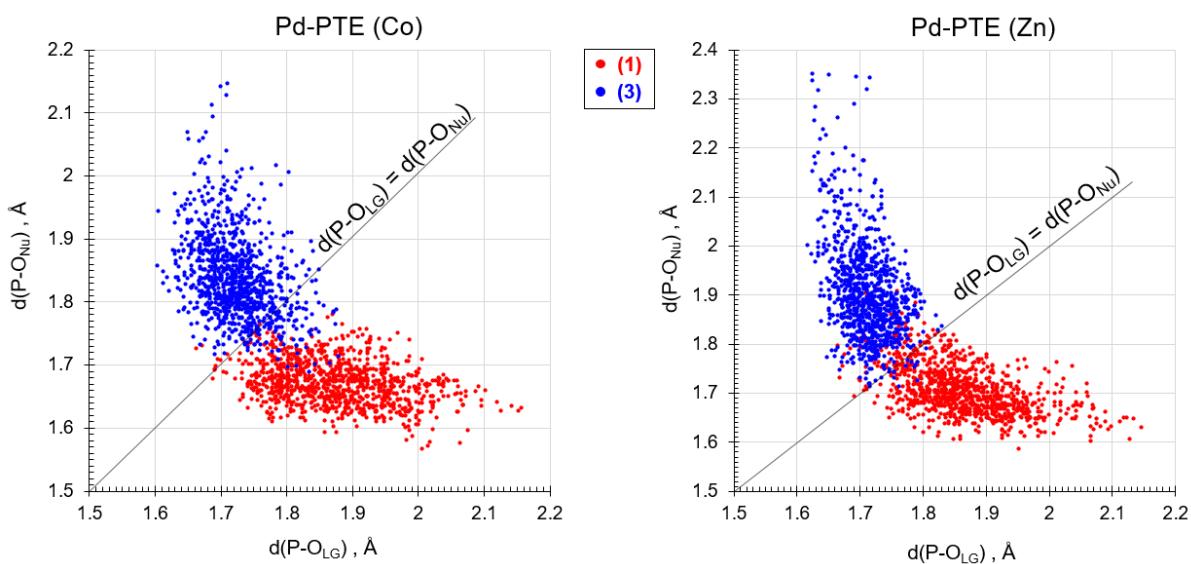


Рисунок 4.5.2. Сравнение распределений длин связей $d(P-O_{Nu})$ и $d(P-O_{LG})$ в КМ/ММ-МД траекториях для интермедиатов реакции субстратов с хорошей уходящей группой ((1) – красный цвет) и с плохой уходящей группой ((3) – синий цвет) в активном центре кобальтосодержащей (слева) и цинкосодержащей (справа) фосфотриэстеразы Pd-PTE

Лабильность уходящей группы влияет на свойства разываемой связи даже для систем с близкими геометрическими параметрами. Для субстратов с хорошими уходящими группами наблюдается узкая область концентрации электронной плотности, что указывает на то, что связь довольно слабая и ее легко разорвать. Тогда как 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-PTE, содержащей катионы цинка[178].

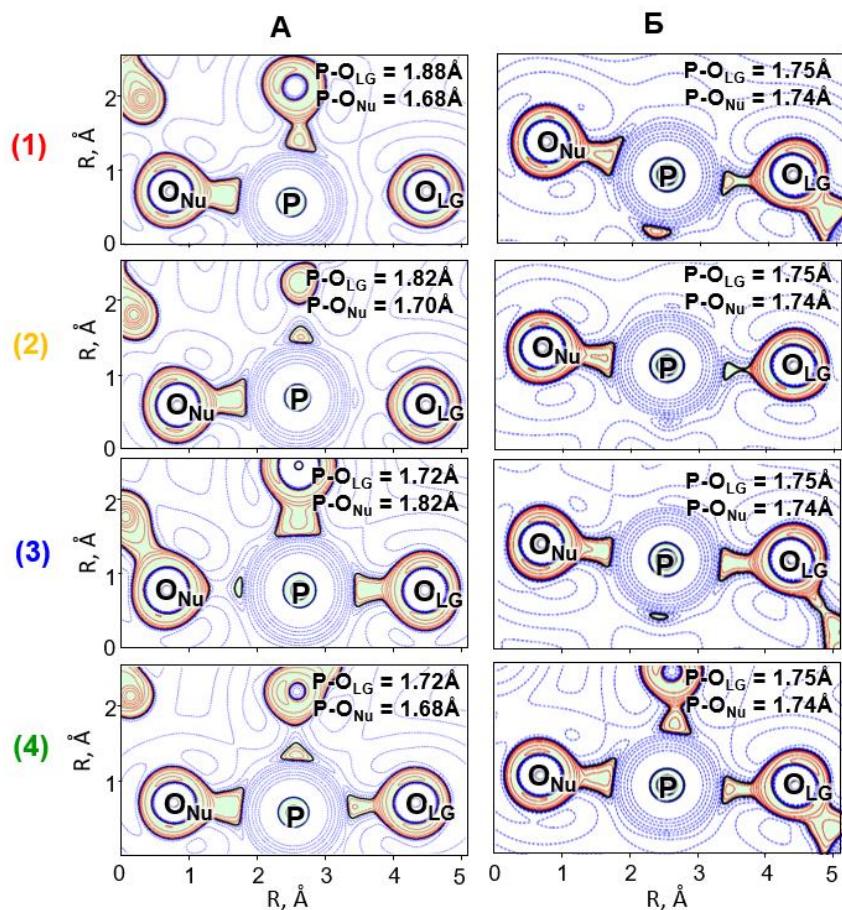


Рисунок 4.5.3. Карты лапласиана электронной плотности, рассчитанные в плоскости атомов фосфора (P) и кислородов нуклеофила (O_{Nu}) и уходящей группы (O_{LG}): контурные линии соответствуют значениям $\pm(2;4;8)\cdot10^n$ а.е., $-2 \leq n \leq 1$, синие пунктирные контурные линии обозначают области пониженной 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 $d(P-O_{LG}) = 1,75 \text{ \AA}$ и $d(P-O_{Nu}) = 1,74 \text{ \AA}$

Глава 5. Фосфорилирование субстрата SP20 в активном центре протеинкиназы А

Результаты, представленные в данной главе, изложены в работе [190]³.

5.1. Подготовка модельной системы и протоколы расчетов

Кристаллическая структура протеинкиназы А (РКА) и пептида SP20 в качестве субстрата с разрешением 2,15 Å (PDB ID: 4IAC [191]) была использована в качестве начального приближения для координат тяжелых атомов. В связи с тем, что в кристаллографической структуре вместо АТФ присутствует его негидролизуемый аналог аденоzin-5'-[β,γ-метилен]трифосфат (АСР), была проведена замена β,γ-мостиковых атомов углерода на атомы кислорода. Для сохранения активной конфигурации каталитической субъединицы фосфорилированное состояние некоторых аминокислотных остатков (pSer139, pThr197 и pSer338) было сохранено. Атомы водорода добавлялись в структуру в программе Reduce [163], так чтобы протонированные формы аминокислот соответствовали pH равному 7. Протонированные состояния аминокислотных остатков гистидина определялись в зависимости от локального окружения, чтобы обеспечить максимальное количество водородных связей. Таким образом, все аминокислотные остатки гистидина, кроме His87 оказались в нейтральной форме. Полученный комплекс фермента, субстрата и АТФ был сольватирован молекулами воды, так чтобы расстояние от атомов белка до границы параллелепипедной ячейки составляло не менее 10 Å. Для достижения нейтрального общего заряда системы были добавлены четыре хлорид-аниона. Подготовка полноатомной модели, а также последующий анализ и визуализация структур проводились в программном пакете VMD [164].

³ При описании данной главы диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2-2.5 Положение о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

Мулашкина Т. И., Леонова М. С., Хренова М. Г. Конформационная динамика фермент-субстратного комплекса протеинкиназы А с псевдосубстратом SP20 и аденоzinтрифосфатом // Биомедицинская химия. — 2024. — Т. 70, № 6. — С. 421–427. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Мулашкиной Т.И. составил 85%

Во всех представленных расчетах для молекулярно-механического описания системы использовались: силовое поле CHARMM [166,181,182] для фермента и субстрата SP20, CGenFF [181,182] для молекулы АТФ и модель TIP3P [169] для описания молекул воды.

Все молекулярно-динамические расчеты проводились в *NPT*-ансамбле при давлении в 1 атм и температуре 298 К, которые поддерживались постоянными с помощью баростата Нозе-Гувера [173] и термостата Ланжевена [129] соответственно. Шаг интегрирования составлял 1 фс.

Классическое молекулярно-динамическое моделирование проводилось в два этапа. На первом этапе была проведена релаксация сольватной оболочки при фиксированных атомах фермента, АТФ и субстрата в течении 1 нс. Далее была проведена серия из четырех молекулярно-динамических моделей по 250 нс для изучения конформационной динамики фермент-субстратного комплекса. Таким образом, для последующего анализа суммарно было получено 40000 кадров МД-траекторий.

Для изучения возможных конформаций фермент-субстратного комплекса была проведена иерархическая кластеризация МД-траекторий с помощью инструмента TTClust [192]. Кластеризация проводилась по молекулярным фрагментам, непосредственно участвующих в реакции, а именно АТФ и аминокислотному остатку серина субстрата SP20 (Ser_{SP20}), а также аминокислотному остатку аспарагиновой кислоты Asp166. Для этого было проведено выравнивание траектории, полученной объединением МД-траекторий предыдущего этапа, по основной цепи белка и рассчитано RMSD между парами кадров для выбранных молекулярных фрагментов. Для расчета матриц связей использовался алгоритм Уорда [193].

Дальнейшие расчеты проводились с использованием комбинированного метода квантовой механики/молекулярной механики. Квантовая подсистема (Рисунок 5.1.1), включала в себя два катиона магния, боковые цепи остатков Asp166, Asn171, Asp184 фермента, фосфатный хвост АТФ, остатки Lys72, Lys168 фермента, остатки субстрата SP20 Ser621, Ala620, а также молекулы воды в координационной сфере магния и в ближайшем окружении АТФ. Квантовая часть описывалась теорией функционала электронной плотности Кона-Шэма (ТФП) с использованием гибридного функционала PBE0 [110] с дисперсионной поправкой D3 [170] и базисного набора 6-31G**. На границе

квантово-механической и молекулярно-механической подсистемах использовались аддитивная схема с электростатическим внедрением и водородные link-атомы.

Для изучения динамического поведения фермент-субстратного комплекса и получения распределения длины разрываемой связи было проведено молекулярно-динамическое моделирование с КМ/ММ потенциалами в течении 5 пс. Кроме того, для расчета лапласиана вдоль линии разрываемой связи была проведена КМ/ММ оптимизация.

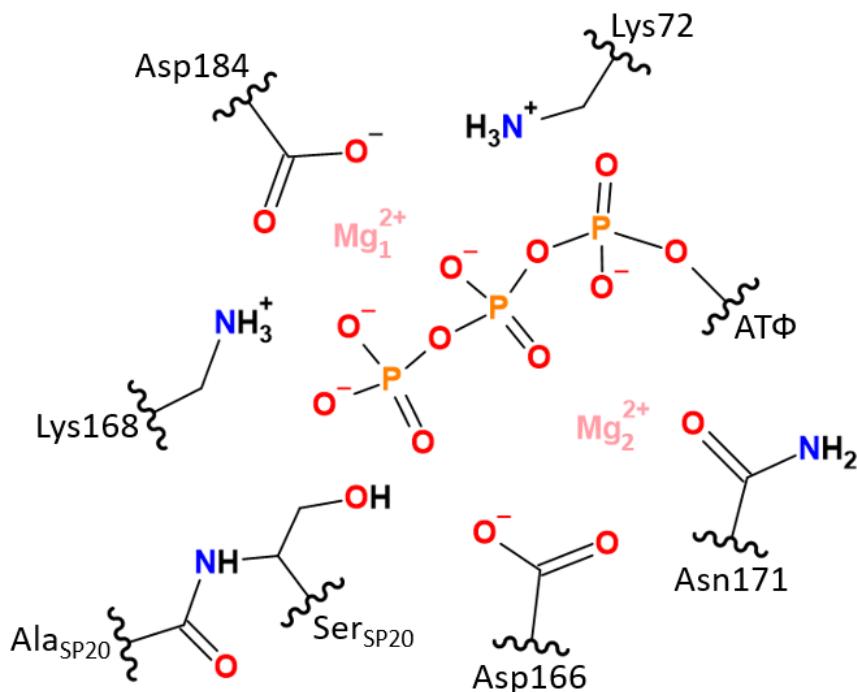


Рисунок 5.1.1. Квантовая подсистема, используемая в КМ/ММ моделировании

Механизм реакции фосфорилирования в активном центре РКА определялся из КМ/ММ-МД расчетов с наложением смещающего потенциала методом зонтичной выборки [131]. В качестве координаты реакции использовалась разность межатомных расстояний между атомом фосфора и кислородами АТФ и серина субстрата SP20. В зависимости от изучаемой конформации координата реакции была разбита на 10 и 8 окон, в интервале от -1,3 до 1,4 Å с шагом 0,3 Å и от -1,6 до 1,6 Å с шагом 0,4 Å соответственно. В области переходного состояния окна выбирались чаще с шагом 0,1 Å. Силовая константа гармонического потенциала составляла 40 ккал/моль/Å² во всех областях, кроме области переходного состояния, где она составила 80 ккал/моль/Å².

Кроме того, была изучена возможность второй стадии реакции, включающей в себя перенос протона с аспарагиновой кислоты Asp166 к фосфорилиированному серину субстрата. В этом случае координата реакции задавалась как разность межатомных расстояний между протоном аспарагиновой кислоты Asp166 и кислородами аспарагиновой кислоты Asp166 и фосфорилированного серина субстрата. В качестве акцептора протона были рассмотрены два кислорода фосфорилированного серина субстрата. Координата реакции рассматривалась в диапазоне от -2,0 до 1,0 Å и разбивалась на 8 окон с шагом 0,4 Å вдоль всей координаты и 0,1 Å в области переходного состояния. Константы жесткости гармонического потенциала были выбраны аналогично предыдущему этапу.

Для получения профиля энергии Гиббса результаты КМ/ММ-МД моделирования с добавлением смещающего потенциала методом зонтичной выборки использовались метод анализа взвешенных гистограмм WHAM [132] и зонтичное интегрирование [133].

Молекулярно-динамические расчеты выполнялись в программном пакете NAMD [165]. Для КМ/ММ-МД моделей использовалась комбинация программ NAMD для МД расчетов и TeraChem [172] для квантово-механических расчетов, взаимодействие которых обеспечивалось специальным интерфейсом [171]. Оптимизации КМ/ММ проводились с использованием программы Tcl ChemShell [174] с эффективным оптимизатором DL-FIND [175] и квантово-химическим программным пакетом TURBOMOLE [176]. Лапласиан электронной плотности рассчитывался в программе Multiwfn [177].

5.2. Конформационная динамика фермент-субстратного комплекса протеинкиназы А с псевдосубстратом SP20

В результате иерархической кластеризации в программе TTClust было получено четыре кластера, отвечающие различным конформациям АТФ и остатков Asp166 и SerSP20 со средним RMSD равным 0,79. Сравнение репрезентативных кадров (Рисунок 5.2.1Б) показало, что данные кластеры отличаются в основном конформацией серина субстрата SerSP20, а именно положением гидроксильной группы. Наиболее часто реализуемая

конформация в ходе динамики K_2 , другие конформации реализуются с равной частотой (Рисунок 5.2.1В). Наименьшее RMSD между кластерами (Рисунок 5.2.1А) наблюдается для пар K_2 и K_3 , K_2 и K_4 , 0,60 и 0,47 соответственно.

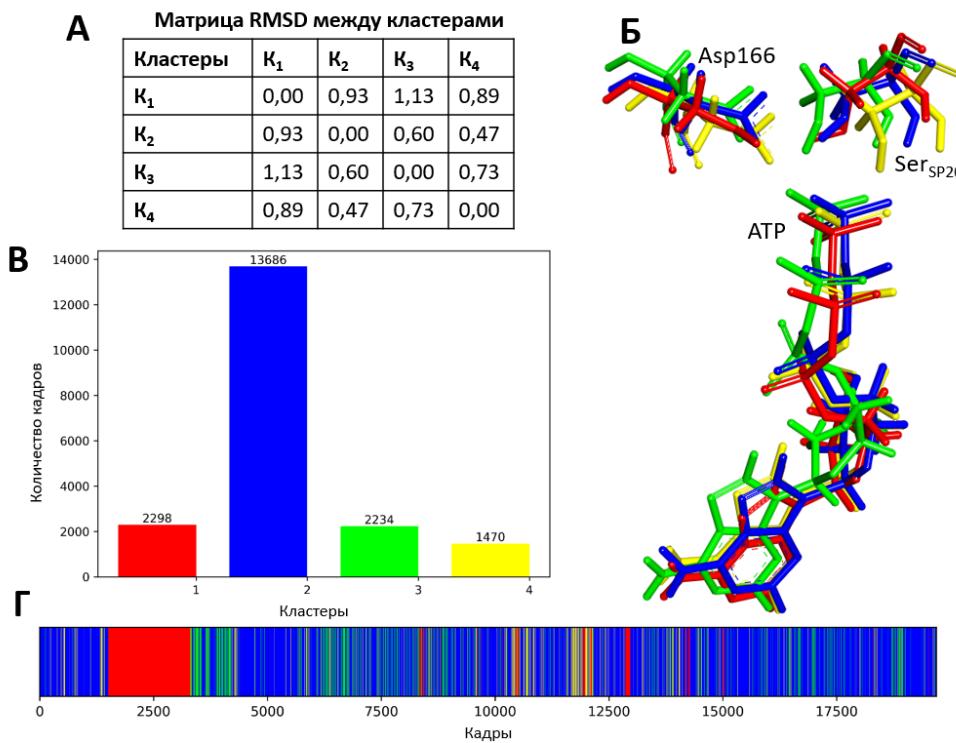


Рисунок 5.2.1. А) RMSD между кластерами K_1 , K_2 , K_3 и K_4 ; Б) Наложение репрезентативных кадров кластеров; В) Гистограмма количества кадров внутри кластеров; Г) Развёртка по кластерам вдоль молекулярно-динамической траектории

Сравнение репрезентативных структур (Рисунок 5.2.2) кластеров K_2 и K_3 показало, что это действительно очень похожие структуры. В данных конформациях серина субстрата 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 между протоном гидроксильной группы Ser_{SP20} и кислородом γ -фосфатной группы АТФ ($H(Ser_{SP20})-O3G(ATF)$) и расстояние нуклеофильной атаки меньше в случае конформации K_3 , чем в K_2 . Однако, в структуре K_3 неподелённая пара нуклеофильного кислорода не ориентирована на атом фосфора, что может затруднить протекание реакции. Таким образом, из этих двух конформаций реакционноспособной может быть конформация K_2 . В конформации K_4 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 K_1 , в которой наблюдается небольшое расстояние нуклеофильной атаки ($3,38 \text{ \AA}$), а гидроксильная группа $\text{Ser}_{\text{SP}20}$ образует водородную связь с остатком аспарагиновой кислоты Asp166, который в свою очередь является хорошим акцептором протона.

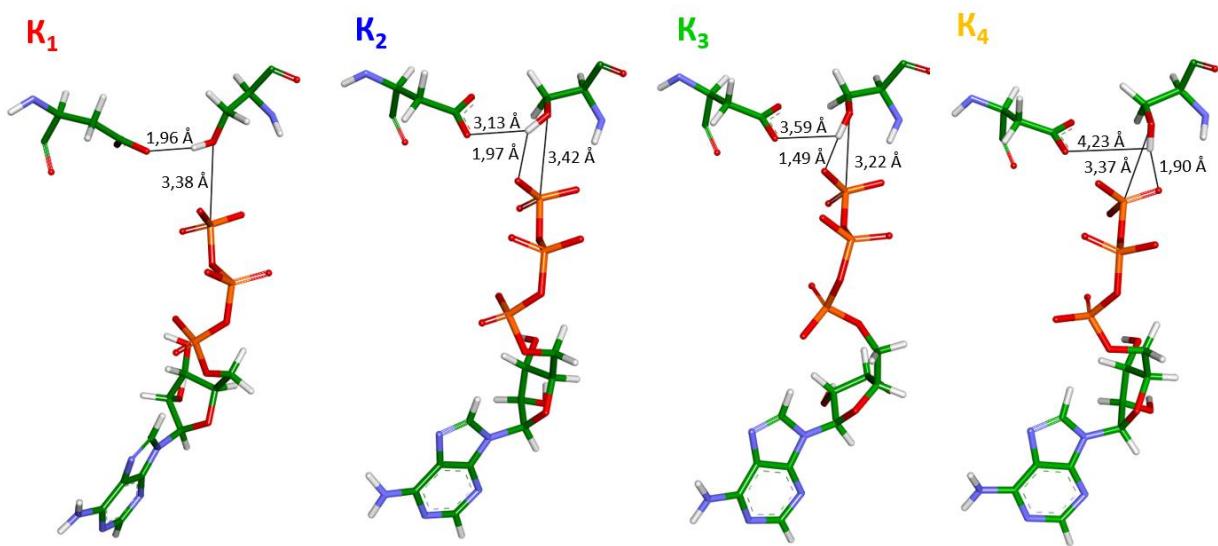


Рисунок 5.2.2. Репрезентативные кадры кластеров, отвечающие различным конформациям АТФ и остатков Asp166 и $\text{Ser}_{\text{SP}20}$

Кроме того, ключевые расстояния были проанализированы не только для репрезентативных структур, но и для всех кадров каждого кластера. Были определены средние значения и доверительные интервалы расстояний между водородом гидроксильной группы остатка серина субстрата и кислородами γ -фосфата АТФ и остатка аспарагиновой кислоты Asp166 (Таблица 5.2.1).

Таблица 5.2.1. Сравнение средних значений и стандартных отклонений для межатомных расстояний между протоном гидроксильной группы серина субстрата SP20 ($\text{H}(\text{Ser}_{\text{SP}20})$) и кислородами остатка Asp166 ($\text{O}(\text{Asp}166)$) и фосфатного хвоста ($\text{O}3\text{G}(\text{ATF})$ и $\text{O}1\text{G}(\text{ATF})$), полученные для каждого кластера (K_1 , K_2 , K_3 и K_4)

	K_1	K_2	K_3	K_4
$\text{H}(\text{Ser}_{\text{SP}20})-\text{O}(\text{Asp}166), \text{\AA}$	$2,45 \pm 1,08$	$3,75 \pm 0,30$	$3,64 \pm 0,35$	$4,08 \pm 0,56$
$\text{H}(\text{Ser}_{\text{SP}20})-\text{O}3\text{G}(\text{ATF}), \text{\AA}$	$3,01 \pm 0,26$	$1,76 \pm 0,21$	$1,71 \pm 0,14$	$2,07 \pm 0,40$
$\text{H}(\text{Ser}_{\text{SP}20})-\text{O}1\text{G}(\text{ATF}), \text{\AA}$	$3,23 \pm 0,90$	$2,60 \pm 0,30$	$2,70 \pm 0,24$	$2,33 \pm 0,50$

Из полученных данных видно, что среднее значение расстояний $H(Ser_{SP20})$ -O(Asp166) для K_1 и $H(Ser_{SP20})$ -O1G(ATФ) для K_4 сильно больше, чем эти значения в репрезентативных структурах, а также наблюдаются большие доверительные интервалы. Кроме того, анализ других ключевых расстояний показал, что набор структур из кластера K_4 представляет собой структуры похожие на репрезентативные структуры других кластеров.

На рисунке 5.2.3 представлены распределения ключевых расстояний. По этим данным видно, что наиболее сильное отклонение от репрезентативной структуры наблюдается для кластера K_4 . Репрезентативной структуре отвечает только 35% кадров из кластера. Также частые отклонения от репрезентативной структуры наблюдаются для K_1 (63% кадров соответствует репрезентативной структуре). Для K_2 и K_3 наблюдается наибольшее соответствие кадров кластера репрезентативной структуре.

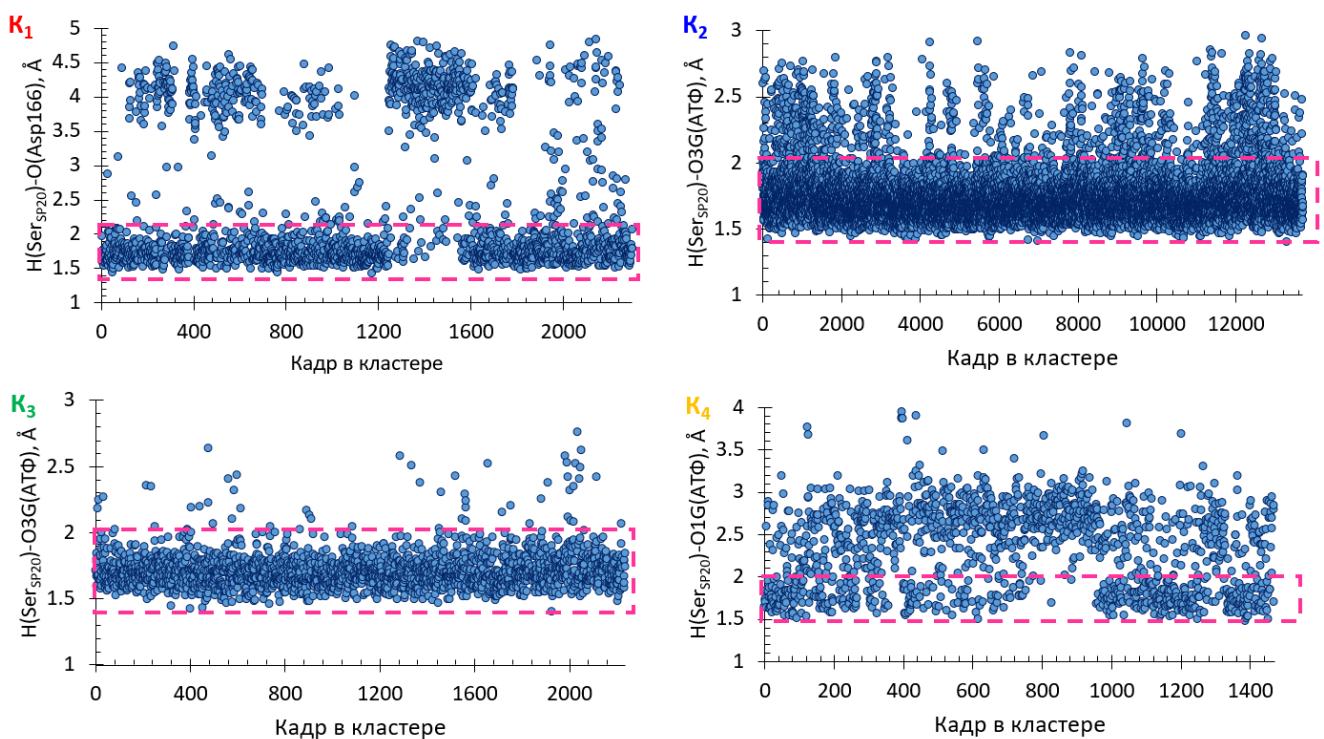


Рисунок 5.2.3. Распределения расстояний между протоном гидроксо-группы серина субстрата SP20 ($H(Ser_{SP20})$) и кислородами остатка Asp166 ($O(Asp166)$) и фосфатного хвоста ($O3G(AT\Phi)$) и $O1G(AT\Phi)$), полученные для каждого кластера (K_1 , K_2 , K_3 и K_4)

Кроме того, был проведен анализ и других геометрических параметров. Распределение (Рисунок 5.2.4) двугранного угла OG-CB-CA-N серина субстрата ($\Delta Y(Ser_{SP20})$) от расстояния $H(Ser_{SP20})$ -O(Asp166) показало, что конформацию K_1 можно

чётко отделить от других. На распределении состоянию K_1 отвечает область со значениями $\Delta\gamma(Ser_{SP20})$ от -20° до -90° и $H(Ser_{SP20})$ -O(Asp166) от 1,4 до 2,5 Å. При этом различить конформации K_2 , K_3 и K_4 на основании двугранного угла OG-CB-CA-N серина субстрата и межатомных расстояний между водородом серина и кислородами остатка Asp166 и АТФ не удалось, так как $\Delta\gamma(Ser_{SP20})$ в этих конформациях может принимать значения как от 20° до 90° , так и от -40° до -90° . Причем, для конформаций K_2 и K_3 ($K_{2/3}$) наиболее характерными являются положительные значения $\Delta\gamma(Ser_{SP20})$, тогда как для K_4 в равной степени наблюдаются и положительные и отрицательные значения $\Delta\gamma(Ser_{SP20})$. Попытки найти другие геометрические критерии, которые позволили бы отделить все конформации, дали схожие результаты.

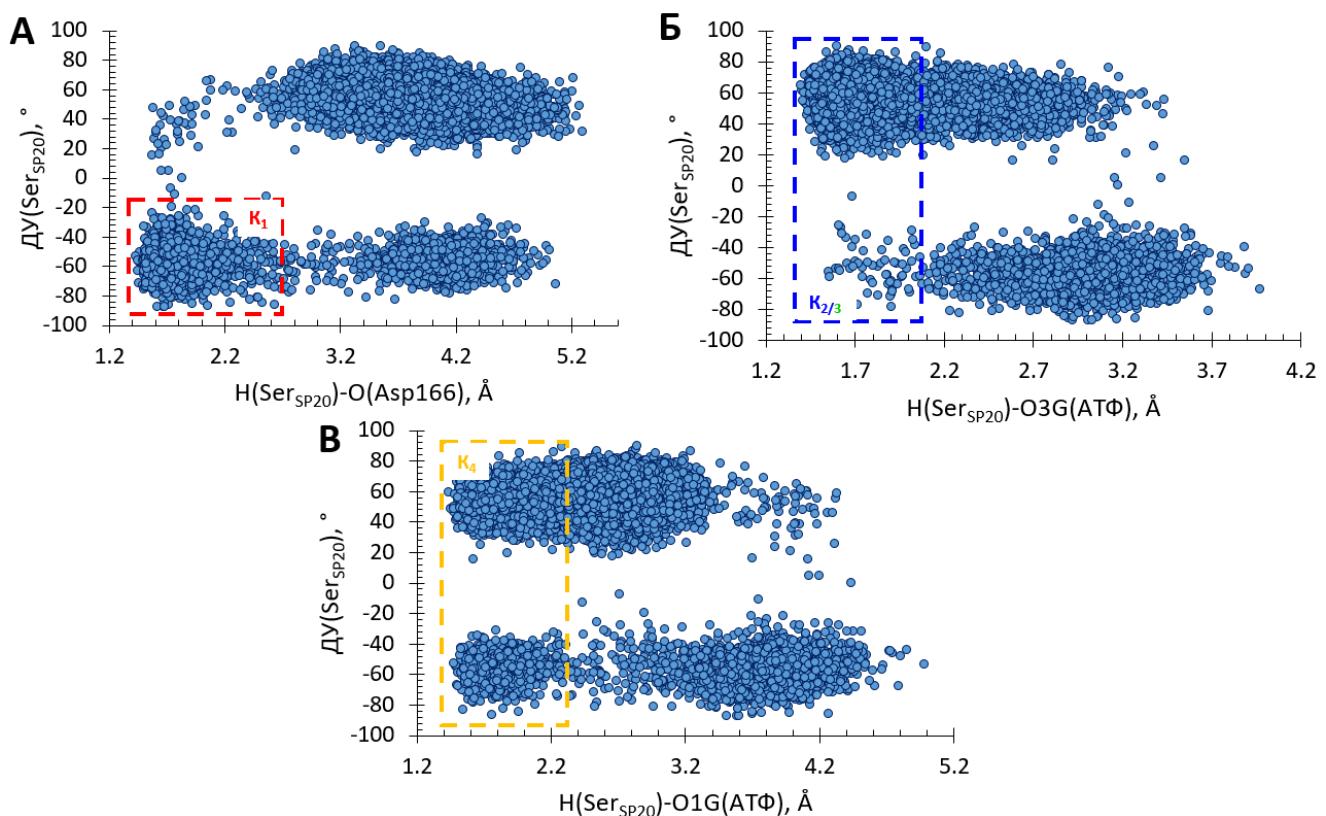


Рисунок 5.2.4. Значения двугранного угла OG-CB-CA-N серина субстрата ($\Delta\gamma(Ser_{SP20})$) и расстояний между атомом водорода гидроксильной группы и кислородами Asp166 (А) и γ -фосфатной группы АТФ (Б и В). K_1 , $K_{2/3}$ (конформации K_2 и K_3) и K_4 – конформации фермент-субстратного комплекса РКА

Таким образом, были определены две возможные реакционноспособные конформации K_1 и K_2 , различающиеся возможным акцептором протона. В связи с этим, дальнейшие расчеты проводились для этих двух конформаций.

5.3. Применение критериев определения типа механизма

Предложенные в главе 3 критерии определения типа механизма ферментативного разрыва Р-О связи, а именно распределение длины разрываемой связи и лапласиан вдоль разрываемой связи, были использованы для определения типа механизма реакции фосфорилирования в активном центре РКА. Для этого из полученной КМ/ММ-МД траектории были определены значения межатомного расстояния между атомом фосфора и кислородом АТР (P-O_{LG}), а также был рассчитан лапласиан вдоль разрываемой связи P-O_{LG} в стационарной точке фермент-субстратного комплекса, определенной с помощью КМ/ММ оптимизации. Эти критерии были применены к обоим изучаемым конформациям K₁ и K₂.

Из полученных распределений разрываемой связи (Рисунок 5.3.1), видно, что длина связи варьируется в широком диапазоне значений для обоих конформаций K₁ и K₂ от 1,62 до 1,95 Å и от 1,58 до 1,85 Å соответственно, при этом средние значения P-O_{LG} составляют $1,72 \pm 0,04$ Å для K₁ и $1,73 \pm 0,05$ Å для K₂. Такой вид распределения разрываемой связи отвечает диссоциативному типу реакции разрыва Р-О связи.

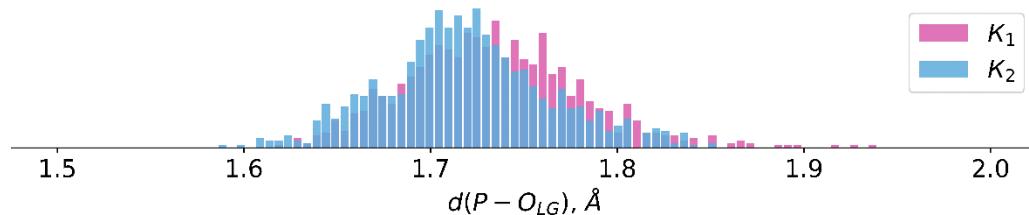


Рисунок 5.3.1. Распределения длины разрываемой связи P-O_{LG} в фермент-субстратном комплексе в двух конформациях (K₁ и K₂)

На рисунке 5.3.2 представлены полученные лапласианы вдоль линии разрываемой связи для K₁ и K₂. В обеих конформациях в области, где P-O_{LG} принимает значения от 0,6 до 1,4 Å, наблюдается положительное значение $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$. Деконцентрация электронной плотности в области разрываемой связи также указывает на диссоциативный механизм разрыва Р-О связи.

Таким образом, использование критериев определения типа механизма, позволяет предположить, что реакция фосфорилирования в активном центре протеинкиназы А

протекает по диссоциативному механизму с образованием промежуточного метаfosфата. Причем это не зависит от конформации серина субстрата в активном центре фермента.

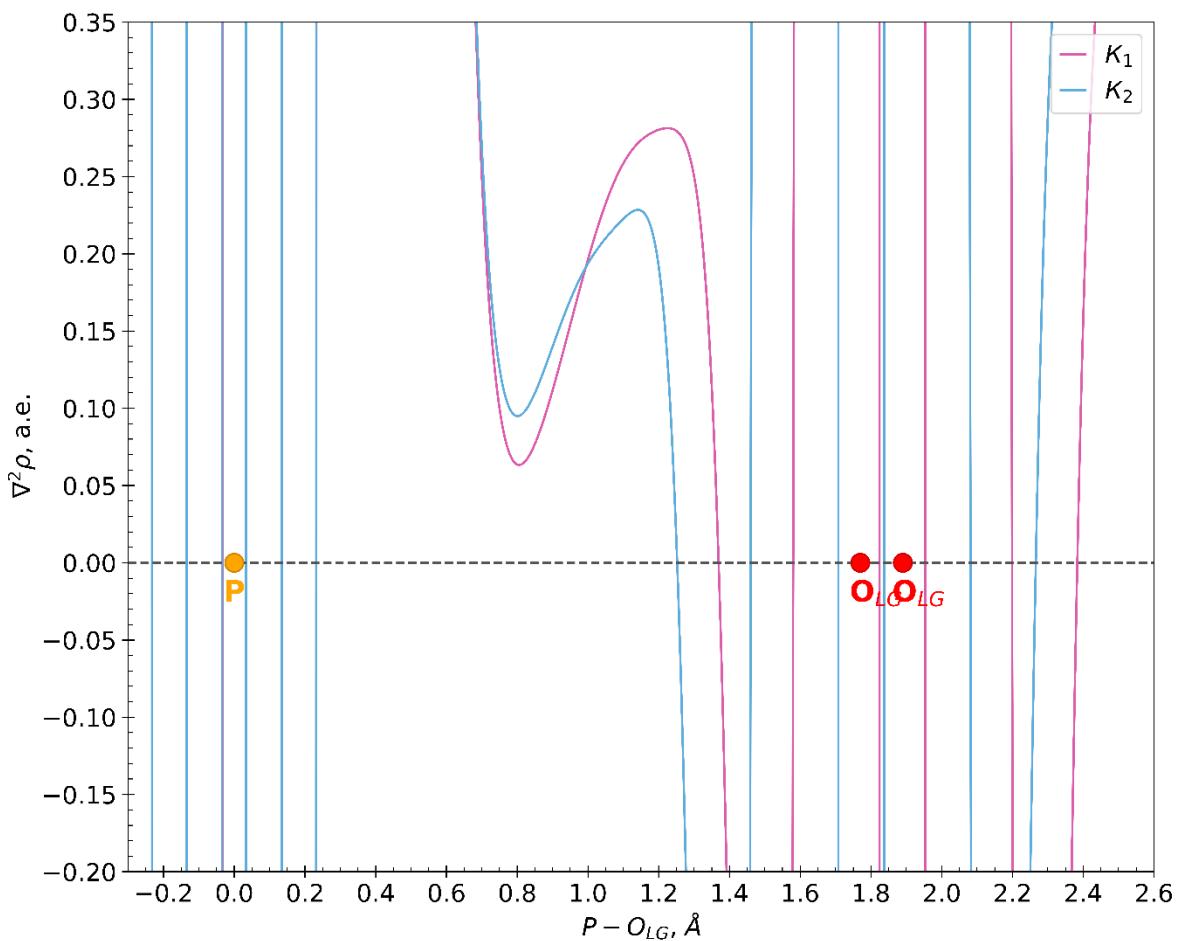


Рисунок 5.3.2. Лапласиан электронной плотности вдоль линии разрыва связи P-O_{LG} в активном центре протеинкиназы А в фермент-субстратном комплексе

5.4. Механизм реакции фосфорилирования субстрата SP20 в активном центре РКА и профили энергии Гиббса

По результатам КМ/ММ-МД моделирования с добавлением смещающего потенциала методом зонтичной выборки были получены профили энергии Гиббса для двух конформаций (Рисунок 5.4.1). Для конформаций K₁ и K₂ энергетические барьеры составляют 11,5 ккал/моль и 11,3 ккал/моль соответственно. На профиле энергии Гиббса для конформации K₂ наблюдается перегиб в области координаты реакции от -1,5 до

-1,1 Å. Видно, что реакция фосфорилирования SP20 в активном центре РКА протекает согласованно, то есть без образования промежуточного интермедиата.

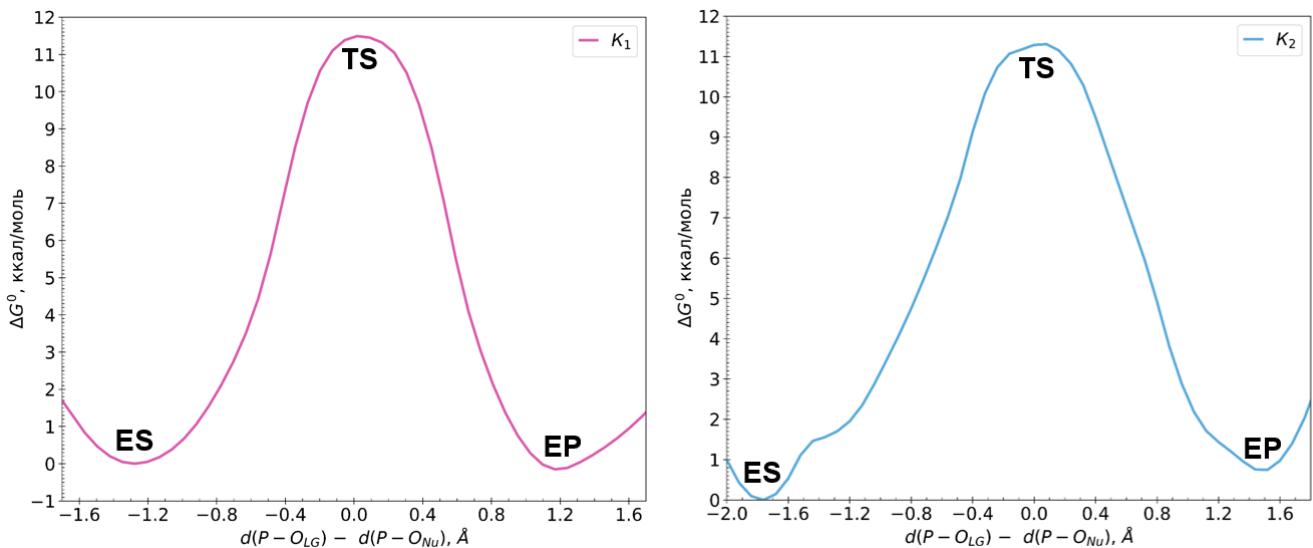


Рисунок 5.4.1. Профили энергии Гиббса для двух конформаций K_1 и K_2 . Здесь и далее на рисунках: ES – фермент-субстратный комплекс, TS – переходное состояние, EP – комплекс фермент-продукт

На рисунке 5.4.2 представлены молекулярные структуры, отвечающие областям стационарных точек на профилях энергии Гиббса. Таким образом, было установлено, что область перегиба на профилях энергии Гиббса отвечает конформационному переходу из K_2 в K_1 , то есть развороту серина субстрата из конформации, в которой водород гидроксильной группы образует водородную связь с кислородом фосфата (K_2), в конформацию, где наблюдается водородная связь между водородом гидроксильной группы и кислородом аспарагиновой кислоты Asp166 (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 (SersP20). В ходе реакции образуется переходное состояние, которому отвечает метаfosфат и аденоzinифосфат (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 (pSersP20) и АДФ. Данный механизм реакции согласуется с предположением в разделе 5.4 о том, что

реакция фосфорилирования SP20 в активном центре РКА протекает по диссоциативному механизму.

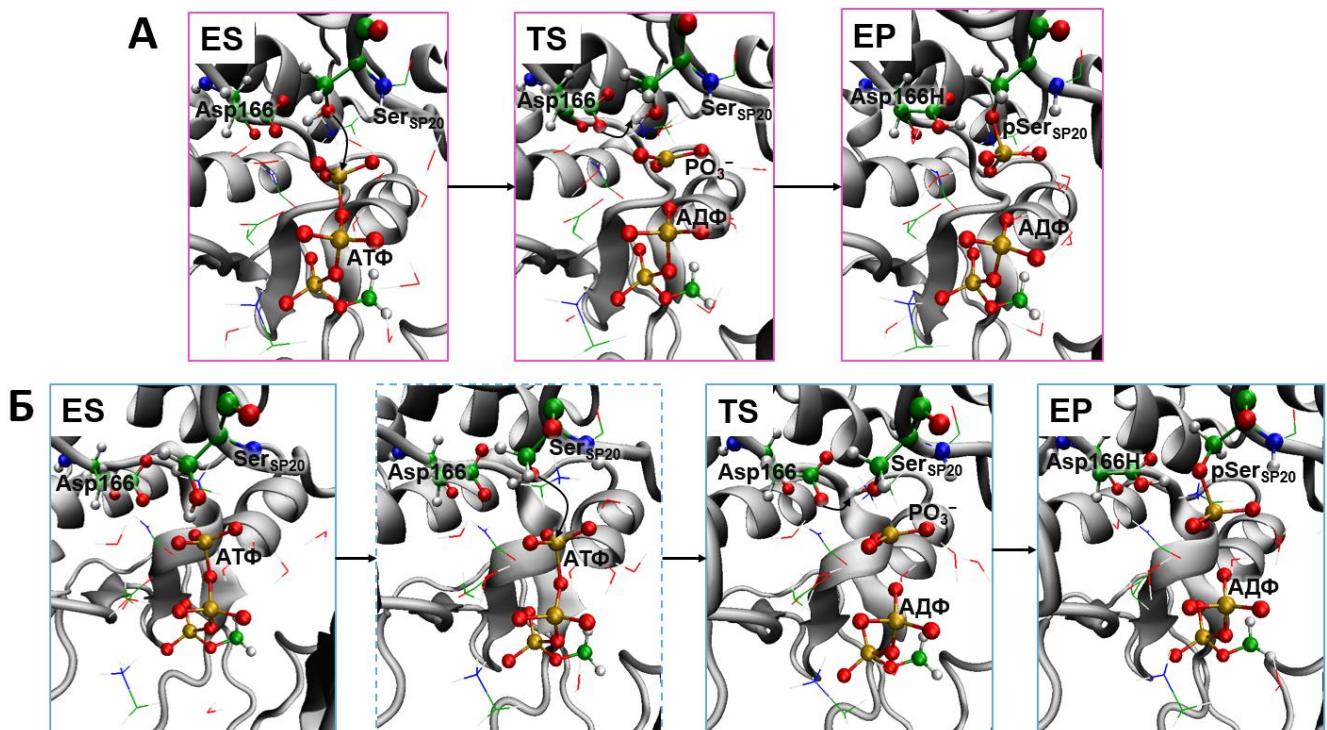


Рисунок 5.4.2. Механизм реакции фосфорилирования в активном центре протеинкиназы РКА для конформаций K₁ и K₂. Цвета: углерод – зеленый, кислород – красный, азот – синий, фосфор – оранжевый, водород – белый. Обозначения: Asp166H – протонированная аспарагиновая кислота, pSer_{SP20} – фосфорилированный субстрат серина SP20

В настоящее время 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. Константа скорости реакции фосфорилирования составляет 400 с⁻¹ для кемптида и 170 с⁻¹ для PKS [88], что по теории активированного комплекса соответствует энергетическим барьерам 13,95 и 14,17 ккал/моль соответственно, что на 2,5–2,7 ккал/моль больше, чем получено нами. Кроме того, рассчитанный энергетический барьер можно сравнить с другими расчетными работами. В ряде исследований показано, что диссоциативный механизм энергетически предпочтительнее, чем ассоциативный, а барьеры составляют 9,5 ккал/моль [90] или 13,7 ккал/моль [194] для реакции фосфорилирования субстрата SP20, что отличается на 2 ккал/моль от полученных результатов. Различие в 2 ккал/моль лежит в рамках

погрешности используемого для расчета метода и статистической ошибки обработки результатов метода зонтичной выборки.

Кроме того, была изучена возможная вторая стадия реакции, а именно перенос протона с аспарагиновой кислоты Asp166 на кислород фосфорилированного серина. Так как акцептором протона могут выступать разные кислороды фосфорилированного серина, был рассмотрен перенос протона на два ближайшие кислорода, которые обозначены как O_1 и O_2 . Полученные профили энергии Гиббса представлены на рисунке 5.4.3. На одном из энергетических профилей наблюдается плато в области координаты реакции от -0,9 до -0,6 Å (EP_2), а на другом минимум энергии при координате реакции -0,6 Å (EP_2). Из анализа молекулярных структур (Рисунок 5.4.4), отвечающих этой области, следует, что переход в эти стационарные состояния отвечает за поворот фосфатной группы фосфорилированного серина к остатку Asp166, что способствует дальнейшему переносу протона. Однако, полученный протонированный фосфорилированный серин субстрата в процессе переноса протона выше по энергии, чем непротонированный фосфорилированный серин на 3,3 или 3,8 ккал/моль. Таким образом, перенос протона с Asp166 на фосфорилированный серин маловероятен.

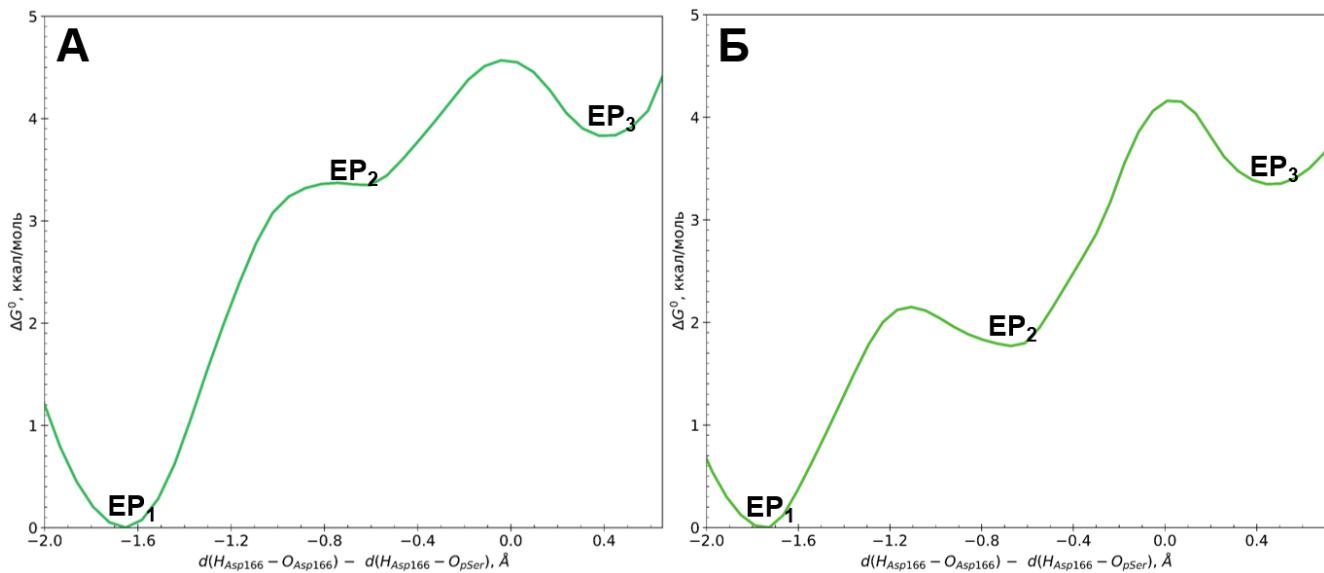


Рисунок 5.4.3. Профили энергии Гиббса для переноса протона от протонированной аспарагиновой кислоты Asp166 к атомам кислорода O_1 (А) и O_2 (Б) фосфорилированного серина

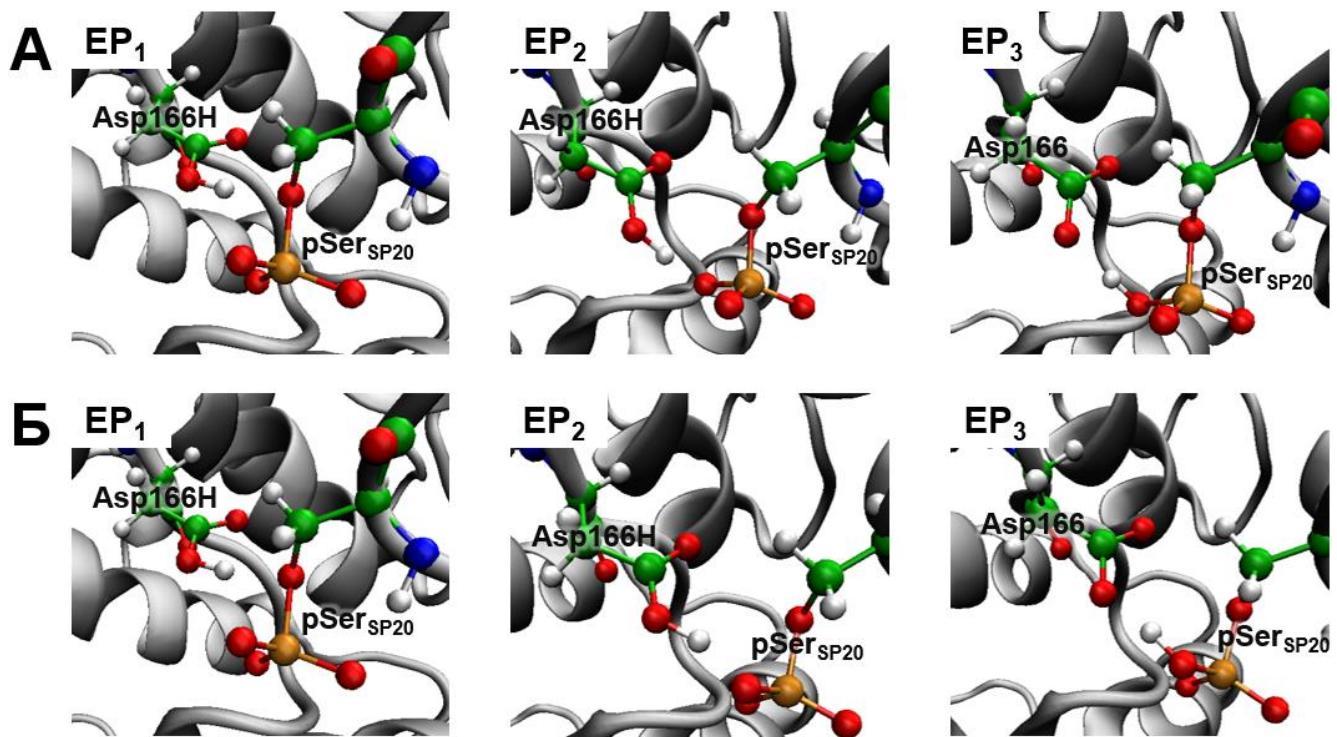


Рисунок 5.4.4. Механизм переноса протона от протонированной аспарагиновой кислоты Asp166 к атомам кислорода O₁ (А) и O₂ (Б) фосфорилированного серина

Глава 6. Фосфорилирование ДНК в процессе обратной транскрипции в активном центре ORF2p

Результаты, представленные в данной главе, изложены в работе [195]⁴.

6.1. Подготовка модельной системы и протоколы расчетов

В качестве начальных координат тяжелых атомов использовались кристаллографические данные (PDB ID: 8C8J [96]) тройного комплекса ORF2p с нуклеотидом тимидинтрифосфатом (dTTP) и праймером-матрицей гетеродуплекса РНК₁₂-ДНК₉. Кристаллическая структура не содержит неразрешенные части белка, а именно домены EN и CTD, части доменов «башни» и «запястья». Отсутствующие фрагменты были восстановлены по данным криоэлектронной микроскопии доступных в репозитории ModelArchive (<https://www.modelarchive.org/doi/10.5452/ma-9wovj> (дата обращения 22 декабря 2024 г.)). Атомы водорода были добавлены с помощью программы Reduce [163] для воспроизведения состояний протонирования аминокислот при нейтральном pH. Таким образом, были назначены следующие состояния протонирования боковых цепей: положительно заряженные остатки аргинина и лизина, отрицательно заряженные остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот и нейтральные остатки гистидина. Боковая цепь остатка цистеин Cys661 находилась в окисленной S-оксиформе. Полученный тройной комплекс был сольватирован молекулами воды таким образом, что расстояние от атомов белка до границы ячейки в виде прямоугольного параллелепипеда составляло не менее 10 Å. Для нейтрализации заряда системы были добавлены 58 хлорид-анионов. Подготовка полноатомной модели, а также ее визуализация и последующий анализ структур осуществляли в программном пакете VMD [164].

⁴ При описании данной главы диссертации использованы следующие, выполненные соискателем в соавторстве публикации, в которых, согласно п.п. 2.2-2.5 Положение о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, отражены основные результаты, положения и выводы исследований:

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. Подготовка полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Мулашкиной Т.И. составил 65%

Для молекулярно-механического описания системы во всех расчетах использовали: силовое поле CHARMM [166–168] для белка, молекул ДНК, РНК и dTTP и модель TIP3P [169] для молекул воды.

Все молекулярно-динамические расчеты проводились в *NPT*-ансамбле при температуре 300 К и давлении 1 атм. Температура и давление поддерживались в системе с помощью термостата Ланжевена [129] и баростата Нозе-Гувера [173] соответственно. Шаг интегрирования составлял 1 фс.

Классическое молекулярно-динамическое моделирование проводилось в три этапа. На первом этапе выполнялась релаксация сольватной оболочки при фиксированных атомах белка, ДНК, РНК и dTTP в течении 2 нс. Далее было проведено МД-моделирование в течение 5 нс с гармоническим ограничивающим потенциалом на Сα атомах белка и атомах фосфора ДНК и РНК с константой жесткости 0,1 ккал/моль/Å². После релаксации системы было проведено молекулярно-динамическое моделирование длительностью 500 нс.

В дальнейших расчетах для описания модельной системы использовался комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики. Квантовая подсистема, представленная на рисунке 6.1.1, включала в себя катион магния Mg²⁺, боковые цепи остатков аспарагиновых кислот Asp600, Asp702, Asp703, части основной цепи аминокислотных остатков Ala601 и Glu602, нуклеотид тимидинтрифосфат, часть ДНК (включающая азотистое основание и рибозу до связи между углеродами C4' и C5'). Таким образом, в КМ-часть вошел 91 атом, а заряд составил -5. Для описания КМ-подсистемы использовали метод теории функционала плотности Кона-Шэма с гибридным функционалом PBE0 [110] с дисперсионной поправкой D3 [170] и базис 6-31G**. На границе квантово-механической и молекулярно-механической подсистем использовались аддитивная схема с электростатическим внедрением и водородные link-атомы.

Из результатов КМ/ММ-МД моделирования было получено распределение длины разрываемой связи P-O_{LG}, а также выбрана структура для последующей КМ/ММ оптимизации геометрии фермент-субстратного комплекса.

Для определения механизма реакции удлинения ДНК в активном центре ORF2p проводилось КМ/ММ-МД моделирование с наложением смещающего потенциала методом зонтичной выборки [131]. В качестве координаты реакции использовали разность межатомных расстояний между атомом фосфора и кислородами уходящей группы ($P-O_{LG}$) и гидроксильной группы при 3' конце ДНК ($P-O_{Nu}$). Координата реакции была разбита на 15 окон и определялась в диапазоне от -1,7 до 2,6 Å. Силовые константы гармонического потенциала в областях переходных состояний составляли 80 и 120 ккал/моль/Å², а вблизи областей локальных минимумов – 40 ккал/моль/Å². Длина траектории в каждом окне составила около 5 пс. Для получения профиля энергии Гиббса результаты моделирования обрабатывались методами анализа взвешенных гистограмм WHAM [132] и зонтичного интегрирования UI [133].

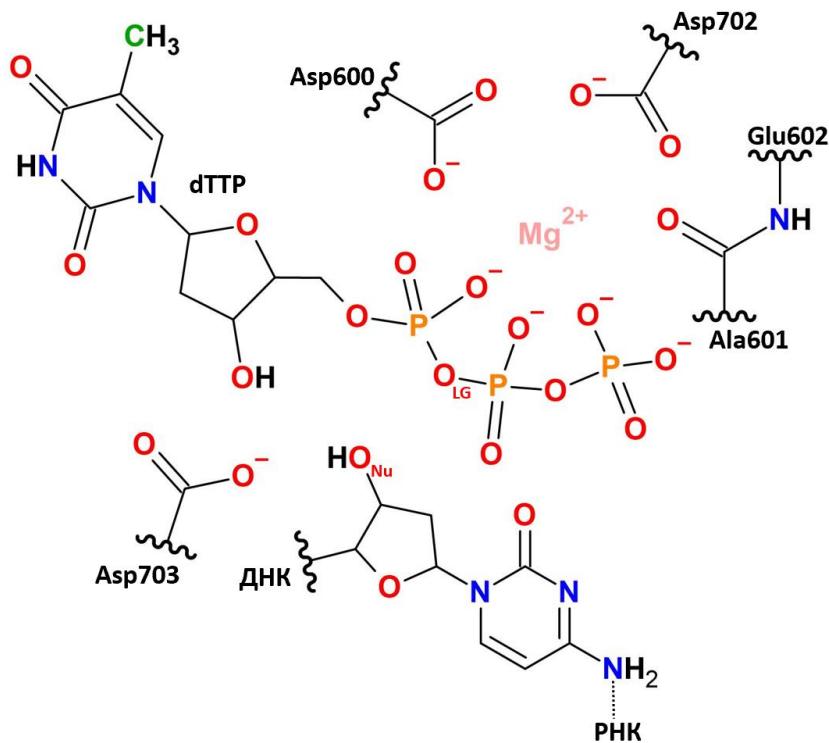


Рисунок 6.1.1. Квантовая подсистема, включающая в себя катион магния, боковые цепи остатков аспарагиновых кислот Asp600, Asp702 и Asp703, части основной цепи аминокислотных остатков Ala601, Glu602, нуклеотид dTTP и часть ДНК. Пунктирной линией обозначена водородная связь с РНК

Молекулярно-динамические расчеты выполнялись в программном пакете NAMD [165]. Для КМ/ММ-МД моделей использовалась комбинация программ NAMD для МД расчетов и TeraChem [172] для квантово-механических расчетов,

взаимодействие которых обеспечивалось специальным интерфейсом [171]. Оптимизации КМ/ММ проводились с использованием программы Tcl ChemShell [174] с эффективным оптимизатором DL-FIND [175] и квантово-химическим программным пакетом TURBOMOLE [176]. Лапласиан электронной плотности рассчитывался в программе Multiwfn [177].

6.2. Применение критериев определения типа механизма

Для определения типа механизма, по которому протекает реакция присоединения нуклеотида тимидинтрифосфата к цепи ДНК в активном центре ORF2p, применялись критерии, предложенные в главе 3. На рисунке 6.2.1 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.

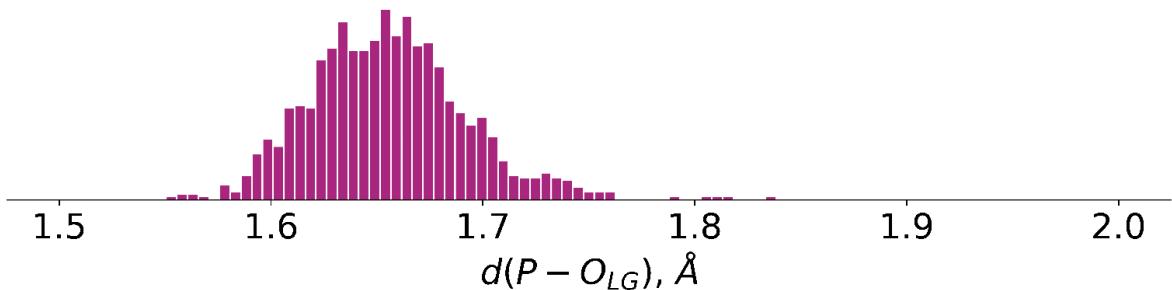


Рисунок 6.2.1. Распределение длины разрываемой связи $P-O_{LG}$ тимидинтрифосфата в фермент-субстратном комплексе ORF2p

Кроме того, был рассчитан лапласиан электронной плотности вдоль разрываемой связи $P-O_{LG}$ (Рисунок 6.2.2). 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. Таким образом, на неоднозначный результат применения в качестве критерия определения типа

механизма распределения длины разрываемой связи, лапласиан вдоль линии связи позволил отнести данную реакцию к диссоциативному типу.

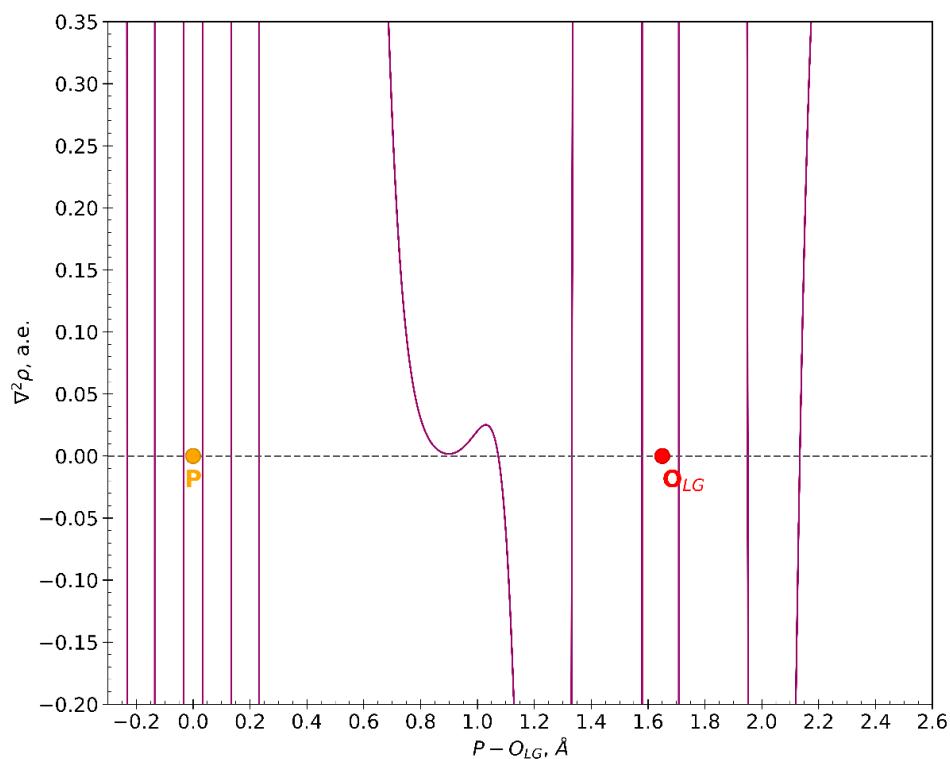


Рисунок 6.2.2. Лапласиан электронной плотности вдоль линии разрыва связи Р-О_{LG} тимидинтрифосфата в активном центре ORF2p в фермент-субстратном комплексе

6.3. Механизм реакции удлинения цепи ДНК в активном центре ORF2p и профили энергии Гиббса

Профиль энергии Гиббса реакции удлинения ДНК, полученный с помощью КМ/ММ-МД моделирования и применения метода зонтичной выборки, представлен на рисунке 6.3.1. Видно, что 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 s^{-1} . При этом продукты реакции стабилизированы относительно реагентов на $7,8 \pm 1,2$ ккал/моль. Экспериментальных данных по кинетике этой реакции в ORF2p нет, однако можно сравнить полученные результаты с данными о других ферментах обратной транскриптазы (ОТ). Эубактериальная ОТ MarathonRT (MRT) работает со скоростью 25 s^{-1} [196], константа скорости включения

нуклеозидтрифосфата dNTP в ВИЧ-1 варьируется от 0,1 до 35 с⁻¹ [197] в зависимости от различных факторов.

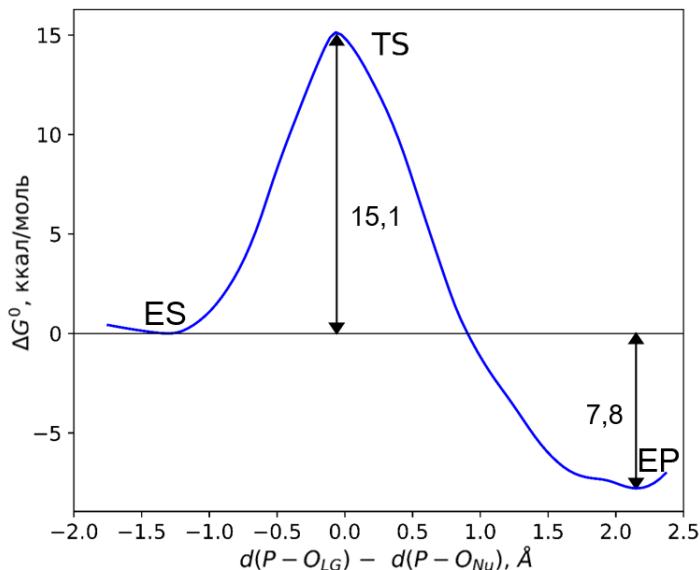


Рисунок 6.3.1. Профиль энергии Гиббса реакции присоединения нуклеотида dTTP к ДНК в активном центре ORF2p. Здесь и далее: ES – фермент-субстратный комплекс, TS – переходное состояние, EP – комплекс фермент-продукт

Молекулярные структуры, отвечающие областям стационарных точек на профиле энергии Гиббса приведены на рисунке 6.3.2. Данная реакция инициируется нуклеофильной атакой атома фосфора α -фосфатной группы dTTP атомом О3' гидроксильной группы ДНК (O_{Nu}). Этот процесс сопровождается переносом протона с атома О3' на атом кислорода боковой цепи остатка Asp703. В результате реакции происходит удлинение цепи ДНК (ДНК₉ → ДНК₁₀) и образование пирофосфата.

Кроме того, были проанализированы распределения разрываемой и образующейся связей по молекулярно-динамическим траекториям всех окон (Рисунок 6.3.3). В ходе реакции наблюдается постепенное увеличение межатомного расстояния между атомом фосфора и кислородом уходящей группы ($d(P-O_{LG})$) при уменьшении расстояния нуклеофильной атаки ($d(P-O_{Nu})$). В переходном состоянии средние длины разрываемой и образующейся связей составляют около 1,9 и 2,0 Å соответственно, что по уравнению Полинга отвечает вероятности протекания реакции по ассоциативному механизму равной 0,42. Таким образом, можно сказать, что реакция протекает по согласованному диссоциативному механизму, что согласуется с применёнными критериями определения типа механизма в разделе 6.2.

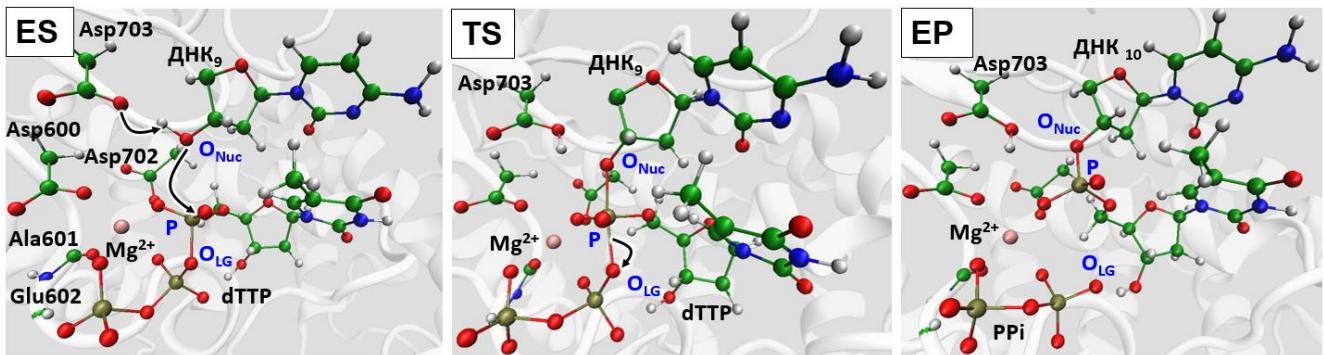


Рисунок 6.3.2. Механизм удлинения цепи ДНК в области обратной транскрипции ORF2p. Структуры отвечают стационарным точкам. Обозначения: dTTP – тимидинтрифосфат, PPi – пирофосфат. Цветовая кодировка: углерод – зеленый, кислород – красный, азот – синий, фосфор – охра, магний – розовый, водород – белый

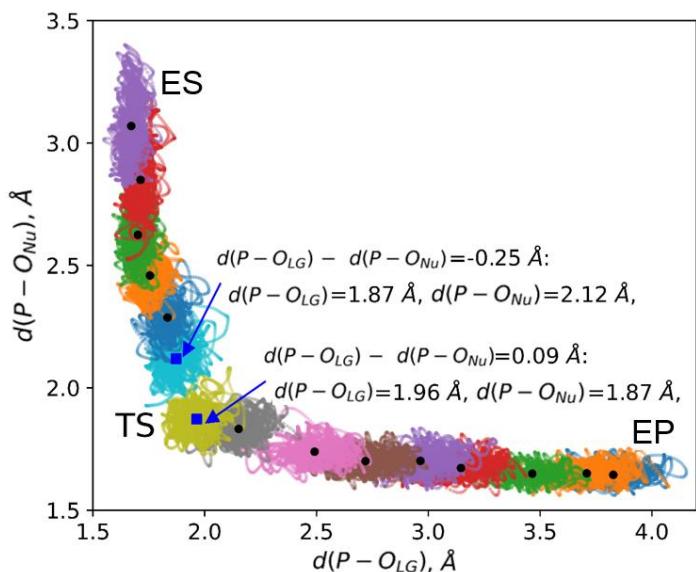


Рисунок 6.3.3. Распределения разываемой ($d(P-O_{LG})$) и образуемой ($d(P-O_{Nu})$) связей в молекулярно-динамических траекториях каждого окна метода зонтичной выборки. Черными точками обозначены средние значения этих двух расстояний в каждом окне, синими квадратами обозначены средние значения этих расстояний в окнах, наиболее близких к области переходного состояния (TS)

Результаты работы, представленные в данной главе, получены в рамках темы «Влияние соединений, обладающих геропротективными свойствами, на единичные биомакромолекулы, модельные объекты и организм человека» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2024-643).

Заключение

Проведено комплексное исследование ферментативных реакций разрыва Р-О связи в четырнадцати различных системах, для которых известны механизмы реакции. Исследования ключевых межатомных расстояний в активном центре ферментов, дескрипторов электронной плотности, рассчитанные в плоскости, вдоль связей и в критических точках связи, а также анализ порядка связи показали, что особенности разрываемой Р-O_{LG} связи определяют механизм реакции. Для реакций, протекающих по диссоциативному механизму, эта связь уже ослаблена и удлинена в фермент-субстратном комплексе, по сравнению с системами, в которых реакция протекает по ассоциативному пути. Кроме того, было показано, что распределение длин связей остается неизменным при изменении функционала ТФП в моделировании. А также, было показано, что длина разрываемой связи скорее определяется белковым окружением и не зависит от природы нуклеофила. Предложено использовать лапласиан электронной плотности вдоль разрываемой связи в фермент-субстратном комплексе в качестве бинарного классификатора для различия ассоциативных и диссоциативных механизмов реакций. Данные критерии были использованы для определения типа механизма реакции фосфорилирования в трех аденилаткиназах. Согласно этим критериям, эти реакции протекают по диссоциативному пути. Для валидации этих результатов был рассчитан молекулярный механизм реакции переноса фосфорила в активном центре MtAK, который подтвердил, что реакция относится к диссоциативному типу.

Применение критериев определения типа механизма (распределение длины разрываемой связи и лапласиан вдоль линии разрываемой связи) для реакции гидролиза дибутил-4-нитрофенилфосфата в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE показало, что данная реакция относится к ассоциативному типу. Данный результат нашел подтверждение при молекулярном моделировании механизма реакции гидролиза органофосфатов в активном центре Pd-PTE. Было установлено, что реакция протекает в две стадии. На первой стадии активный центр фермента способствует эффективной нуклеофильной атаке гидроксид-анионом независимо от природы уходящей группы. Второй этап реакции представляет собой разрыв ковалентной связи между атомом фосфора и уходящей группой. Профиль энергии Гиббса второй стадии реакции сильно

зависит от природы уходящей группы. Для органоfosфатов с хорошей уходящей группой разрыв P-O связи протекает с низким энергетическим барьером и стабилизацией продуктов реакции. Тогда как для органоfosфатов с плохими уходящими группами реакция не происходит. Низкие энергетические барьеры для субстратов с хорошими уходящими группами показывают, что лимитирующей стадией реакции является высвобождение продукта, независимо от катионов металлов в активном центре фермента. Кроме того, был проведен анализ динамического поведения и карт лапласiana электронной плотности промежуточного интермедиата, который показал, что в органоfosфатах с хорошей уходящей группой в промежуточном состоянии связь P-O_{LG} слабая и готова к дальнейшему разрыву, в отличие от органоfosфатов с плохой уходящей группой.

Анализ молекулярно-динамических траекторий фермент-субстратного комплекса протеинкиназы А с АТФ и субстратом SP20 в активном центре методами иерархической кластеризации позволил обнаружить четыре различные конформации АТФ и остатков Asp166 и Ser_{SP20} в активном центре РКА, участвующих в ферментативной реакции. Подробный анализ этих конформаций позволил выбрать две потенциальные реакционноспособные конформации фермент-субстратного комплекса, отличающиеся возможным акцептором протона гидроксильной группы серина. Далее все исследования проводились именно для этих двух конформаций. Применение критериев определения типа механизма показало, что реакция фосфорилирования протекает по диссоциативному типу. Данные результаты подтверждаются молекулярным моделированием реакции фосфорилирования субстрата SP20 в активном центре РКА. Было установлено, что реакция протекает согласовано через образование переходного состояния, которому отвечает метаfosфат. Кроме того, сравнение профилей энергии Гиббса и молекулярных структур, отвечающих стационарным точкам, показало, что одна из конформаций не является реакционноспособной, для которой наблюдается конформационный переход в реакционноспособную конформацию. А также, было установлено, что акцептором протона является аспарагиновая кислота Asp166, и последующий перенос протона к фосфорилированному серину энергетически невыгоден.

Применение критериев определения типа механизма к реакции присоединения нуклеотида dTTP к ДНК в активном центре ORF2p позволило предположить, что данная

реакция протекает по диссоциативному пути. Данный результат подтверждается молекулярным моделированием с применением метода зонтичной выборки. Было установлено, что удлинение цепи ДНК происходит в одну стадию и сопровождается переносом протона с О3' гидроксильной группы ДНК на аспаргиновую кислоту Asp703. Энергетический барьер данной реакции составил $15,1 \pm 0,8$ ккал/моль, что по теории активированного комплекса соответствует константе скорости 60 c^{-1} . Прямое сравнение с экспериментальными данными о кинетики обратной транскриптазы ORF2p невозможно, полученный результат находит согласование с экспериментальными данными о кинетике реакции в других ферментах с функцией обратной транскриптазы.

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 профиль 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 метаfosфата 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 сокращений и условных обозначений

$\nabla^2 \rho(\mathbf{r})$ – лапласиан электронной плотности

ACP – аденоzin-5'-[β,γ -метилен]трифосфат

$A_N + D_N$ – ассоциативный ступенчатый механизм

$A_N D_N$ – ассоциативный согласованный механизм

BFGS, L-BFGS, L-BFGS-B – алгоритм Брайдена-Флетчера-Гольфарба-Шанно и его разновидности

bPAC – фотоактивированная бактериальная аденилаткиназа

CC, CCSD, CCSD(T) – метод связанных кластеров и их варианты

CI, CIS, CISD, MCSCF, CASSCF – методы конфигурационного взаимодействия

CTD – карбоксиконцевой домен ORF2p

$D_N + A_N$ – диссоциативный ступенчатый механизм

$D_N A_N$ – диссоциативный согласованный механизм

dTTP – нуклеотид тимидинтрифосфат

ELF – функция локализации электронов

EN – N-концевая эндонуклеаза

EP – комплекс фермент-продукт

ES – фермент-субстратный комплекс

EVB – метод эмпирической валентной связи

IBSI – индекс внутренней прочности связи

INT – промежуточный интермедиат

IP20 – пептид-игибитор протеинкиназы А

LBO – порядок связи Лапласа

LFER – линейное соотношение свободной энергии по Брёнстеду

LINE-1 – длинный вставленный ядерный элемент-1

LOL – локализованный орбитальный локатор

mAC – аденилаткиназа млекопитающих

MDD – мевалонатдифосфатдекарбоксилаза

MP2, MP4 – метод теории возмущений Мёллера-Плессета

MRT – эубактериальная обратная транскриптаза MarathonRT

MVK – мевалонаткиназа

NAAG – N-ацетиласпартилглутамат

non-LTR – ретротранспонозы с недлинными концевыми повторами

NPP – нуклеотиддиэфосфотаза/фосфодиэстераза

NPT – изотермически-изобарический ансамбль

NVE – микроканонический ансамбль

NVT – канонический ансамбль

ORF2p – белок открытой рамки считывания 2

PDB ID – protein data bank ID

Pd-PTE – фосфотриэстераза из бактерии *Pseudomonas diminuta*

PKA – протеинкиназа А

PKI – ингибитор протеинкиназы А

PKS – пептидный субстрат протеинкиназы А

PMF – потенциал средней силы

P-O_{LG} – связь между атомом фосфора и кислородом уходящей группы

P-O_{Nu} – расстояние между атомами фосфора и кислорода нуклеофила

pSer_{SP20} – фосфорилированный серин субстрата SP20

QTAIM – теория атомов в молекулах

RHF – ограниченный метод Хартри-Фока

RMSD – среднеквадратичное отклонение положения атомов

SP20 – пептидный субстрат протеинкиназы А

TS – переходное состояние

UHF – неограниченный метод Хартри-Фока

UI – метод зонтичного интегрирования

WHAM – метод взвешенных гистограмм

μ VT – большой канонический ансамбль

АДФ – аденоzinдинифосфат

АМФ – аденоzinмонофосфат

АТФ – аденоzinтрифосфат

АТФазы – аденоzinтрифосфатазы

ГАМК – γ -аминомасляная кислота

ГДФ – гуанозиндинифосфат

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КМ – квантово-механическая

КМ/ММ – квантовая механика/молекулярная механика

КТС – критические точки связи

МД – молекулярная динамика

ОТ – обратная транскриптаза

ППЭ – поверхность потенциальной энергии

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНКаза Н(б) – бактериальная рибонуклеаза Н

РНКаза Н(г) – рибонуклеаза Н человека

РСА – рентгеноструктурный анализ

ТФП – теория функционала электронной плотности Кона-Шэма

ФДЭ – фосфодиэстеразы

ФЕП – фосфоенолпируват

ФОС – фосфороганические соединения

ФТЭ – фосфотриэстераза(ы)

ХФ или HF – метод Хартри-Фока

ЦАМФ – циклический аденоцимонофосфат

ЦНС – центральная нервная система

ЭП – электронная плотность

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ε – эллиптичность электронной плотности

$\rho(\mathbf{r})$ – электронная плотность

Для обозначения аминокислот в составе белков и пептидных субстратов в работе использованы сокращений:

Аланин Ala A

Аргинин Arg R

Аспаргин Asn N

Аспаргиновая кислота Asp D

Валин Val V

Гистидин His H

Глицин Gly G

Глутамин Gln Q

Глутаминовая кислота	Glu	E
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Тирозин	Tyr	Y
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Фенилаланин	Phe	F
Цистеин	Cys	C

Список литературы

1. Lyagin I., Efremenko E. Enzymes, reacting with organophosphorus compounds as detoxifiers: Diversity and functions // International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG, 2021. T. 22, № 4. C. 1–47.
2. Costanzi S., Machado J.H., Mitchell M. Nerve agents: what they are, how they work, how to counter them // ACS Chemistry Neuroscience. American Chemical Society, 2018. T. 9, № 5. C. 873–885.
3. Cleland W.W., Hengge A.C. Enzymatic mechanisms of phosphate and sulfate transfer // Chemistry Reviews. 2006. T. 106, № 8. C. 3252–3278.
4. Kolodiaznyi O.I., Kolodiazhnaya A. Nucleophilic substitution at phosphorus: stereochemistry and mechanisms // Tetrahedron Asymmetry. Elsevier Ltd, 2017. T. 28, № 12. C. 1651–1674.
5. Stec B., Holtz K.M., Kantrowitz E.R. A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions // Journal of Molecular Biology. Academic Press, 2000. T. 299, № 5. C. 1303–1311.
6. Ostanin K., Harms E.H., Stevis P.E., Kuciel R., Zhou M.M., Van Etten R.L. Overexpression, site-directed mutagenesis, and mechanism of Escherichia coli acid phosphatase // Journal of Biological Chemistry. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 1992. T. 267, № 32. C. 22830–22836.
7. Jackson M.D., Denu J.M. Molecular reactions of protein phosphatases - Insights from structure and chemistry // Chemistry Reviews. 2001. T. 101, № 8. C. 2313–2340.
8. Stephenson K., Hoch J. Two-component and phosphorelay signal-transduction systems as therapeutic targets // Current Opinion in Pharmacology. 2002. T. 2, № 5. C. 507–512.
9. Bourne H., Sanders D., McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions // Nature. 1990. T. 348, № 6297. C. 125–132.

10. Ray W.J., Burgner J.W., Post C.B. Characterization of vanadate-based transition-state-analogue complexes of phosphoglucomutase by spectral and NMR techniques // Biochemistry. 1990. T. 29, № 11. C. 2770–2778.
11. Cheek S., Zhang H., Grishin N. V. Sequence and structure classification of kinases // Journal of Molecular Biology. Academic Press, 2002. T. 320, № 4. C. 855–881.
12. Janc J.W., O’leary M.H., Cleland W.W. A kinetic investigation of phosphoenolpyruvate carboxylase from Zea mays // Biochemistry. 1992. T. 31, № 28. C. 6421–6426.
13. Tipton P.A., Cleland W.W. Catalytic mechanism of biotin carboxylase: steady-state kinetic investigations // Biochemistry. 1988. T. 27, № 12. C. 4317–4325.
14. Holden H.M., Thoden J.B., Raushel F.M. Carbamoyl phosphate synthetase: an amazing biochemical odyssey from substrate to product // Cellular and Molecular Life Sciences. 1999. T. 56, № 5. C. 507–522.
15. 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. Elsevier Ltd, 2024. T. 34, № 1. C. 1–7.
16. Jeon Y.H., Heo Y.S., Kim C.M., Hyun Y.L., Lee T.G., Ro S., Cho J.M. Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development // Cellular and Molecular Life Sciences. 2005. T. 62, № 11. C. 1198–1220.
17. Dumas D.P., Caldwell S.R., Wild J.R., Raushel F.M. Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* // Journal of Biological Chemistry. 1989. T. 264, № 33. C. 19659–19665.
18. Scanlan T., Reid R. Evolution in action // Chemistry & Biology. 1995. T. 2, № 2. C. 71–75.
19. Kamerlin S.C.L., Florián J., Warshel A. Associative versus dissociative mechanisms of phosphate monoester hydrolysis: on the interpretation of activation entropies // ChemPhysChem. Wiley-VCH Verlag, 2008. T. 9, № 12. C. 1767–1773.

20. Florián J., Warshel A. Phosphate ester hydrolysis in aqueous solution: associative versus dissociative mechanisms // *Journal of Physical ChemistryB*. 1998. T. 102, № 4. C. 719–734.
21. Aqvist J., Kolmodin K., Florian J., Warshel A. Mechanistic alternatives in phosphate monoester hydrolysis: what conclusions can be drawn from available experimental data? // *Chemistry & Biology*. 1999. T. 6, № 3. C. R71–R80.
22. Klähn M., Rosta E., Warshel A. On the mechanism of hydrolysis of phosphate monoesters dianions in solutions and proteins // *Journal of the American Chemical Society*. 2006. T. 128, № 47. C. 15310–15323.
23. Glennon T.M., Villa J., Warshel A. How does GAP catalyze the GTPase reaction of ras?: A computer simulation study // *Biochemistry*. 2000. T. 39, № 32. C. 9641–9651.
24. Grigorenko B.L., Kots E.D., Nemukhin A. V. Diversity of mechanisms in Ras-GAP catalysis of guanosine triphosphate hydrolysis revealed by molecular modeling // *Organic and Biomolecular Chemistry*. Royal Society of Chemistry, 2019. T. 17, № 19. C. 4879–4891.
25. Khrenova M.G., Grigorenko B. L., Kolomeisky A. B., Nemukhin A. V. Hydrolysis of guanosine triphosphate (GTP) by the Ras·GAP protein complex: reaction mechanism and kinetic scheme // *Journal of Physical Chemistry B*. American Chemical Society, 2015. T. 119, № 40. C. 12838–12845.
26. Plotnikov N. V., Lameira J., Warshel, A. Quantitative exploration of the molecular origin of the activation of GTPase // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013. T. 110, № 51. C. 20509–20514.
27. Lassila J.K., Zalatan J.G., Herschlag D. Biological phosphoryl-transfer reactions: understanding mechanism and catalysis // *Annual Review of Biochemistry*. 2011. T. 80, № 1. C. 669–702.
28. Yu H., Ma L., Yang Y., Cui Q. Mechanochemical coupling in the myosin motor domain. I. Insights from equilibrium active-site simulations // *PLoS Computational Biology*. Public Library of Science, 2007. T. 3, № 2. C. 0199–0213.

29. Okimoto N., Yamanaka K., Ueno J., Hata M., Hoshino T., Tsuda M. Theoretical studies of the ATP hydrolysis mechanism of myosin // Biophysical Journal. Biophysical Society, 2001. T. 81, № 5. C. 2786–2794.
30. Schwarzl S.M., Smith J.C., Fischer S. Insights into the chemomechanical coupling of the myosin motor from simulation of its ATP hydrolysis mechanism // Biochemistry. 2006. T. 45, № 18. C. 5830–5847.
31. Grigorenko B.L., Rogov A.V., Topol I.A., Burt S.K., Martinez H.M., Nemukhin, A.V. Mechanism of the myosin catalyzed hydrolysis of ATP as rationalized by molecular modeling // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007. T. 104, № 17. C. 7057–7061.
32. Kiani F.A., Fischer S. Comparing the catalytic strategy of ATP hydrolysis in biomolecular motors // Physical Chemistry Chemical Physics. Royal Society of Chemistry, 2016. T. 18, № 30. C. 20219–20233.
33. Kiani F.A., Fischer S. Catalytic strategy used by the myosin motor to hydrolyze ATP // Proceedings of the National Academy of Sciences. National Academy of Sciences, 2014. T. 111, № 29. C. E2947–E2956.
34. Johnson C.D. Linear free energy relationships and the reactivity-selectivity principle // Chemistry Reviews. 1975. T. 75, № 6. C. 755–765.
35. Lopez-Canut V., Roca M., Bertran J., Moliner V., Tunon I. Theoretical study of phosphodiester hydrolysis in nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase. Environmental effects on the reaction mechanism // Journal of the American Chemical Society. 2010. T. 132, № 20. C. 6955–6963.
36. Hoff R.H., Hengge A.C. Entropy and enthalpy contributions to solvent effects on phosphate monoester solvolysis. The importance of entropy effects in the dissociative transition state // Journal of Organic Chemistry. 1998. T. 63, № 19. C. 6680–6688.
37. Kirby A.J., Jencks W.P. The reactivity of nucleophilic reagents toward the p-nitrophenyl phosphate dianion // Journal of the American Chemical Society. 1965. T. 87, № 14. C. 3209–3216.

38. Kirby A.J., Varvoglis A.G. The reactivity of phosphate esters. Monoester hydrolysis // Journal of the American Chemical Society. 1967. T. 89, № 2. C. 415–423.
39. Pauling L. The nature of the chemical bond. Cornell university. 1960. 644 c.
40. Thakur M., Medintz I.L., Walper S.A. Enzymatic bioremediation of organophosphate compounds—progress and remaining challenges // Frontiers Bioengineering and Biotechnology. Frontiers Media S.A., 2019. T. 7, № 11. C. 289–310.
41. Benning M.M., Kuo J.M., Raushel F.M., Holden H.M. Three-dimensional structure of phosphotriesterase: an enzyme capable of detoxifying organophosphate nerve agents // Biochemistry. 1994. T. 33, № 50. C. 15001–15007.
42. Benning M.M., Shim H., Raushel F.M., Holden H.M. High resolution X-ray structures of different metal-substituted forms of phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* // Biochemistry. 2001. T. 40, № 9. C. 2712–2722.
43. Tsai P.C., Fox N., Bigley A.N., Harvey S.P., Barondeau D.P., Raushel F.M. Enzymes for the homeland defense: optimizing phosphotriesterase for the hydrolysis of organophosphate nerve agents // Biochemistry. 2012. T. 51, № 32. C. 6463–6475.
44. Tokuriki N., Jackson C.J., Afriat-Jurnou L., Wyganowski K.T., Tang R., Tawfik D.S. Diminishing returns and tradeoffs constrain the laboratory optimization of an enzyme // Nature Communications. Nature Publishing Group, 2012. T. 3, № 1. C. 1257–1266.
45. Benning M.M., Hong S. B., Raushel F. M., Holden H. M. The binding of substrate analogs to phosphotriesterase // Journal of Biological Chemistry. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 2000. T. 275, № 39. C. 30556–30560.
46. Vanhooke J.L., Benning M. M., Raushel F. M., Holden H. M. Three-dimensional structure of the zinc-containing phosphotriesterase with the bound substrate analog diethyl 4-methylbenzylphosphonate // Biochemistry. 1996. T. 35, № 19. C. 6020–6025.
47. Grimsley J.K., Calamin, B., Wild J.R., Mesecar A.D. Structural and mutational studies of organophosphorus hydrolase reveal a cryptic and functional allosteric-binding site // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2005. T. 442, № 2. C. 169–179.

48. Benning M.M., Kuo J.M., Raushel F.M., Holden H.M. Three-dimensional structure of the binuclear metal center of phosphotriesterase // Biochemistry. 1995. T. 34, № 25. C. 7973–7978.
49. Reeves T.E., Wales M.E., Grimsley J.K., Li P., Cerasoli D.M., Wild J.R. Balancing the stability and the catalytic specificities of OP hydrolases with enhanced V-agent activities // Protein Engineering, Design and Selection. 2008. T. 21, № 6. C. 405–412.
50. Kim J., Tsai P.C., Chen S.L., Himo F., Almo S.C., Raushel F.M. Structure of diethyl phosphate bound to the binuclear metal center of phosphodiesterase // Biochemistry. 2008. T. 47, № 36. C. 9497–9504.
51. Kuo J.M., Raushel F.M. Identification of the histidine ligands to the binuclear metal center of phosphotriesterase by site-directed mutagenesis // Biochemistry. 1994. T. 33, № 14. C. 4265–4272.
52. Tsai P.C., Bigley A., Li Y., Ghanem E., Cadieux C.L., Kasten S.A., Reeves T.E., Cerasoli D.M., Raushel F.M. Stereoselective hydrolysis of organophosphate nerve agents by the bacterial phosphotriesterase // Biochemistry. American Chemical Society, 2010. T. 49, № 37. C. 7978–7987.
53. Chen-Goodspeed M., Sogorb M.A., Wu F., Hong S.B., Raushel F.M. Structural determinants of the substrate and stereochemical specificity of phosphotriesterase // Biochemistry. 2001. T. 40, № 5. C. 1325–1331.
54. Fu Y., Fan F., Wang B., Cao Z. Water-regulated mechanisms for degradation of pesticides paraoxon and parathion by phosphotriesterase: insight from QM/MM and MD Simulations // Chemistry - An Asian Journal. John Wiley and Sons Ltd, 2022. T. 17, № 14. C. e202200439–e202200449.
55. Bora R.P., Mills M.J., Frushicheva M.P., Warshel A. On the challenge of exploring the evolutionary trajectory from phosphotriesterase to arylesterase using computer simulations // Journal of Physical Chemistry B. American Chemical Society, 2015. T. 119, № 8. C. 3434–3445.

56. López-Canut V., Ruiz-Pernía J.J., Castillo R., Moliner V., Tuñón I. Hydrolysis of phosphotriesters: A theoretical analysis of the enzymatic and solution mechanisms // Chemistry - A European Journal. 2012. T. 18, № 31. C. 9612–9621.
57. Bigley A.N., Raushel F.M. Catalytic mechanisms for phosphotriesterases // Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics. 2013. T. 1834, № 1. C. 443–453.
58. Zhang X., Wu R., Song L., Lin Y., Lin M., Cao Z., Wu W., Mo Y. Molecular dynamics simulations of the detoxification of paraoxon catalyzed by phosphotriesterase // Journal of Computation Chemistry. 2009. T. 30, № 15. C. 2388–2401.
59. Chen S.L., Fang W.H., Himo F. Theoretical study of the phosphotriesterase reaction mechanism // Journal of Physical Chemistry B. American Chemical Society, 2007. T. 111, № 6. C. 1253–1255.
60. Wong K.Y., Gao J. The reaction mechanism of paraoxon hydrolysis by phosphotriesterase from combined QM/MM simulations // Biochemistry. 2007. T. 46, № 46. C. 13352–13369.
61. Jackson C., Kim H.K., Carr P.D., Liu J.W., Ollis D.L. The structure of an enzyme-product complex reveals the critical role of a terminal hydroxide nucleophile in the bacterial phosphotriesterase mechanism // Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics. 2005. T. 1752, № 1. C. 56–64.
62. Jackson C.J., Foo J.L., Kim H.K., Carr P.D., Liu J.W., Salem G., Ollis D.L. In crystallo capture of a Michaelis complex and product-binding modes of a bacterial Phosphotriesterase // Journal of Molecular Biology. Academic Press, 2008. T. 375, № 5. C. 1189–1196.
63. Aubert S.D., Li Y., Raushel F.M. Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase // Biochemistry. 2004. T. 43, № 19. C. 5707–5715.
64. Nam K., Cui Q., Gao J., York D.M. Specific reaction parametrization of the AM1/d Hamiltonian for phosphoryl transfer reactions: H, O, and P atoms // Journal of Chemical Theory and Computation. 2007. T. 3, № 2. C. 486–504.

65. Lopez X., York D.M. Parameterization of semiempirical methods to treat nucleophilic attacks to biological phosphates: AM1/d parameters for phosphorus // Theoretical Chemistry Accounts. 2003. T. 109, № 3. C. 149–159.
66. Brauer M., Kunert M., Dinjus E., Klussmann M., Döring M., Görls H., Anders E. Evaluation of the accuracy of PM3, AM1 and MNDO/d as applied to zinc compounds // Journal of Molecular Structure: Theochem. 2000. T. 505. C. 289–301.
67. Mardirossian N., Head-Gordon M. Thirty years of density functional theory in computational chemistry: an overview and extensive assessment of 200 density functionals // Molecular Physics. Taylor and Francis Ltd., 2017. T. 115, № 19. C. 2315–2372.
68. Xiang D.F., Bigley A.N., Ren Z., Xue H., Hull K.G., Romo D., Raushel F.M. Interrogation of the substrate profile and catalytic properties of the phosphotriesterase from *Sphingobium* sp. strain TCM1: an enzyme capable of hydrolyzing organophosphate flame retardants and plasticizers // Biochemistry. American Chemical Society, 2015. T. 54, № 51. C. 7539–7549.
69. Caldwell S.R., Newcomb J.R., Schlecht K.A., Raushel F.M. Limits of diffusion in the hydrolysis of substrates by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* // Biochemistry. 1991. T. 30, № 30. C. 7438–7444.
70. Arnsten A.F.T., Wang M. The evolutionary expansion of mGluR3-NAAG-GCPII signaling: relevance to human intelligence and cognitive disorders // American Journal of Psychiatry. 2020. T. 177, № 12. C. 1103–1106.
71. Reiner A., Levitz J. Glutamatergic signaling in the central nervous system: ionotropic and metabotropic receptors in concert // Neuron. Cell Press, 2018. T. 98, № 6. C. 1080–1098.
72. Gasiorowska A., Wydrych M., Drapich P., Zadrozny M., Steczkowska M., Niewiadomski W., Niewiadomska G. The biology and pathobiology of glutamatergic, cholinergic, and dopaminergic signaling in the aging brain // Front Aging Neuroscience. Frontiers Media S.A., 2021. T. 13, № 7. C. 654931–654962.

73. Taylor S.S., Knighton D.R., Zheng J., Ten Eyck L.F., Sowadski J.M. Structural framework for the protein kinase family // Annual Reviews of Cell Biology. 1992. T. 8, № 1. C. 429–462.
74. Johnson D.A., Akamine P., Radzio-Andzelm E., Madhusudan A., Taylor S.S. Dynamics of cAMP-dependent protein kinase // Chemistry Reviews. 2001. T. 101, № 8. C. 2243–2270.
75. Søberg K., Skålhegg B.S. The molecular basis for specificity at the level of the protein kinase a catalytic subunit // Front Endocrinol (Lausanne). Frontiers Media S.A., 2018. T. 9, № 9. C. 538–560.
76. Torkamani A., Kannan N., Taylor S.S., Schork N.J. Congenital disease SNPs target lineage specific structural elements in protein kinases // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008. T. 105, № 26. C. 9011–9016.
77. Adams J.A.A., Taylor S.S. Divalent metal ions influence catalysis and active-site accessibility in the cAMP-dependent protein kinase // Protein Science. Cambridge University Press, 1993. T. 2, № 12. C. 2177–2186.
78. Adams J.A. Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases // Chemistry Reviews. 2001. T. 101, № 8. C. 2271–2290.
79. Hutter M.C., Helms V. Influence of key residues on the reaction mechanism of the cAMP-dependent protein kinase // Protein Science. 1999. T. 8, № 12. C. 2728–2733.
80. Valiev M., Kawai R., Adams J.A., Weare J.H. The role of the putative catalytic base in the phosphoryl transfer reaction in a protein kinase: first-principles calculations // Journal of the American Chemical Society. 2003. T. 125, № 33. C. 9926–9927.
81. Pérez-Gallegos A., Garcia-Viloca M., González-Lafont À., Lluch J.M. A QM/MM study of the associative mechanism for the phosphorylation reaction catalyzed by protein kinase A and its D166A mutant // Journal Computer - Aided Molecular Design. Kluwer Academic Publishers, 2014. T. 28, № 11. C. 1077–1091.
82. Bossemeyer D. Protein kinases-structure and function // Federation of European Biochemical Societies Letters. 1995. T. 369, № 1. C. 57–61.

83. Iyer G.H., Moore M.J., Taylor S.S. Consequences of lysine 72 mutation on the phosphorylation and activation state of cAMP-dependent kinase // Journal of Biological Chemistry. 2005. T. 280, № 10. C. 8800–8807.
84. Iyer G.H., Garrod S., Woods Jr V. L., Taylor S. S. Catalytic independent functions of a protein kinase as revealed by a kinase-dead mutant: Study of the Lys72His mutant of cAMP-dependent kinase // Journal of Molecular Biology. Academic Press, 2005. T. 351, № 5. C. 1110–1122.
85. Madhusudan B., Trafny E.A., Xuong N.H., Adams J.A., Eyck L.F.T., Taylor S.S., Sowadski J.M. cAMP-dependent protein kinase: crystallographic insights into substrate recognition and phosphotransfer // Protein Science. Cambridge University Press, 1994. T. 3, № 2. C. 176–187.
86. Kemp B.E., Graves D.J., Benjamini E., Krebs E.G. Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP dependent protein kinase // Journal of Biological Chemistry. 1977. T. 252, № 14. C. 4888–4894.
87. Scott J.D., Fischer E.H., Takio K., Demaille J.G., Krebs E.G. Amino acid sequence of the heat-stable inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle (protein kinase inhibitor/protein phosphorylation/microsequencing) // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1985. T. 82, № 17. C. 5732–5736.
88. Zhou J., Adams J.A. Participation of ADP Dissociation in the rate-determining step in cAMP-dependent protein kinase // Biochemistry. 1997. T. 36, № 50. C. 15733–15738.
89. Taylor S.S., Herberg F.W., Veglia G., Wu J. Edmond Fischer's kinase legacy: history of the protein kinase inhibitor and protein kinase A // International Union of Biochemistry and Molecular Biology. John Wiley and Sons Inc, 2023. T. 75, № 4. C. 311–323.
90. Pérez-Gallegos A., Garcia-Viloca M., Gonzalez-Lafont A., Lluch J.M. SP20 phosphorylation reaction catalyzed by protein kinase A: QM/MM calculations based on recently determined crystallographic structures // ACS Catalysis. American Chemical Society, 2015. T. 5, № 8. C. 4897–4912.

91. Lee M., Ahmad S.F., Xu J. Regulation and function of transposable elements in cancer genomes // *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2024. T. 81, № 1. C. 157–184.
92. Kazazian H.H., Moran J. V. Mobile DNA in Health and Disease // *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 2017. T. 377, № 4. C. 361–370.
93. Hancks D.C., Kazazian H.H. Roles for retrotransposon insertions in human disease // *Mobile DNA*. BioMed Central Ltd., 2016. T. 7, № 1. C. 9–37.
94. Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A., Howland J., Kann L., Lehoczky J., LeVine R., McEwan P., McKernan K., Meldrim J., Mesirov J.P., Miranda C., Morris W., Naylor J., Raymond C., Rosetti M., Santos R., Sheridan A., Sougnez C., Stange-Thomann Y., Stojanovic N., Subramanian A., Wyman D., Rogers J., Sulston J., Ainscough R., Beck S., Bentley D., Burton J., Clee C., Carter N., Coulson A., Deadman R., Deloukas P., Dunham A., Dunham I., Durbin R., French L., Graham D., Gregory S., Hubbard T., Humphray S., Hunt A., Jones M., Lloyd C., McMurray A., Matthews L., Mercer S., Milne S., Mullikin J. C., Mungall A., Plumb R., Ross M., Showe R., Sims S., Waterston R. H., Wilson R. K., Hillier L.W., McPherson J.D., Marra M.A., Mardis E.R., Fulton L.A., Chinwalla A.T., Pepin K.H., Gish W.R., Chissoe S.L., Wendl M.C., Delehaunty K.D., Miner T.L., Delehaunty A., Kramer J.B., Cook L.L., Fulton R.S., Johnson D.L., Minx P.J., Clifton S.W., Hawkins T., Branscomb E., Predki P., Richardson P., Wenning S., Slezak T., Doggett N., Cheng J.F., Olsen A., Lucas S., Elkin C., Uberbacher E., Frazier M., Gibbs R.A., Muzny D.M., Scherer S.E., Bouck J.B., Sodergren E.J., Worley K.C., Rives C.M., Gorrell J.H., Metzker M.L., Naylor S.L., Kucherlapati R.S., Nelson D.L., Weinstock G.M., Sakaki Y., Fujiyama A., Hattori M., Yada T., Toyoda A., Itoh T., Kawagoe C., Watanabe H., Totoki Y., Taylor T., Weissenbach J., Heilig R., Saurin W., Artiguenave F., Brottier P., Bruls T., Pelletier E., Robert C., Wincker P., Smith D.R., Doucette-Stamm L., Rubenfield M., Weinstock K., Lee H.M., Dubois J., Rosenthal A., Platzer M., Nyakatura G., Taudien S., Rump A., Yang H., Yu J., Wang J., Huang G., Gu J., Hood L., Rowen L., Madan A., Qin S., Davis R.W., Federspiel N.A., Abola A.P., Proctor M.J., Myers R.M., Schmutz J., Dickson M., Grimwood J., Cox D.R., Olson M.V., Kaul R.,

- Raymond C., Shimizu N., Kawasaki K., Minoshima S., Evans G.A., Athanasiou M., Schultz R., Roe B.A., Chen F., Pan H., Ramser J., Lehrach H., Reinhardt R., McCombie W.R., Bastide M., Dedhia N., Blöcker H., Hornischer K., Nordsiek G., Agarwala R., Aravind L., Bailey J.A., Bateman A., Batzoglou S., Birney E., Bork P., Brown D.G., Burge C.B., Cerutti L., Chen H.C., Church D., Clamp M., Copley R.R., Doerks T., Eddy S.R., Eichler E.E., Furey T.S., Galagan J., Gilbert J.G., Harmon C., Hayashizaki Y., Haussler D., Hermjakob H., Hokamp K., Jang W., Johnson L.S., Jones T.A., Kasif S., Kasprzyk A., Kennedy S., Kent W.J., Kitts P., Koonin E.V., Korf I., Kulp D., Lancet D., Lowe T.M., McLysaght A., Mikkelsen T., Moran J.V., Mulder N., Pollara V.J., Ponting C.P., Schuler G., Schultz J., Slater G., Smit A.F., Stupka E., Szustakowski J., Thierry-Mieg D., Thierry-Mieg J., Wagner L., Wallis J., Wheeler R., Williams A., Wolf Y.I., Wolfe K.H., Yang S.P., Yeh R.F., Collins F., Guyer M.S., Peterson J., Felsenfeld A., Wetterstrand K.A., Patrinos A., Morgan M.J., de Jong P., Catanese J.J., Osoegawa K., Shizuya H., Choi S., Che Y.J., Szustakowski J. Initial sequencing and analysis of the human genome // Nature. 2001. Т. 409, № 6822. С. 860–922.
95. D'Ordine A.M., Jogl G., Sedivy J.M. Identification and characterization of small molecule inhibitors of the LINE-1 retrotransposon endonuclease // Nature Communications. Nature Research, 2024. Т. 15, № 1. С. 3883–3898.
96. Baldwin E.T., van Eeuwen T., Hoyos D., Zalevsky A., Tchesnokov E.P., Sánchez R., Miller B.D., di Stefano L.H., Ruiz F.X., Hancock M., Işık E., Mendez-Dorantes C., Walpole T., Nichols C., Wan P., Riento K., Halls-Kass R., Augustin M., Lammens A., Jestel A., Upla P., Xibinaku K., Congreve S., Hennink M., Rogala K.B., Schneider A.M., Fairman J.E., Christensen S.M., Desrosiers B., Bisacchi G.S., Saunders O.L., Hafeez N., Miao W., Kapeller R., Zaller D.M., Sali A., Weichenrieder O., Burns K.H., Götte M., Rout M.P., Arnold E., Greenbaum B.D., Romero D.L., LaCava J., Taylor M.S. Structures, functions and adaptations of the human LINE-1 ORF2 protein // Nature. Nature Research, 2024. Т. 626, № 7997. С. 194–206.
97. Jensen F. Introduction to Computational Chemistry. Second edition. John Wiley & Sons Ltd, 2007. 599 c.
98. Biomolecular simulations: methods and protocols. Human Press / под ред. Monticelli L., Salonen E. 2013. Т. 924. 702 c.

99. Ponder J.W., Case D.A. Force fields for protein simulations // Advances in Protein Chemistry. 2003. T. 66, № 3. C. 27–85.
100. Best R.B., Zhu X., Shim J., Lopes P.E., Mittal J., Feig M., MacKerell Jr A.D. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone φ , ψ and side-chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles // Journal of Chemical Theory and Computation. American Chemical Society, 2012. T. 8, № 9. C. 3257–3273.
101. Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K.E., Simmerling C. ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB // Journal of Chemical Theory and Computation. American Chemical Society, 2015. T. 11, № 8. C. 3696–3713.
102. Schmid N., Eichenberger A. P., Choutko A., Riniker S., Winger M., Mark A.E., Van Gunsteren W.F. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7 // European Biophysics Journal. 2011. T. 40, № 7. C. 843–856.
103. Kaminski G.A., Friesner R.A., Tirado-Rives J., Jorgensen W.L. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides // Journal of Physical Chemistry B. 2001. T. 105, № 28. C. 6474–6487.
104. Piela L. Ideas of quantum chemistry. Elsevier. 2006. 1086 c.
105. Hohenberg P., Kohn W. Inhomogeneous electron gas // Physical review. 1964. T. 136, № 3B. C. B864–B871.
106. Kohn W., Sham L.J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects // Physical review. 1965. T. 140, № 4A. C. A1133–A1138.
107. Mardirossian N., Head-Gordon M. Thirty years of density functional theory in computational chemistry: An overview and extensive assessment of 200 density functionals // Molecular Physics. Taylor and Francis Ltd., 2017. T. 115, № 19. C. 2315–2372.

108. Benighaus T., DiStasio R.A., Lochan R.C., Chai J.D., Head-Gordon M. Semiempirical double-hybrid density functional with improved description of long-range correlation // Journal of Physical Chemistry A. 2008. Т. 112, № 12. С. 2702–2712.
109. Sirirak J., Lawan N., Van der Kamp M.W., Harvey J. N., Mulholland A. J. Benchmarking quantum mechanical methods for calculating reaction energies of reactions catalyzed by enzymes // PeerJournal of Physical Chemistry. PeerJ, 2020. Т. 2, № 5. С. e8–e28.
110. Adamo C., Barone V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model // Journal of Chemical Physics. American Institute of Physics Inc., 1999. Т. 110, № 13. С. 6158–6170.
111. Хренова М.Г., Кулакова А.М., Мулашкина Т.И., Поляков И.В. Компьютерное моделирование механизмов ферментативных реакций: уроки 20-летней практики // Вестник Московского университета. Moscow University Press, 2024. Т. 65, № 2. С. 87–95.
112. Senn H.M., Thiel W. QM/MM methods for biomolecular systems // Angewandte Chemie - International Edition. 2009. Т. 48, № 7. С. 1198–1229.
113. Цирельсон В.Г. Квантовая химия. Молекулы, молекулярные системы и твердые тела. БИНОМ. 2014. 522 с.
114. Head J.D., Zerner M.C. A Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno optimization procedure for molecular geometries // Chemical Physics Letters. 1985. Т. 122, № 3. С. 264–270.
115. Bader R. F. W. Atoms in molecules // Account of Chemical Research. 1985. Т. 18, № 1. С. 9–15.
116. Khrenova M.G., Tsirelson V.G., Nemukhin A. V. Dynamical properties of enzyme-substrate complexes disclose substrate specificity of the SARS-CoV-2 main protease as characterized by the electron density descriptors // Physical Chemistry Chemical Physics. Royal Society of Chemistry, 2020. Т. 22, № 34. С. 19069–19079.
117. Khrenova M.G., Krivitskaya A. V., Tsirelson V.G. The QM/MM-QTAIM approach reveals the nature of the different reactivity of cephalosporins in the active site of L1 metallo- β -lactamase // New Journal of Chemistry. Royal Society of Chemistry, 2019. Т. 43, № 19. С. 7329–7338.

118. Khrenova M.G., Tsirelson V.G. The N···H hydrogen bond strength in the transition state at the limiting step determines the reactivity of cephalosporins in the active site of L1 metallo- β -lactamase // Mendeleev Communications. Elsevier Ltd, 2019. T. 29, № 5. C. 492–494.
119. Khrenova M.G., Nemukhin A. V., Tsirelson V.G. Discrimination of enzyme–substrate complexes by reactivity using the electron density analysis: peptide bond hydrolysis by the matrix metalloproteinase-2 // Mendeleev Communications. Elsevier Ltd, 2020. T. 30, № 5. C. 583–585.
120. Savin A., Jepsen O., Flad J., Andersen O.K., Preuss H., von Schnerring H.G. Electron localization in solid-state structures of the elements: the diamond structure // Angewandte Chemie International Edition in English. 1992. T. 31, № 2. C. 187–188.
121. Becke A.D., Edgecombe K.E. A simple measure of electron localization in atomic and molecular systems // Journal of Chemical Physics. 1990. T. 92, № 9. C. 5397–5403.
122. Schmider H.L., Becke A.D. Chemical content of the kinetic energy density // Journal of Molecular Structure: Theochem. 2000. T. 527, № 1–3. C. 51–61.
123. Jacobsen H. Localized-orbital locator (LOL) profiles of chemical bonding // Canadian Journal Chemistry. 2008. T. 86, № 7. C. 695–702.
124. Lu T., Chen F. Bond order analysis based on the laplacian of electron density in fuzzy overlap space // Journal of Physical Chemistry A. 2013. T. 117, № 14. C. 3100–3108.
125. Klein J., Khartabil H., Boisson J.C., Contreras-García J., Piquemal J.P., Hénon E. New way for probing bond strength // Journal of Physical Chemistry A. American Chemical Society, 2020. T. 124, № 9. C. 1850–1860.
126. Hug S. Classical molecular dynamics in a nutshell // Biomolecular simulations: Methods and protocols. 2013. T. 924. C. 127–152.
127. Verlet L. Computer «experiments» on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules // Physical review. 1967. T. 159, № 1. C. 98.
128. Martyna G.J., Tobias D.J., Klein M.L. Constant pressure molecular dynamics algorithms // Journal of Chemical Physics. 1994. T. 101, № 5. C. 4177–4189.

129. Feller S.E., Zhang Y., Pastor R.W., Brooks B.R. Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method // Journal of Chemical Physics. 1995. T. 103, № 11. C. 4613–4621.
130. Yang Y.I., Shao Q., Zhang J., Yang L., Gao Y.Q. Enhanced sampling in molecular dynamics // Journal of Chemical Physics. American Institute of Physics Inc., 2019. T. 151, № 7. C. 070902–070912.
131. Kästner J. Umbrella sampling // Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science. Blackwell Publishing Inc., 2011. T. 1, № 6. C. 932–942.
132. Kumar S., Rosenberg J.M., Bouzida D., Swendsen R.H., Kollman P.A. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method // Journal of Computation Chemistry. 1992. T. 13, № 8. C. 1011–1021.
133. Kästner J., Thiel W. Bridging the gap between thermodynamic integration and umbrella sampling provides a novel analysis method: «umbrella integration» // Journal of Chemical Physics. 2005. T. 123, № 14. C. 1441041–1441046.
134. 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. American Chemical Society (ACS), 2025. T. 64, № 18. C. 7035–7045.
135. Khrenova M.G., Grigorenko B.L., Nemukhin A. V. Molecular modeling reveals the mechanism of Ran-RanGAP-catalyzed guanosine triphosphate hydrolysis without an arginine finger // ACS Catalysis. American Chemical Society, 2021. T. 11, № 15. C. 8985–8998.
136. Khrenova M.G., Kots E.D., Nemukhin A. V. Reaction mechanism of guanosine triphosphate hydrolysis by the vision-related protein complex Arl3-RP2 // Journal of Physical Chemistry B. American Chemical Society, 2016. T. 120, № 16. C. 3873–3879.
137. Grigorenko B.L., Knyazeva M.A., Nemukhin A. V. Analysis of proton wires in the enzyme active site suggests a mechanism of c-di-GMP hydrolysis by the EAL domain phosphodiesterases // Proteins: Structure, Function and Bioinformatics. John Wiley and Sons Inc., 2016. T. 84, № 11. C. 1670–1680.

138. Grigorenko B., Polyakov I., Nemukhin A. Mechanisms of ATP to cAMP conversion catalyzed by the mammalian adenylyl cyclase: a role of magnesium coordination shells and proton wires // Journal of Physical Chemistry B. American Chemical Society, 2020. T. 124, № 3. C. 451–460.
139. Khrenova M.G., Kulakova A.M., Nemukhin A. V. Light-Induced change of arginine conformation modulates the rate of adenosine triphosphate to cyclic adenosine monophosphate conversion in the optogenetic system containing photoactivated adenylyl cyclase // Journal of Chemical Information and Modeling. American Chemical Society, 2021. T. 61, № 3. C. 1215–1225.
140. Dittrich M., Hayashi S., Schulten K. On the mechanism of ATP hydrolysis in F1-ATPase // Biophysical Journal. Biophysical Society, 2003. T. 85, № 4. C. 2253–2266.
141. McClory J., Lin J.T., Timson D.J., Zhang J., Huang M. Catalytic mechanism of mevalonate kinase revisited, a QM/MM study // Organic and Biomolecular Chemistry. Royal Society of Chemistry, 2019. T. 17, № 9. C. 2423–2431.
142. McClory J., Hui C., Zhang J., Huang M. The phosphorylation mechanism of mevalonate diphosphate decarboxylase: A QM/MM study // Organic and Biomolecular Chemistry. Royal Society of Chemistry, 2020. T. 18, № 3. C. 518–529.
143. Grigorenko B.L., Kaliman I.A., Nemukhin A. V. Minimum energy reaction profiles for ATP hydrolysis in myosin // Journal of Molecular Graphics and Modeling. 2011. T. 31, № 11. C. 1–4.
144. Elsässer B., Fels G. Atomistic details of the associative phosphodiester cleavage in human ribonuclease H // Physical Chemistry Chemical Physics. 2010. T. 12, № 36. C. 11081–11088.
145. De Vivo M., Dal Peraro M., Klein M.L. Phosphodiester cleavage in ribonuclease H occurs via an associative two-metal-aided catalytic mechanism // Journal of the American Chemical Society. 2008. T. 130, № 33. C. 10955–10962.
146. Bellinzoni M., Haouz A., Graña M., Munier-Lehmann H., Shepard W., Alzari P.M. The crystal structure of Mycobacterium tuberculosis adenylate kinase in complex with two

molecules of ADP and Mg²⁺ supports an associative mechanism for phosphoryl transfer // Protein Science. Wiley, 2006. T. 15, № 6. C. 1489–1493.

147. Krishnamurthy H., Lou H., Kimple A., Vieille C., Cukier R.I. Associative mechanism for phosphoryl transfer: A molecular dynamics simulation of Escherichia coli adenylate kinase complexed with its substrates // Proteins: Structure, Function and Genetics. 2005. T. 58, № 1. C. 88–100.
148. Shibanuma Y., Nemoto N., Yamamoto N., Sampei G. I., Kawai G. Crystal structure of adenylate kinase from an extremophilic archaeon Aeropyrum pernix with ATP and AMP // Journal of Biochemistry. Oxford University Press, 2020. T. 168, № 3. C. 223–229.
149. Scheffzek K., Ahmadian M.R., Kabsch W., Wiesmuller L., Lautwein A., Schmitz F., Wittinghofer A. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants // Science (1979). 1997. T. 277, № 5324. C. 333–338.
150. Seewald M., Körner C., Wittinghofer A., Vetter I.R. RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger // Nature. 2002. T. 415, № 6872. C. 662–666.
151. Veltel S., Gasper, R., Eisenacher, E., & Wittinghofer, A. The retinitis pigmentosa 2 gene product is a GTPase-activating protein for Arf-like 3 // Nature Structural and Molecular Biology. 2008. T. 15, № 4. C. 373–380.
152. Barends T.R.M., Hartmann E., Griese J.J., Beitlich T., Kirienko N.V., Ryjenkov D.A., Reinstein J., Shoeman R.L., Gomelsky M., Schlichting I. Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase // Nature. 2009. T. 459, № 7249. C. 1015–1018.
153. Tesmer J., Sunahara R.K., Johnson R.A., Gosselin G., Gilman A.G., Sprang S.R. Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase // Science (1979). 1999. T. 285, № 5428. C. 756–760.
154. Lindner R., Hartmann E., Tarnawski M., Winkler A., Frey D., Reinstein J., Meinhart A., Schlichting I. Photoactivation mechanism of a bacterial light-regulated adenylyl cyclase // Journal of Molecular Biology. Academic Press, 2017. T. 429, № 9. C. 1336–1351.

155. Gibbons C., Montgomery M.G., Leslie A.G., Walker J.E. The structure of the central stalk in bovine F1-ATPase at 2.4 Å resolution // Nature Structural Biology. 2000. T. 7, № 11. C. 1055–1061.
156. Fu Z., Wang M., Potter D., Miziorko H.M., Kim J. J. P. The structure of a binary complex between a mammalian mevalonate kinase and ATP. Insights into the reaction mechanism and human inherited disease // Journal of Biological Chemistry. 2002. T. 277, № 20. C. 18134–18142.
157. Barta M.L., McWhorter W.J., Miziorko H.M., Geisbrecht B.V. Structural basis for nucleotide binding and reaction catalysis in mevalonate diphosphate decarboxylase // Biochemistry. 2012. T. 51, № 28. C. 5611–5621.
158. Smith C.A., Rayment I. X-ray structure of the magnesium(II), ADP, vanadate complex of the dictyostelium discoideum myosin motor domain to 1.9 Å resolution // Biochemistry. 1996. T. 35, № 17. C. 5404–5417.
159. Zalatan J.G., Fenn T.D., Brunger A.T., Herschlag D. Structural and functional comparisons of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase and alkaline phosphatase: Implications for mechanism and evolution // Biochemistry. 2006. T. 45, № 32. C. 9788–9803.
160. Nowotny M., Gaidamakov S.A., Ghirlando R., Cerritelli S.M., Crouch R.J., Yang W. Structure of human RNase H1 complexed with an RNA/DNA hybrid: insight into HIV reverse transcription // Molecular Cell. Cell Press, 2007. T. 28, № 2. C. 264–276.
161. Nowotny M., Gaidamakov S.A., Crouch R.J., Yang, W. Crystal structures of RNase H bound to an RNA/DNA hybrid: substrate specificity and metal-dependent catalysis // Cell. Elsevier B.V., 2005. T. 121, № 7. C. 1005–1016.
162. Miiller C.W., Schulz G.E. Structure of the complex between adenylate kinase from Escherichia coli and the inhibitor Ap5A refined at 1.9 Å resolution A model for a catalytic transition state // Journal of Molecular Biology. 1992. T. 224, № 1. C. 159–177.
163. Word J.M., Lovell S.C., Richardson J.S., Richardson D.C. Asparagine and glutamine: using hydrogen atom contacts in the choice of side-chain amide orientation // Journal of Molecular Biology. 1999. T. 285, № 4. C. 1735–1747.

164. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: Visual Molecular Dynamics // Journal of Molecular Graphics. 1996. T. 14, № 1. C. 33–38.
165. Phillips J.C., Hardy D.J., Maia J.D.C., Stone J.E., Ribeiro J.V., Bernardi R.C., Buch R., Fiorin G., Hénin J., Jiang W., McGreevy R., Melo M.C.R., Radak B.K., Skeel R.D., Singharoy A., Wang Y., Roux B., Aksimentiev A., Luthey-Schulten Z., Kalé L.V., Schulten K., Chipot C., Tajkhorshid E. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD // Journal of Chemical Physics. American Institute of Physics Inc., 2020. T. 153, № 4. C. 044130–044164.
166. Best R.B., Zhu X., Shim J., Lopes P.E., Mittal J., Feig M., MacKerell Jr A.D. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles // Journal of Chemical Theory and Computation. American Chemical Society, 2012. T. 8, № 9. C. 3257–3273.
167. MacKerell A.D., Feig M., Brooks C.L. Improved treatment of the protein backbone in empirical force fields // Journal of the American Chemical Society. 2004. T. 126, № 3. C. 698–699.
168. MacKerell A.D., Bashford D., Bellott M., Dunbrack R.L., Evanseck J.D., Field M.J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S., Joseph-McCarthy D., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F.T.K., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D.T., Prodhom B., Reiher W.E., Roux B., Schlenkrich M., Smith J.C., Stote R., Straub J., Watanabe M., Wiórkiewicz-Kuczera J., Yin D., Karplus M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins // The Journal of Physical Chemistry B. 1998. T. 102, № 18. C. 3586–3616.
169. Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // Journal of Chemical Physics. 1983. T. 79, № 2. C. 926–935.
170. Grimme S., Antony J., Ehrlich S., Krieg H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu // Journal of Chemical Physics. 2010. T. 132, № 15. C. 154104–154124.

171. Melo M.C.R., Bernardi R.C., Rudack T., Scheurer M., Riplinger C., Phillips J.C., Maia J.D.C., Rocha G.B., Ribeiro J.V., Stone J.E., Neese F., Schulten K., Luthey-Schulten Z. NAMD goes quantum: An integrative suite for hybrid simulations // *Nat Methods*. Nature Publishing Group, 2018. T. 15, № 5. C. 351–354.
172. Seritan S., Bannwarth C., Fales B.S., Hohenstein E.G., Isborn C.M., Kokkila-Schumacher S.I.L., Li X., Liu F., Luehr N., Snyder J.W. Jr., Song C., Titov A.V., Ufimtsev I.S., Wang L.-P., Martínez T.J. TeraChem: A graphical processing unit-accelerated electronic structure package for large-scale ab initio molecular dynamics // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. Blackwell Publishing Inc., 2021. T. 11, № 2. C. e1494–e1510.
173. Martyna G.J., Klein M.L., Tuckerman M. Nosé-Hoover chains: The canonical ensemble via continuous dynamics // *Journal of Chemical Physics*. 1992. T. 97, № 4. C. 2635–2643.
174. Lu Y., Farrow M.R., Fayon P., Logsdail A.J., Sokol A.A., Catlow C.R.A., Sherwood P., Keal T.W. Open-source, python-based redevelopment of the Chemshell multiscale QM/MM environment // *Journal of Chemical Theory and Computation*. American Chemical Society, 2019. T. 15, № 2. C. 1317–1328.
175. Kästner J., Carr J.M., Keal T.W., Thiel W., Wander A., Sherwood P. DL-FIND: An open-source geometry optimizer for atomistic simulations // *Journal of Physical Chemistry A*. 2009. T. 113, № 43. C. 11856–11865.
176. Balasubramani S.G. Balasubramani S.G., Chen G.P., Coriani S., Diedenhofen M., Frank M.S., Franzke Y.J., Furche F., Grotjahn R., Harding M.E., Hättig C., Hellweg A., Helmich-Paris B., Holzer C., Huniar U., Kaupp M., Marefat Khah A., Karbalaei Khani S., Müller T., Mack F., Nguyen B.D., Parker S.M., Perlt E., Rappoport D., Reiter K., Roy S., Rückert M., Schmitz G., Sierka M., Tapavicza E., Tew D.P., van Wüllen C., Voora V.K., Weigend F., Wodyński A., Yu J.M. TURBOMOLE: Modular program suite for ab initio quantum-chemical and condensed-matter simulations // *Journal of Chemical Physics*. American Institute of Physics Inc., 2020. T. 152, № 18. C. 184107–184144.
177. Lu T., Chen F. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer // *Journal of Computation Chemistry*. 2012. T. 33, № 5. C. 580–592.

178. 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.
- 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.
179. Мулашкина Т.И., Куалкова 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.
- 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.
180. 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. American Chemical Society (ACS), 2025. T. 65, № 15. C. 8181–8193.
181. Vanommeslaeghe K., Raman E.P., MacKerell A.D. Automation of the CHARMM general force field (CGenFF) II: assignment of bonded parameters and partial atomic charges // Journal of Chemical Information and Modeling. American Chemical Society, 2012. T. 52, № 12. С. 3155–3168.
182. Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C., Kundu S., Zhong S., Shim J., Darian E., Guvench O., Lopes P., Vorobyov I., Mackerell A.D. Jr. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields // Journal of Computation Chemistry. 2010. T. 31, № 4. С. 671–690.

183. Bennett B. EPR of Co(II) as a structural and mechanistic probe of EPR of Co(II) as a structural and mechanistic probe of metalloprotein active sites: a review of studies on metalloprotein active sites: a review of studies on aminopeptidase aminopeptidase // Current Topics in Biophysics. 2002. T. 26, № 1. C. 49–57.
184. Bennett B. EPR of cobalt-substituted zinc enzymes // Metals in Biology: Applications of High-Resolution EPR to Metalloenzymes. Springer New York, 2010. C. 345–370.
185. Baum R.R., James C.D., Tierney D.L. Paramagnetic resonance of high-spin Co(II) in biologically-relevant environments: models to metalloproteins // Future directions in metalloprotein and metalloenzyme research. Springer International Publishing, 2017. C. 33–54.
186. Hay P.J., Wadt W.R. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitale // Journal of Chemical Physics. 1985. T. 82, № 1. C. 299–310.
187. Omburo G.A., Kuo J.M., Mullins L.S., Raushel F. Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase // Journal of Biological Chemistry. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 1992. T. 267, № 19. C. 13278–13283.
188. Rich A.M., Bombarda E., Schenk A.D., Lee P.E., Cox E.H., Spuches A.M., Hudson L.D., Kieffer B., Wilcox D.E. Thermodynamics of Zn²⁺ binding to Cys2His2 and Cys2HisCys zinc fingers and a Cys4 transcription factor site // Journal of the American Chemical Society. 2012. T. 134, № 25. C. 10405–10418.
189. Sellin S., Mannerviks B. Metal dissociation constants for glyoxalase i reconstituted with Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, and Mg²⁺ // Journal of Biological Chemistry. 1984. T. 259, № 18. C. 11426–11429.
190. Мулашкина Т.И., Леонова М.С., Хренова М.Г. Конформационная динамика фермент-субстратного комплекса протеинкиназы А с псевдосубстратом SP20 и аденоциантифосфатом // Биомедицинская химия. Russian Academy of Medical Sciences, 2024. Т. 70, № 6. С. 421–427.

- 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 // Biomeditsinskaia khimiia. – 2024. – Vol. 70. № 6. – P. 421-427.
191. Gerlits O., Waltman M.J., Taylor S., Langan P., Kovalevsky A. Insights into the phosphoryl transfer catalyzed by cAMP-dependent protein kinase: an X-ray crystallographic study of complexes with various metals and peptide substrate SP20 // Biochemistry. 2013. T. 52, № 21. C. 3721–3727.
 192. Tubiana T., Carvaillo, J. C., Boulard, Y., & Bressanelli, S. TTClust: a versatile molecular simulation trajectory clustering program with graphical summaries // Journal of Chemical Information and Modeling. American Chemical Society, 2018. T. 58, № 11. C. 2178–2182.
 193. Ward J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function // Journal of American Statistical Association. 1963. T. 58, № 301. C. 236–244.
 194. Cheng Y., Zhang Y., McCammon J.A. How does activation loop phosphorylation modulate catalytic activity in the cAMP-dependent protein kinase: A theoretical study // Protein Science. Wiley, 2006. T. 15, № 4. C. 672–683.
 195. 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. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2025. T. 26, № 17. C. 8661–8673.
 196. Guo L.T., Olson S., Patel S., Graveley B.R., Pyle A.M. Direct tracking of reverse- Transcriptase speed and template sensitivity: Implications for sequencing and analysis of long RNA molecules // Nucleic Acids Research. Oxford University Press, 2022. T. 50, № 12. C. 6980–6989.
 197. Vergara S., Zhou X., Santiago U., Alaoui-El-Azher M., Conway J.F., Sluis-Cremer N., Calero G. Structural basis of deoxynucleotide addition by HIV-1 RT during reverse transcription // Nature Communications. Nature Research, 2024. T. 15, № 1. C. 10553–10567.