

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 Татьяной Игоревной на тему «Определение механизмов разрыва связи Р-О в активных центрах ферментов посредством методов молекулярного моделирования» посвящена исследованию актуальной области знаний. Реакции, в которых участвуют фосфорорганические соединения, играют ключевую роль в многочисленных ферментативных процессах, обеспечивая нормальное функционирование живых организмов, а также применяются для очистки окружающей среды от органофосфатных загрязнений. Механизмы реакций разрыва связи Р-О представляют собой сложные процессы нуклеофильного замещения, протекающие по диссоциативному или ассоциативному механизму. В рамках данного исследования были разработаны критерии для идентификации типа механизма разрыва связи Р-О в фосфорорганических соединениях. Это позволяет оптимизировать исследования в области моделирования ключевых реакций с участием данных соединений. Кроме того, были детально изучены механизмы разрыва связи Р-О, имеющие как фундаментальное, так и прикладное значение. В частности, проводилось исследование реакций гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы бактерии *Pseudomonas diminuta* (Pd-PTE), фосфорилирования субстрата SP20 молекулой аденозинтрифосфата (АТФ) в активном центре протеинкиназы А (РКА), а также удлинения цепи дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) молекулой нуклеотида в активном центре открытого домена обратной транскриптазы белка открытой рамки

считывания 2 (ORF2p). Проведенные исследования дают углубленное понимание механизмов реакций, показывают ключевые факторы, влияющие на кинетику реакции, что открывает перспективы для управления данными процессами..

Диссертация написана в классическом стиле и содержит все необходимые разделы. Во введении обоснована актуальность работы, степень разработанности темы, сформулированы цель и задачи, выделены объекты и предмет исследования, указаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, степень достоверности и апробация результатов, обозначен личный вклад автора и структура и объем диссертации. Объем диссертации составил 145 страниц, содержит 48 рисунков, 12 таблиц и 197 библиографических ссылок.

В первой главе представлен литературный обзор исследований, связанных с выбранным научным направлением. Описаны ферменты, которые катализируют реакции разрыва фосфорорганических соединений по Р-О связи, а также проведен анализ значимых исторических исследований, посвященных классификации механизмов этих реакций. Детально исследованы структурные особенности, каталитические свойства и механизмы реакций в активных центрах таких ферментов, как фосфотриэстераза Pd-PTE, протеинкиназа A и обратная транскриптаза ORF2p.

Вторая глава посвящена теоретическим основам методов молекулярного моделирования, которые использовались в исследовании. Особое внимание уделяется методам расчёта энергий и сил, таким как метод молекулярной механики, методы квантовой химии и комбинированному методу квантовой механики / молекулярной механики. Особое место в главе отводится методам вычисления профилей свободной энергии Гиббса, среди которых выделяется метод зонтичной выборки (Umbrella Sampling). Кроме

того, в данной главе представлен обзор дескрипторов электронной плотности.

Третья глава посвящена разработке критериев для классификации механизмов ферментативного расщепления Р-О связи. В рамках исследования были проанализированы четырнадцать ферментативных систем, механизмы реакций которых классифицировались на основе имеющихся данных и рассчитанных энергетических профилей. В ходе анализа изучались ключевые межатомные расстояния в активных центрах ферментов, дескрипторы электронной плотности в плоскости, вдоль линии разрываемой связи и в критических точках, а также проводился анализ порядка связи двумя методами. Результаты исследования показали, что свойства разрываемой Р-О связи играет ключевую роль в определении механизма ферментативной реакции. На основании полученных данных автором предложено использовать распределение длины разрываемой связи и профиль лапласиана электронной плотности вдоль этой связи в качестве критериев для классификации механизмов реакций расщепления Р-О связи в активных центрах ферментов. В заключении главы предложенные критерии были применены для определения механизма реакции переноса фосфорила в трех аденилаткиназах. Для верификации предложенных критериев проводилось сравнение результатов рассчитанного в данной работе профиля реакции для аденилаткиназы MtAK и предложенных критериев. Таким образом, было установлено, что реакция переноса фосфорила в активном центре аденилаткиназ протекает по диссоциативному типу, а использование предложенных критериев для определения типа механизма дает надежный результат.

В последующих главах (главы 4-6) показано применение разработанного критерия и углубленное изучение механизмов трех ферментативных реакций. Эти главы организованы в определенной последовательности: сначала приводится детализация подготовки

модельных систем и проводимых расчетов, затем применяются критерии для определения типа механизма, и, наконец, проводится подробное исследование механизмов реакций.

Четвертая глава посвящена изучению механизма реакции гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы бактерии *Pseudomonas diminuta* (Pd-PTE). Установлено, что реакция гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE протекает по ассоциативному двухстадийному механизму с образованием пентакоординированного интермедиата, которое сопровождается переносом протона с нуклеофильного гидроксид-аниона на аминокислотный остаток Asp301.

Пятая глава посвящена изучению реакции фосфорилирования субстрата SP20 в активном центре протеинкиназы A (PKA). Показано, что реакция фосфорилирования субстрата SP20 в активном центре протеинкиназы A протекает по диссоциативному согласованному механизму, в качестве акцептора протона выступает остаток аспарагиновой кислоты Asp166, а продуктом реакции является депротонированное состояние фосфорилированного серина.

Шестая глава посвящена изучению реакции удлинения ДНК в активном центре обратной транскриптазы ORF2p. Установлено, что реакция присоединения нуклеотида к ДНК в активном центре ORF2p протекает по согласованному диссоциативному механизму с константой скорости 60 с^{-1} .

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.

Положения, выносимые на защиту достоверны, результаты согласуются и дополняют известную информацию из литературных источников. Работа

выполнена на высоком научно-методическом уровне с применением современных методов описания механизмов реакций в активных центрах ферментов, что подтверждает научную обоснованность полученных результатов. Основное содержание работы представлено в 7 научных статьях в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базе данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ) «eLibrary Science Index». Основные результаты работы были представлены в виде 20 устных и стендовых 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 среды и белковом окружении.

Диссертационная работа Мулашкиной Т.И. выполнена на высоком методологическом уровне и представляет собой комплексное исследование, значимое как в фундаментальном, так и в прикладном аспектах биохимии и молекулярного моделирования. Автором разработан уникальный критерий для определения типов реакций с разрывом Р–О-связи, основанный на детальном исследовании структурно-динамического поведения и

электронного строения активного центра фермент-субстратного комплекса. Этот критерий открывает новые перспективы для оптимизации моделирования ключевых реакций с фосфорорганическими соединениями. Кроме того, в работе проведен всесторонний анализ механизмов нескольких важных биохимических процессов: гидролиза органофосфатов в активном центре фосфотриэстеразы Pd-PTE, фосфорилирования субстрата SP20 в активном центре РКА и удлинения цепи ДНК в активном центре ORF2p.

Следует отдельно подчеркнуть целостность и структурированность работы: каждый этап, начиная с идентификации проблемы и выбора методологического подхода и заканчивая интерпретацией результатов, логически связан с предыдущим, что способствует облегчению восприятия материала.

В тоже время по представленной работе можно сделать ряд замечаний:

1. Несколько неточно описаны основы метода молекулярной динамики на стр. 52. В уравнении Ланжевена почему-то сила трения пропорциональна массе, для случайной силы не сформулированы условия на ее автокорреляционную функцию. Баростат Нозе-Гувера (он же МТТК баростат) сам по себе не предполагает контроль колебаний поршня методом Ланжевена, речь, видимо, о других гибридных алгоритмах.
2. Приводимые в работе погрешности не всегда следуют правилам их представления: погрешность дается до первого значащего знака (за исключением, если этот знак 1), а значение с точностью до разрядов, приводимых значений погрешностей.
3. Автор не везде привел погрешность рассчитанных величин, например в главе 5 не приводится погрешность для рассчитанных энергетических барьеров, а в главе 6 не приводится погрешность для рассчитанной константы скорости
4. В целом вопрос о погрешностях и точности используемых методов обсужден недостаточно. Каковы возможные статистические и

систематические погрешности вычисляемых величин, как их оценить? Например, в таблицах 3.5.1, 3.5.2 данные приводятся без оценки погрешностей.

5. Аналогичные вопросы возникают к рассчитанным профилям энергии Гиббса (напр. Рис. 4.3.1). Насколько точны эти числа? Если взять различные кадры из молекулярной динамики, или различные экспериментальные структуры воспроизведутся ли значения? Как они зависят от выбранного базиса и функционала? А какова статистическая погрешность при вычислении энергии? Вообще приводимая точность задания величин в 0.1 ккал/мол – считается очень высокой, действительно ли так точно удастся определить?
6. В работе автор для расчетов использует функционал PBE0 в сочетании с базисным набором 6-31G**. Хотелось бы, чтобы больше внимания было уделено обоснованию выбора функционала и базисного набора. Может ли увеличение базисного набора дать более точные результаты? Насколько чувствительны рассчитанные дескрипторы электронной плотности, порядки связи и профили энергии Гиббса к выбранному методу расчета?
7. В работе приведены результаты КМ/ММ-МД моделирования, которое осуществлялось в течении 5-10 пс. Современные вычислительные мощности позволяют проводить более длинные динамические исследования. Могли ли быть получены распределения расстояний по более длинным динамикам и повлияло ли бы это на результат? А также влияет ли длина траектории на получаемые профили энергии Гиббса?

Вместе с тем, 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, член-корреспондент РАН
профессор кафедры биоинженерии

биологического факультета

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова»

Шайтан Алексей Константинович

12.12.2025

Контактные данные:

тел: 8 (495) 939-57-38, e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация:

03.01.09 - Математическая биология, биоинформатика (физ.-мат. науки)

Адрес места работы:

119991, Москва, Ленинские горы, 1, строение 3, ГСП-1, 119234, г. Москва,
Ленинские горы, 1, строение 73, МГУ, биологический факультет

Тел: 8 (495) 939-57-38, e-mail: