

Отзыв официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук Мулашкиной Татьяны Игоревны
на тему: «Определение механизмов разрыва Р-О связи в активных центрах
ферментов методами молекулярного моделирования»
по специальности 1.4.4. Физическая химия (физико-математические науки)

Диссертационная работа Мулашкиной Татьяны Игоревны посвящена изучению механизмов ферментативных реакций с участием фосфорорганических соединений. Ферментативные процессы, сопровождающиеся разрывом связи Р-О, имеют ключевое значение, так как обеспечивают нормальное функционирование живых организмов, а также применяются для ликвидации органофосфатных загрязнений из окружающей среды. Механизмы реакций разрыва связи Р-О представляют собой сложные процессы нуклеофильного замещения, которые, в зависимости от структуры интермедиата или переходного состояния, классифицируются как диссоциативный и ассоциативный. Разработка критериев для быстрого и точного прогнозирования механизмов реакций разрыва связи Р-О с использованием данных о фермент-субстратном комплексе является актуальной задачей.

В рамках данного исследования применялись современные методы молекулярного моделирования, включая комбинированный подход квантовой механики и молекулярной механики (КМ/ММ), а также метод молекулярной динамики (МД). Для преодоления проблемы исследования конформационного пространства был использован метод зонтичной выборки. Комбинация этих методов позволила провести детальный анализ механизмов ферментативных реакций и осуществить переход от микроскопических параметров, полученных в ходе расчетов, к макроскопическим характеристикам, наблюдаемым в экспериментальных условиях. Проведенный анализ результатов молекулярно-динамических исследований и дескрипторов электронной плотности позволил автору предложить критерий для классификации типов механизмов

ферментативных реакций с разрывом Р-О связи. В частности, были установлены механизмы следующих реакций: гидролиз органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE, фосфорилирование субстрата в активном центре протеинкиназы А, а также процесс удлинения цепи ДНК в активном центре обратной транскриптазы ORF2p.

Диссертационное исследование выполнено в соответствии с общепринятыми требованиями и состоит из нескольких разделов, включая введение, обзор литературы (глава 1), описание использованных методов молекулярного моделирования (глава 2), изложение и обсуждение полученных результатов (главы 3–6), заключение, выводы, список сокращений и введенных обозначений и список цитируемой литературы. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, содержит 48 рисунков, 12 таблиц и 197 библиографических ссылок.

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

В главе 1 автор представляет обзор ферментов, катализирующих реакции разрыва Р-О связи в фосфорорганических соединениях. В работе проведен анализ исторически значимых исследований, посвященных классификации механизмов данных реакций. Также подробно рассмотрены структурные особенности, каталитические свойства и возможные механизмы реакций в активных центрах таких ферментов, как фосфотриэстераза Pd-PTE, протеинкиназа А и обратная транскриптаза ORF2p.

Вторая глава «Методы молекулярного моделирования» состоит из семи подразделов, в которых изложены теоретические основы методов молекулярного моделирования, использованных в работе. В частности, методов расчета энергий и сил, таких как метод молекулярной механики, методы квантовой химии и комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ). Отдельное внимание уделено расчёту профилей энергии Гиббса

методом зонтичной выборки с последующим статистическим анализом распределений координаты реакций в траекториях. Кроме того, в данной главе представлен обзор дескрипторов электронной плотности.

Глава 3 посвящена разработке критерия определения типа механизма ферментативного разрыва Р-О связи и состоит из шести разделов. В первом разделе приведена классификация четырнадцати различных систем по типу механизма реакций. Во втором разделе автор приводит детализацию по подготовке полноатомных моделей систем и проведенных расчетов. Третий, четвертый и пятый разделы посвящены поиску критерия, определяющего тип механизма реакции. Исследования ключевых межатомных расстояний в активном центре ферментов, дескрипторов электронной плотности, рассчитанных в плоскости, вдоль связей и в критических точках связи, а также анализ порядка связи показали, что особенности разрываемой Р-OLG связи определяют механизм реакции. Предложено использовать лапласиан электронной плотности вдоль разрываемой связи в фермент-субстратном комплексе в качестве бинарного классификатора для различия ассоциативных и диссоциативных механизмов реакций. В последнем разделе данной главы предложенные критерии были применены для определения типа механизма реакции фосфорилирования в трех аденилаткиназах, а также была проведена валидация полученных результатов.

Глава 4 посвящена изучению механизма реакции гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы бактерии *Pseudomonas diminuta* (Pd-PTE) и состоит из пяти разделов. В первом разделе предоставляется информация о подготовке модельных систем и протоколы расчетов. Во втором разделе предложенные критерии в главе 3 применяются для определения типа механизма реакции гидролиза дибутил-4-нитрофенилфосфата в активном центре Pd-PTE и позволяют установить, что данная реакция относится к ассоциативному типу. Данный результат нашел подтверждение при молекулярном моделировании механизма реакции гидролиза органофосфатов в активном центре Pd-PTE,

представленный в третьем разделе. В четвертом разделе автор приводит сравнение ключевых межатомных расстояний в фермент-субстратном комплексе параоксона в активном центре Pd-PTE. Кроме того, в этой главе проведен анализ динамического поведения и карт лапласиана электронной плотности промежуточного интермедиата реакции.

Глава 5 посвящена изучению реакции фосфорилирования субстрата SP20 в активном центре протеинкиназы A (PKA) и состоит из четырех разделов. В первом разделе приводится детализация проведенного молекулярного моделирования. Во втором разделе автор приводит результаты иерархической кластеризации молекулярно-динамической траектории фермент-субстратного комплекса, что позволяет определить две возможные конформации активного центра. В третьем разделе предложенные критерии в главе 3 применяются для определения типа и позволяют установить, что фосфорилирование субстрата SP20 в активном центре PKA протекает по диссоциативному механизму. В четвертом разделе установлен механизм реакции фосфорилирования, определена реакционноспособная конформация и состояние продукта реакции.

Глава 6 посвящена изучению реакции удлинения ДНК в активном центре обратной транскриптазы ORF2p и состоит из трех разделов. В первом разделе автор описывает детали молекулярного моделирования. Во втором разделе применение критериев по определению типа механизма реакции позволило установить, что данная реакция протекает по диссоциативному пути. В третьем разделе установлен механизм реакции удлинения цепи ДНК в активном центре ORF2p и по теории активированного комплекса из профиля энергии Гиббса определена константа скорости реакции.

В «Заключении» описаны основные результаты по каждому этапу работы. Выводы диссертации четко сформулированы, соответствуют поставленным задачам, обозначают теоретическую значимость и научную новизну исследования.

В работе применены современные методы описания реакции в активном центре ферментов, что указывает на достоверность полученных результатов. Положения, выносимые на защиту, достоверны, результаты согласуются и дополняют известную информацию из литературных источников. По результатам диссертационной работы опубликовано 7 научных статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования «eLibrary Science Index». Основные результаты работы были представлены в виде 20 устных и стендовых докладов на российских и международных конференциях.

Представленная работа соответствует специальности 1.4.4. Физическая химия, а именно следующим ее направлениям:

10. Создание и разработка методов компьютерного моделирования строения и механизмов превращений химических соединений на основе представлений квантовой механики, различных топологических и статистических методов, включая методы машинного обучения, методов молекулярной механики и молекулярной динамики, а также подходов типа структура-свойства.

11. Получение методами квантовой химии и компьютерного моделирования данных об электронной структуре, поверхностях потенциальной и свободной энергии, реакционной способности и динамике превращений химических соединений, находящихся в различном окружении, в том числе в кластерах, клатратах, твердых и жидкокристаллических матрицах, в полостях конденсированных среды и белковом окружении.

Диссертационная работа Мулашкиной Т.И. выполнена на высоком методологическом уровне. Все результаты достоверны и не вызывают сомнений, научные положения и выводы логически вытекают из материала диссертации. На основе проведенного подробного анализа структурно-динамического поведения активного центра фермент-субстратного комплекса, а также его электронного строения разработан критерий определения типа механизмов реакций, сопровождающихся разрывом Р-О связи, в активном центре. Данный критерий

позволяет оптимизировать исследования в области моделирования ключевых реакций с фосфорорганическими соединениями. Кроме того, в работе проведены исследования, которые дают углубленное понимание механизмов реакций гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE, фосфорилирования субстрата SP20 в активном центре РКА и удлинения цепи ДНК в активном центре ORF2p, а также показаны ключевые факторы, влияющие на кинетику реакции, что в дальнейшем можно использовать для управления подобными реакциями.

В тоже время по представленной работе можно сделать ряд замечаний:

1. В главе 4 автором проводится исследование белка бактериальной фосфотриэстеразы. Для бактерии указано название вида по устаревшей классификации – *Pseudomonas diminuta*, в тексте диссертации отсутствует разъяснение, что по новой классификации название вида – *Brevundimonas diminuta*.

2. Не понятно, с чем связан выбор конкретных белков-ферментов различных организмов, исследуемых в диссертации, с точки зрения их биологической роли и отличия от гомологов среди других организмов, что могло бы существенно помочь другим исследователям в выборе объектов.

3. На рисунке 3.4.3А представлены данные, полученные с использованием трех разных функционалов, но не уточнён базисный набор, указано только, что он был один и тот же с каждым из функционалов.

4. В разделе 2.5 отсутствует разъяснение некоторых параметров и констант в формулах. Так, в выражении (2.5.10) для порядка связи Лапласа (LBO), присутствует эмпирически определённый префактор -10, вводимый для того, чтобы величина LBO соответствовала интуитивным химическим представлениям о типичных ковалентных связях. Однако автор не уточняет этот момент. В выражении (2.5.11) параметр δg определён как «индекс атомной пары», что не позволяет понять физическую природу данного параметра.

5. На рисунке 3.6.3 раздела 3.6. приведена структура переходного комплекса, образующегося при переносе фосфата в активном центре аденилаткиназы MtAK, однако отсутствует структура и положение взаимодействующих участков молекул в начальный момент времени и структура продуктов реакции. Следовало также указать на рисунке, какие из атомов имеют обозначения P, OLG, ONu.

6. Также в разделе 3.6 исследуется активный центр фермента аденилаткиназы MtAK, но не рассматривается возможное изменение конформации остальных частей белка, Такое изменение конформации может оказать влияние на активный центр.

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.4.4. – Физическая химия (физико-математические науки), а также критериям, определенным п. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Мулашкина Татьяна Игоревна заслуживает присуждения степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.4.4 Физическая химия.

Официальный оппонент:
доктор физико-математических наук,
главный научный сотрудник,
Руководитель Отдела строения вещества

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семенова Российской академии наук

Крупянский Юрий Фёдорович

12.12.2025

Контактные данные:

тел: 8(495)939-73-00 e-mail: yufk@chph.ras.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
01.04.17 – Химическая физика, горение и взрыв, физика экспериментальных состояний вещества (физ.-мат. науки)

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Косыгина, 4, ФГБУН ФИЦ ХФ имени Н.Н. Семенова РАН, отдел строения вещества

Тел.: 8(495)939-73-00, E-mail: yufk@chph.ras.ru