

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 направлена на разработку критериев, позволяющих классифицировать механизмы ферментативного разрыва Р-О связи в эфирах фосфорной кислоты с органическими заместителями. Кроме того, в рамках исследования детально изучены механизмы реакций разрыва Р-О связей, имеющие как фундаментальное, так и прикладное значение. Актуальность работы обусловлена значимостью ферментативных реакций разрыва Р-О связи в биологических процессах и их применением в задачах утилизации эфиров фосфорных кислот. Использование современных методов молекулярного моделирования, включая комбинированный метод квантовой механики и молекулярной механики (КМ/ММ), а также методы молекулярной динамики (МД), позволило провести детальный анализ этих процессов.

Для разработки критерия, определяющего тип механизма разрыва Р-О связи автором проведён анализ структурно-динамического поведения и электронного строения активного центра фермент-субстратных комплексов в четырнадцать биомолекулярных системах. Исследованы ключевые межатомные расстояния в активных центрах ферментов, дескрипторы электронной плотности, рассчитанные в плоскости вдоль связей и в критических точках, а также порядок связи. Анализ показал, что особенности разрываемой Р-О связи определяют механизм реакции. Автором предложено использовать лапласиан электронной плотности вдоль разрываемой связи в фермент-субстратном комплексе в качестве бинарного классификатора для различия ассоциативных и диссоциативных механизмов реакций. Применение разработанных критериев

позволило установить механизмы следующих реакций: гидролиз эфиров фосфорной кислоты в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE, фосфорилирование субстрата в активном центре протеинкиназы A, а также процесс удлинения цепи ДНК в активном центре обратной транскриптазы ORF2p.

Диссертационная работа изложена на 145 страницах машинописного текста и включает 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, содержащий 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 первой главе представлен обзор литературы, соответствующий выбранному направлению исследований. Описаны ферменты, катализирующие реакции разрыва Р-О связи в эфирах фосфорной кислоты, и проведен анализ значимых исторических исследований, посвященных классификации механизмов этих реакций. Детально рассмотрены структурные особенности, каталитические свойства и механизмы реакций в активных центрах ферментов, таких как фосфотриэстераза Pd-PTE, протеинкиназа A и обратная транскриптаза ORF2p.

Во второй главе («Методы молекулярного моделирования») рассматриваются теоретические основы методов молекулярного моделирования, которые применялись в исследовании, а также особенности анализа их результатов. В частности, описываются методы расчёта энергий и сил, такие как метод молекулярной механики, методы квантовой химии и их комбинация (КМ/ММ). Особое внимание уделяется расчёту профилей энергии

Гиббса с использованием метода зонтичной выборки и последующему статистическому анализу распределений координат реакций в траекториях. Также в этой главе представлен обзор дескрипторов электронной плотности.

Глава 3 посвящена разработке критерия определения типа механизма ферментативного разрыва Р-О связи. В рамках исследования было проанализировано четырнадцать систем, механизмы реакций которых были классифицированы на основе известных данных и вычисленных энергетических профилей. В процессе анализа были изучены ключевые межатомные расстояния в активном центре ферментов, дескрипторы электронной плотности, рассчитанные в плоскости, вдоль связей и в критических точках, а также порядок связи. Результаты показали, что особенности разрываемой Р-О связи играют ключевую роль в определении механизма реакции. В качестве критериев определения типа механизма реакций разрыва Р-О связи в активных центрах ферментов предложено использовать распределение длины разрываемой связи и профиль лапласиана электронной плотности вдоль разрываемой Р-О связи. В последнем разделе главы предложенные критерии были применены для определения типа механизма реакции фосфорилирования в трёх аденилаткиназах, а также была проведена валидация полученных результатов с помощью молекулярного моделирования реакции переноса фосфатной группы с АТФ на АМФ в активном центре MtAK.

В дальнейших главах (Главы 4-6) показано применение разработанного критерия и углубленное изучение механизмов реакций, таких как гидролиз эфиров фосфорной кислоты в активном центре фосфотриэстера Pd-PTE (Глава 4), фосфорилирование субстрата в протеинкиназе А (Глава 5) и удлинение цепи ДНК в активном центре обратной транскриптазы ORF2p (Глава 6). Данные главы имеют определенную последовательность изложения: подготовка модельных систем и протокол расчетов, применение критериев определения типа механизма, подробное исследование механизмов реакции. Применение предложенных критериев показало, что реакция фосфорилирования в активном

центре протеинкиназы А и удлинение цепи ДНК в активном центре ORF2p протекает по диссоциативному пути, а гидролиз эфиров фосфорной кислоты в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE по ассоциативному. Данные результаты были подтверждены молекулярным моделированием механизмов реакций.

В «Заключении» подводятся итоги исследования, а именно описаны основные результаты по каждому этапу работы. Выводы содержат достаточно полную информацию об основных результатах и соответствуют поставленным задачам, что подтверждает их обоснованность.

В исследовании использованы современные методы описания механизмов реакций в активных центрах ферментов, что подтверждает научную обоснованность полученных результатов. Положения, представленные на защиту, являются достоверными, а полученные данные согласуются с существующими сведениями, представленными в научной литературе и дополняют их. Диссертационная работа прошла апробацию в форме 7 публикаций в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базе данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ) «eLibrary Science Index», а также посредством участия в российских и международных научных конференциях, где было представлено 20 докладов.

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 сред и белковом окружении.

Диссертационная работа Мулашкиной Т. И. выполнена на высоком методологическом уровне и представляет собой фундаментальное исследование в области биохимического моделирования ферментативных реакций.

К ключевым достоинствам работы следует отнести:

1. На основе всестороннего исследования структурно-динамического поведения и электронного строения активного центра фермент-субстратного комплекса автором разработан оригинальный критерий определения типа механизмов реакций с разрывом Р–О-связи. Этот критерий открывает новые возможности для оптимизации моделирования ключевых реакций с участием фосфатов с алкильными и арильными радикалами.
2. В работе проведён развёрнутый анализ механизмов ряда важнейших биохимических процессов: гидролиза фосфатов с органическими радикалами в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE; фосфорилирования субстрата SP20 в активном центре РКА; удлинения цепи ДНК в активном центре ORF2p.
3. Работа отличается целостностью: от постановки проблемы и выбора методов до интерпретации результатов и формулировки выводов. Каждый этап логически связан с предыдущим, что обеспечивает внутреннюю согласованность исследования.

Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации.

Диссертационная работа выполнена на высоком и качественном уровне, однако по работе может быть сделан ряд замечаний.

1. На стр. 14 приводится следующее определение: «Фосфорорганические соединения (ФОС), также известные как органофосфаты, представляют собой сложные эфиры фосфорной кислоты, содержащие алкильные или ароматические заместители». Однако термин «фосфорорганические соединения» значительно шире и обычно употребляется по отношению к различным классам соединений, имеющих связь фосфор-углерод. Термин «органофосфаты» (organophosphates) по отношению к эфирам фосфорной кислоты с органическими заместителями употребляется в англоязычной литературе, в русскоязычной литературе обычно используются термины «фосфаты», «триалкилфосфаты», «триарилфосфаты». Отметим, что в диссертационной работе термины «фосфорорганические соединения» и «органофосфаты» неоднократно используются как синонимы.

2. На стр. 7 цели работы сформулированы чрезмерно лаконично, однако они подробно расшифрованы далее при перечислении поставленных и решенных задач для достижения целей работы.

3. В работе имеется небольшое количество опечаток.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования и относятся главным образом к используемым терминам. 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:

кандидат химических наук, старший научный сотрудник
ведущий научный сотрудник НИЛ медицинской химии
кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза
химического факультета Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования «Московский
государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Палюлин Владимир Александрович

12.12.2025

Контактные данные:

тел: 8 (495) 939-39-69, e-mail: vap@qsar.chem.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
02.00.03 - Органическая химия (хим. науки)

Адрес места работы:

119991, Москва, Ленинские горы, 1, строение 3, ГСП-1, МГУ, химический
факультет

Тел: 8 (495) 939-39-69, e-mail: vap@qsar.chem.msu.ru