

©Коллектив авторов

## КОНФОРМАЦИОННАЯ ДИНАМИКА ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНОГО КОМПЛЕКСА ПРОТЕИНКИНАЗЫ А С ПСЕВДОСУБСТРАТОМ SP20 И АДЕНОЗИНТРИФОСФАТОМ

Т.И. Мулашкина<sup>1\*</sup>, М.С. Леонова<sup>1,2</sup>, М.Г. Хренова<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3; \*эл. почта: mulashkinati@my.msu.ru

<sup>2</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

<sup>3</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии: Российской академии наук, 119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, стр. 2

Реакция фосфорилирования, катализируемая ферментом протеинкиназой А (ПКА), является одной из ключевых в работе глутаматергической системы — базовой системы памяти. Анализ динамического поведения фермент-субстратного комплекса позволяет во многом судить о дальнейшем механизме ферментативной реакции. По результатам классических молекулярно-динамических расчётов с последующей иерархической кластеризацией показано, что наиболее предпочтительным акцептором протона в ходе реакции фосфорилирования ПКА является карбоксильная группа аминокислотного остатка Asp166, однако акцептором также может выступать  $\gamma$ -фосфатная группа АТР.

**Ключевые слова:** протеинкиназа А; молекулярная динамика; конформации; фермент-субстратный комплекс; АТР

**DOI:** 10.18097/PBMC20247006421

### ВВЕДЕНИЕ

Нормальная деятельность центральной нервной системы (ЦНС) обеспечивается балансом глутаминовой кислоты (Glu) и  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК). 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. В настоящее время глутаматергическая система не так детально изучена, как другие системы мозга; тем более, недостаточно изучены химические реакции с нейромедиаторами и сопутствующими химическими частицами, катализируемыми ферментами системы [1, 2].

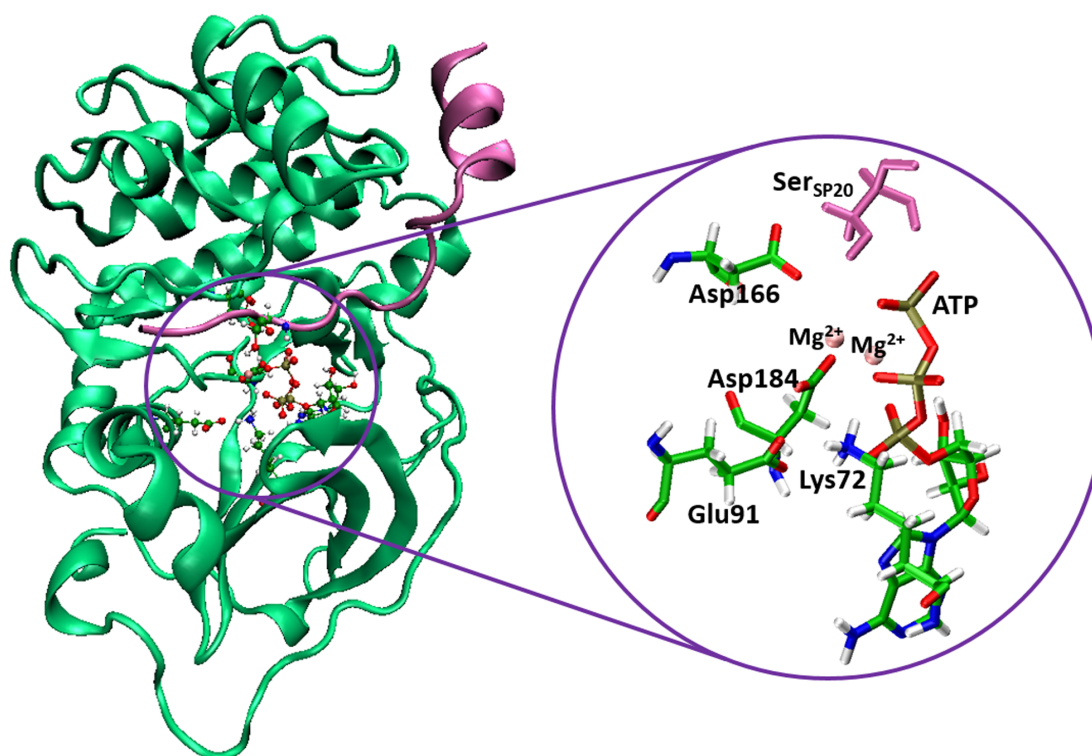
Одним из важных ферментов, который участвует в работе глутаматергической системы, является протеинкиназа А (РКА). РКА катализирует реакцию фосфорилирования гидроксильных групп серина или треонина в калиевых каналах, что приводит к высвобождению ионов  $K^+$  через ионный канал и к генерации потенциала на мембране с внутриклеточной стороны [1]. Кроме того, фосфорилирование в принципе является терапевтической мишенью для лечения большого числа заболеваний таких как онкологические, воспалительные, иммунные и нейродегенеративные [3].

ПКА представляет собой гетеротетрамер [4], состоящий из двух регуляторных и двух каталитических субъединиц. Каталитическая субъединица состоит из малой доли (N-доля),

большой доли (С-доля) и петли между ними. Малая доля включает в себя большое число остатков, связывающихся с АТР, в то время как большая доля предоставляет поверхность для связывания с фосфорилируемыми субстратами. Основание петли между малой и большой долями образует глубокий, преимущественно гидрофобный карман для аденинового кольца АТР. Именно в этой области происходит ферментативная реакция, обеспечивающая перенос фосфатных групп с АТР на субстрат [5].

В активном центре РКА ионы  $Mg^{2+}$  координируются различными лигандами, включая фосфатные группы АТР, аминокислотные остатки и фосфорилированные субстраты (рис. 1). Такая координация металлов помогает стабилизировать реактанты и содействует реакции переноса фосфорила. Кроме того, в активном центре содержится каталитическая триада аминокислотных остатков, необходимых для каталитической активности. Каталитическая триада обычно включает такие остатки, как Lys72, Glu91 в N-доле и Asp184 в большой доле, которые совместно связывают АТР и ориентируют фосфатные группы для переноса на белковый субстрат. Остатки аспартата, такие как Asp166, в активном сайте РКА катализируют реакцию переноса фосфорильного остатка. Эти остатки играют важнейшую роль в захвате протонов, облегчении нуклеофильной атаки и стабилизации переходных состояний [5–7].

Механизм реакции фосфорилирования может относиться либо к диссоциативному, либо к ассоциативному типу [7]. При ассоциативном механизме нуклеофильная атака происходит до разрыва связи Р-О, вследствие чего формируется пентакоординированное переходное состояние.



**Рисунок 1.** Слева показана структура фермента РКА (зелёным) с олигопептидным псевдосубстратом SP20 (розовая спираль). Справа показаны ключевые аминокислотные остатки каталитической субъединицы, катионы магния, АТР и остаток серина псевдосубстрата SP20. Здесь и далее зелёным – углерод, красным – кислород, белым – водород, розовым – магний, фосфор – оранжевым и синим – азот. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии статьи на сайте журнала.

При диссоциативном механизме разрыв связи Р-О предшествует образованию связи между фосфором и нуклеофилом, поэтому переходное состояние представляет собой метафосфат.

Важным аспектом при изучении реакции фосфорилирования является определение акцептора протона с гидроксильной группы остатка серина субстрата в начале реакции, что, в свою очередь, определяет исходную структуры фермент-субстратного комплекса для моделирования химических стадий. Поэтому в данной работе определены и сопоставлены возможные конформации активного центра протеинкиназы А в комплексе с АТР и псевдосубстратом SP20. Для этого рассчитаны протяжённые классические молекулярно-динамические траектории и проведена последующая иерархическая кластеризация. Использование данного подхода позволило определить три возможные конформации фермент-субстратного комплекса.

## МЕТОДИКА

В качестве начального приближения для координат системы использовали кристаллическую структуру РКА в комплексе с олигопептидным псевдосубстратом SP20 (PDB ID: 4IAC) [4]. В исходной структуре модифицировали  $\beta,\gamma$ -метил-АТР в АТР, фосфорилированное состояние остатков pSer139, pThr197 и pSer338 сохранили. С помощью программы Reduce [8] добавляли атомы водорода к ионным группам белка таким образом,

чтобы протонированные формы аминокислот с ионными группами соответствовали рН 7. Протонированное состояние боковых цепей остатков гистидина определялось их локальным окружением; остаток His87 моделировали в положительно заряженной протонированной форме, остальные остатки гистидина — в нейтральной.

Полученный комплекс фермента сольватировали молекулами воды таким образом, чтобы расстояние от атомов белка до границы ячейки в виде прямоугольного параллелепипеда составляло не менее 10 Å, при этом для нейтрализации заряда в систему добавили четыре хлорид-аниона. Подготовку полноатомной модели системы, а также визуализацию и анализ структуры осуществляли в программе VMD [9].

Молекулярно-динамическое (МД) моделирование проводили в два этапа. На первом этапе сольватную оболочку релаксировали с помощью классического МД-моделирования в программе NAMD [10]. Для описания фермента и псевдосубстрата применяли силовое поле CHARMM36 [11], для молекулы АТР — CGenFF [12] и для молекул воды — TIP3P [13]. Длина МД-траектории с фиксированными атомами белка и субстрата равнялась 1 нс, что позволило объёму системы прийти к равновесному значению, относящемуся к давлению 1 атм. Размер системы составил  $75 \times 73 \times 88$  Å<sup>3</sup>. Затем проводили серию из четырёх МД-моделирований по 250 нс. Таким образом, для анализа были получены 40000 кадров МД-траектории.

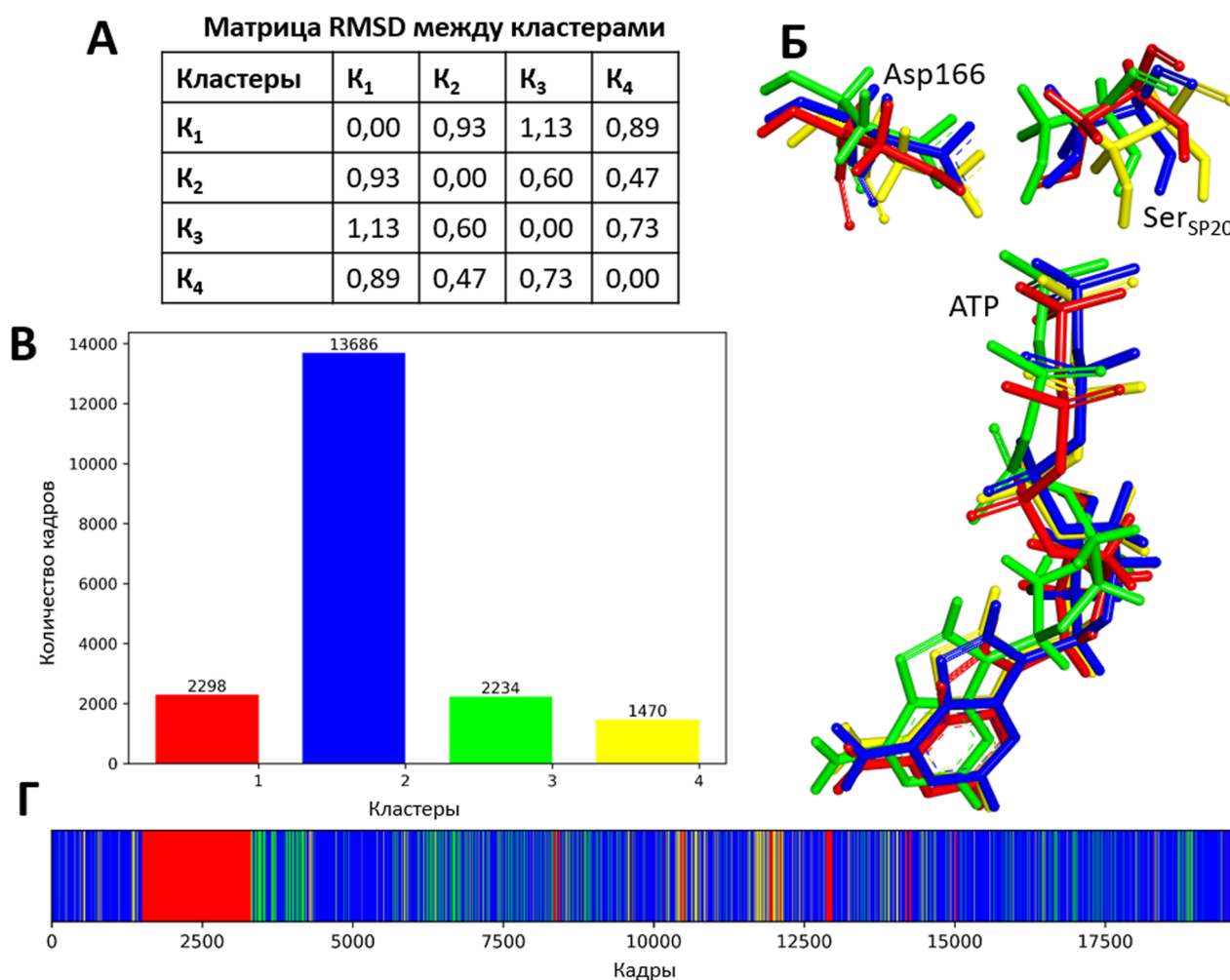
Все описанные МД расчёты проводили в изотермически-изобарическом ансамбле NPT при температуре 298 К и давлении 1 атм, которые поддерживали постоянными с помощью термостата Ланжевена [14] и баростата Нозе-Гувера [15, 16] соответственно, шаг интегрирования составлял 1 фс.

Для определения возможных конформаций белкового субстрата и АТФ в активном центре РКА провели иерархическую кластеризацию траекторий молекулярной динамики с помощью инструмента TtClust [17]. Кластеризация была проведена только по молекулярным фрагментам, которые непосредственно могут участвовать в реакции, а именно АТФ, остаток серина субстрата SP20 (Ser<sub>SP20</sub>) и остаток аспарагиновой кислоты Asp166, которая, вероятно, является акцептором протона гидроксильной группы серина в ходе реакции. Для этого для МД траектории, полученной объединением всех траекторий, было выполнено выравнивание по основной цепи белка и рассчитано RMSD между парами кадров для выбранных молекулярных фрагментов. Для всех расчётов матриц связей использовался алгоритм Уорда [18].

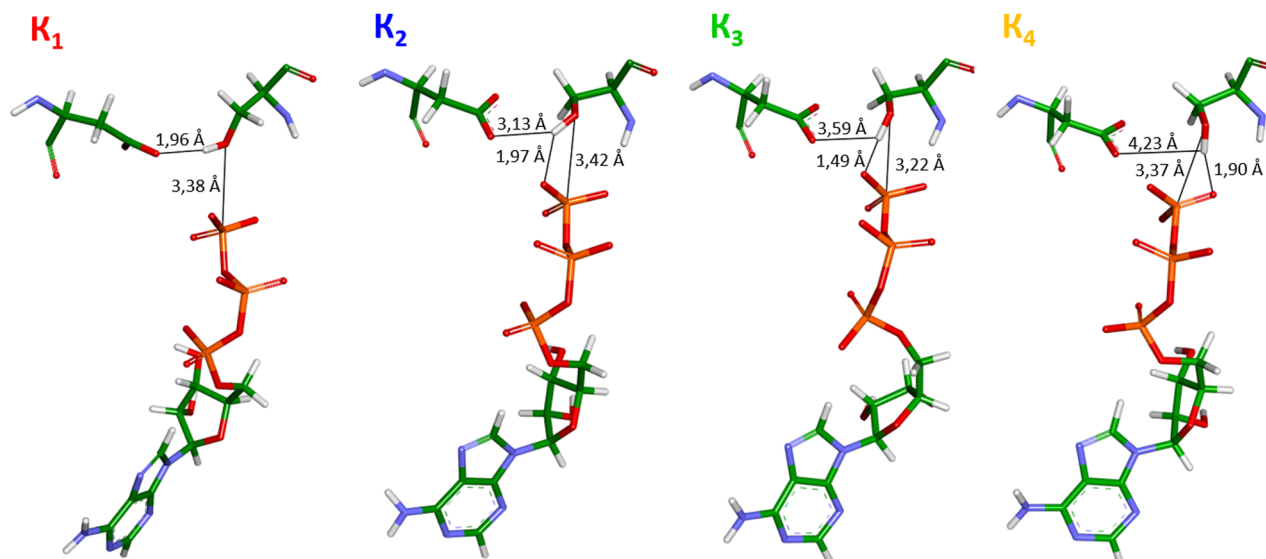
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты иерархической кластеризации в программе TtClust приведены на рисунке 2. Получено четыре кластера, отвечающие различным конформациям АТФ и остатков Asp166, Ser<sub>SP20</sub> со средним RMSD равным 0,79. Из наложения репрезентативных кадров (рис. 2Б) видно, что данные кластеры отличаются в основном конформацией серина субстрата Ser<sub>SP20</sub>, а именно положением гидроксильной группы относительно атомов кислорода аспарагиновой кислоты и трифосфата АТФ. Наиболее часто реализуемая конформация в ходе динамики — это K<sub>2</sub>, остальные конформации встречаются практически с равной частотой (рис. 2В). Из матрицы RMSD между кластерами (рис. 2А) видно, что наименьшие RMSD (0,60 и 0,47) наблюдаются между конформациями K<sub>2</sub> и K<sub>3</sub> и K<sub>2</sub> и K<sub>4</sub> соответственно.

Подробное сравнение репрезентативных структур, отвечающих различным кластерам, показано на рисунке 3. Действительно, сравнение K<sub>2</sub> и K<sub>3</sub> показывает, что это очень похожие структуры.



**Рисунок 2.** А) RMSD между кластерами K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub> и K<sub>4</sub>; Б) Наложение репрезентативных кадров кластеров; В) Гистограмма количества кадров внутри кластеров; Г) Развёртка по кластерам вдоль молекулярно-динамической траектории. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии статьи на сайте журнала.



**Рисунок 3.** Репрезентативные кадры кластеров, отвечающих различным конформациям АТР и остатков Asp166 и Ser<sub>SP20</sub>. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии статьи на сайте журнала.

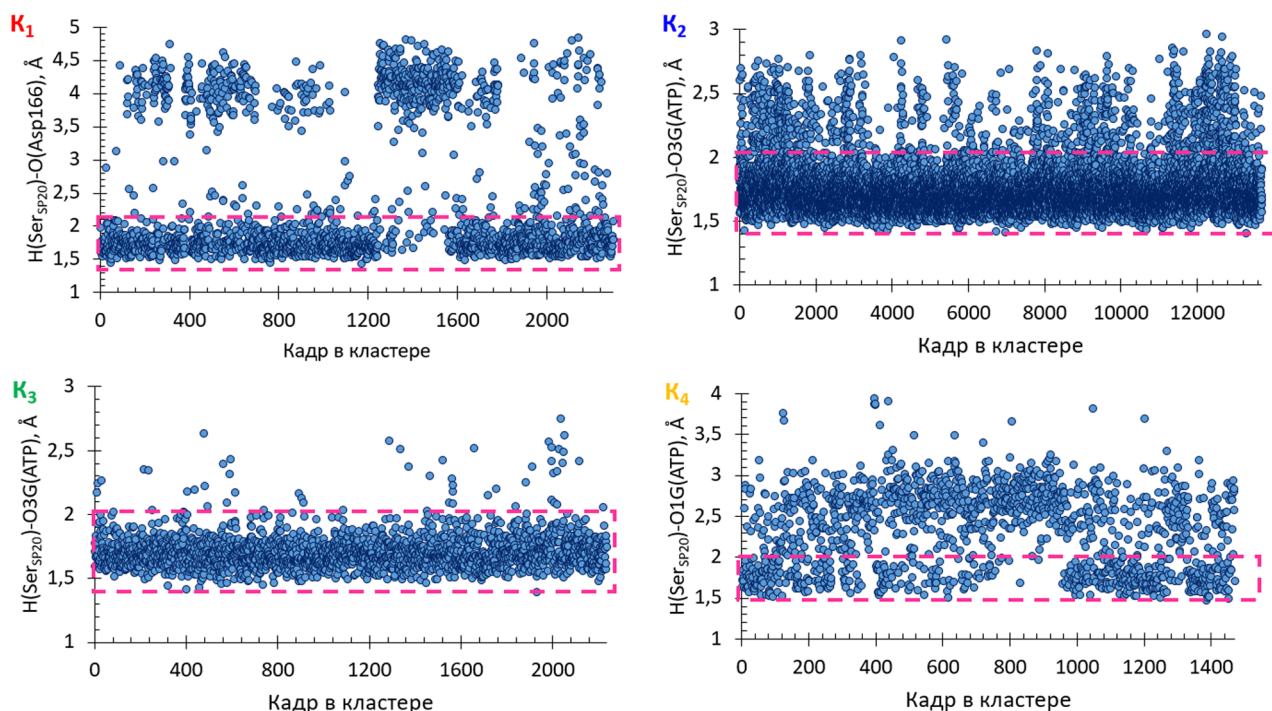
**Таблица 1.** Средние значения и стандартные отклонения для расстояний между протоном гидроксо-группы серина субстрата SP20 (H(Ser<sub>SP20</sub>)) и кислородами Asp166 (O(Asp166)) и фосфатного хвоста (O3G(ATP) и O1G(ATP)), полученные для каждого кластера (K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub> и K<sub>4</sub>)

	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	K <sub>4</sub>
H(Ser <sub>SP20</sub> )-O(Asp166), Å	2,45±1,08	3,75±0,30	3,64±0,35	4,08±0,56
H(Ser <sub>SP20</sub> )-O3G(ATP), Å	3,01±0,26	1,76±0,21	1,71±0,14	2,07±0,40
H(Ser <sub>SP20</sub> )-O1G(ATP), Å	3,23±0,90	2,60±0,30	2,70±0,24	2,33±0,50

В данных конформациях атом водорода гидроксильной группы остатка серина направлен в сторону кислорода γ-фосфатной группы, что позволяет сделать предположение о том, что кислород фосфатной группы может являться акцептором протона в ходе реакции. В случае K<sub>3</sub> расстояние между протоном и кислородом фосфатной группы меньше чем в случае K<sub>2</sub>, а также наблюдается и меньшее расстояние нуклеофильной атаки. Однако, исходя из структуры, неподеленная пара кислорода серина не ориентирована на атом фосфора в кластере K<sub>3</sub>, что осложняет нуклеофильную атаку. В кластере K<sub>2</sub> неподеленная пара ориентирована на атом фосфора, что способствует инициированию реакции. В состоянии K<sub>4</sub> атом водорода гидроксильной группы остатка серина образует водородную связь с другим кислородом фосфатной группы, однако несмотря на небольшое расстояние нуклеофильной атаки, при данной конформации нуклеофил развернут от атома фосфора. В связи с этим, рассматривать данную конформацию фермент-субстратного комплекса как реакционноспособную не стоит. Скорее всего, реакционноспособной конформацией является K<sub>1</sub>, так как при данной конформации наблюдается небольшое расстояние нуклеофильной атаки, атом водорода гидроксильной группы образует водородную связь с Asp166, который является хорошим акцептором протона, а также нуклеофил правильно ориентирован относительно атома фосфора АТР.

Таким образом, главным различием между конформациями является расположение протона серина субстрата (H(Ser<sub>SP20</sub>)) относительно кислорода Asp166 (O(Asp166)) фосфатного хвоста (O3G(ATP) и O1G(ATP)), что характеризуется различными расстояниями между соответствующими атомами. Помимо определения данных расстояний в репрезентативных структурах, были получены средние значения и стандартные отклонения для расстояний для всех структур каждого кластера (табл. 1). Из полученных данных видно, что среднее значение расстояний H(Ser<sub>SP20</sub>)-O(Asp166) для K<sub>1</sub> и H(Ser<sub>SP20</sub>)-O1G(ATP) для K<sub>4</sub> сильно больше чем эти значения в репрезентативных структурах, а также наблюдается большой доверительный интервал. Кроме того, сравнивая средние значения расстояний H(Ser<sub>SP20</sub>)-O3G(ATP) и H(Ser<sub>SP20</sub>)-O1G(ATP), можно сказать, что K<sub>4</sub> представляет собой набор структур похожих на репрезентативные структуры для K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub> и K<sub>4</sub>. Это также подтверждается распределением расстояния H(Ser<sub>SP20</sub>)-O1G(ATP), которое представлено на рисунке 4. Для K<sub>4</sub> репрезентативной структуре отвечает только 35% кадров из кластера. Также частые отклонения от репрезентативной структуры наблюдаются для K<sub>1</sub> (63% кадров отвечают репрезентативной структуре). Наибольшее соответствие кадров кластеров репрезентативным структурам наблюдается для K<sub>2</sub> и K<sub>3</sub> — 98% и 97% соответственно.





**Рисунок 4.** Распределения расстояний между протоном гидроксо-группы серина субстрата SP20 ( $H(Ser_{SP20})$ ) и кислородами Asp166 ( $O(Asp166)$ ) и фосфатного хвоста ( $O3G(ATP)$  и  $O1G(ATP)$ ), полученные для каждого кластера ( $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$  и  $K_4$ ). Розовой пунктирной линией выделен диапазон значений, отвечающих репрезентативным кадрам. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии статьи на сайте журнала.

Кроме того, был проведён анализ геометрических параметров. На рисунке 5 представлено распределение двугранного угла OG-CB-CA-N серина субстрата ( $\angle O(Ser_{SP20})$ ) от расстояний между атомом водорода гидроксильной группы  $Ser_{SP20}$  и кислородами Asp166 и  $\gamma$ -фосфатной группы ATP. Из рисунка 5А видно, что кластеру  $K_1$  соответствует область со значениями  $\angle O(Ser_{SP20})$  от  $-20^\circ$  до  $-90^\circ$  и расстояниям между атомом водорода и Asp166 в 1,4–2,5 Å. Однако различить конформации  $K_{2/3}$  и  $K_4$  на основании этих геометрических критериев невозможно, так как в этих конформациях  $\angle O(Ser_{SP20})$  может принимать значения как от  $20^\circ$  до  $90^\circ$ , так и от  $-40^\circ$  до  $-90^\circ$ . Причём из рисунка 5Б видно, что  $K_{2/3}$  соответствуют, в основном, положительные значения двугранного угла, тогда как для  $K_4$  почти в равной степени отвечают геометрии с разными  $\angle O(Ser_{SP20})$ . Таким образом, данные геометрические параметры позволяют чётко отделить  $K_1$  от остальных состояний. Попытки найти другие геометрические критерии, отвечающие разным конформациям, дали схожие результаты. Таким образом, не были обнаружены геометрические критерии, позволяющие различать конформации  $K_{2/3}$  и  $K_4$  между собой.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Для фермент-субстратного комплекса протеинкиназы А с АТФ в активном центре проведён анализ молекулярно-динамических траекторий методами иерархической кластеризации. Данный подход позволил обнаружить четыре различные

конформации АТФ и остатков Asp166 и  $Ser_{SP20}$  в активном центре РКА, участвующих в ферментативной реакции. Данные конформации отличаются положением гидроксильной группы серина псевдосубстрата SP20. В качестве возможных акцепторов протона обнаружены атомы кислорода аспарагиновой кислоты и  $\gamma$ -фосфатной группы АТФ. Вероятнее всего, наиболее реакционноспособной конформацией является та, в которой атом водорода гидроксильной группы образует водородную связь с кислородом Asp166.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

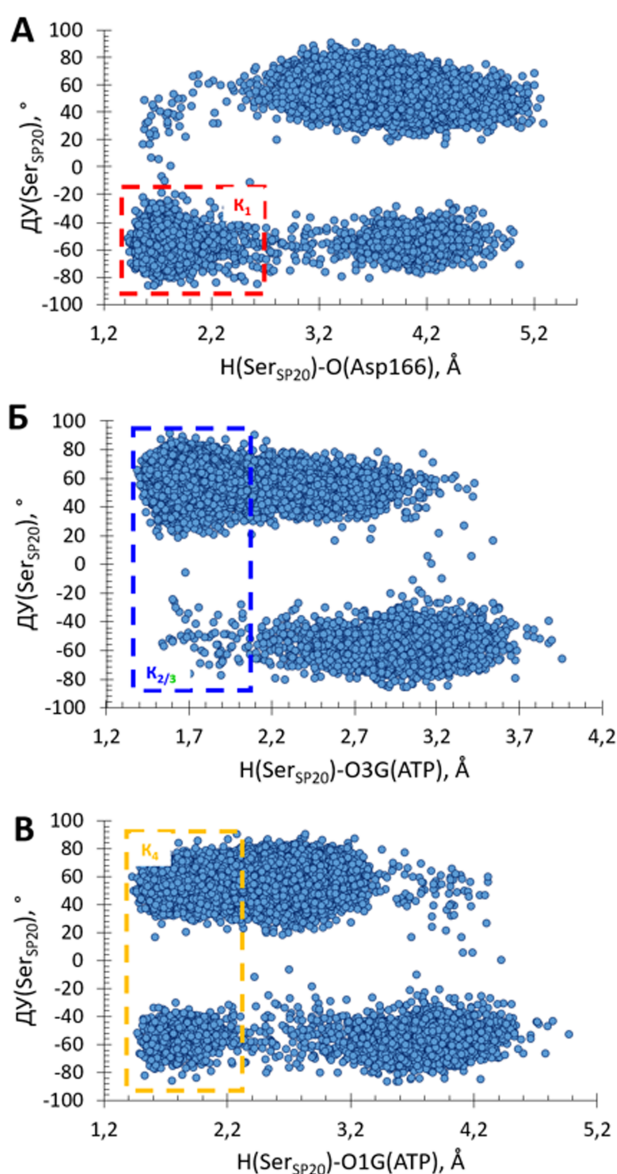
Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 23-13-00011, участник М.Л.).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.



**Рисунок 5.** Значения двугранного угла OG-CB-CA-N серина субстрата ( $\Delta U(\text{Ser}_{\text{SP}20})$ ) и расстояния между атомом водорода гидроксильной группы и кислородом Asp166 и  $\gamma$ -фосфатной группы АТР.  $K_1$ ,  $K_{2/3}$ ,  $K_4$  – конформации фермент-субстратного комплекса PKA.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Arnsten A.F.T., Wang M. (2020) The evolutionary expansion of mGluR3-NAAG-GCPII signaling: Relevance to human intelligence and cognitive disorders. *Am. J. Psychiatry*, **177**(12), 1103–1106. DOI: 10.1176/appi.ajp.2020.20101458
2. Gasiorowska A., Wydrych M., Drapich P., Zadrozny M., Steczkowska M., Niewiadomski W., Niewiadomska G. (2021) The biology and pathobiology of glutamatergic, cholinergic, and dopaminergic signaling in the aging brain. *Front. Aging Neurosci.*, **13**, 654931. DOI: 10.3389/fnagi.2021.654931
3. Pang K., Wang W., Qin J.-X., Shi Z.-D., Hao L., Ma Y.-Y., Xu H., Wu Z.-H., Pan D., Chen Z.-S., Han C.-H. (2022) Role of protein phosphorylation in cell signaling, disease, and the intervention therapy. *MedComm*, **3**(4), e175. DOI: 10.1002/mco2.175

4. Gerlits O., Waltman M.J., Taylor S., Langan P., Kovalevsky A. (2013) 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*, **52**(21), 3721–3727. DOI: 10.1021/bi400066a
5. Johnson D.A., Akamine P., Radzio-Andzelm E., Madhusudan M., Taylor S.S. (2001) Dynamics of cAMP-dependent protein kinase. *Chem. Rev.*, **101**(8), 2243–2270. DOI: 10.1021/cr000226k
6. Adams J.A. (2001) Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem. Rev.*, **101**(8), 2271–2290. DOI: 10.1021/cr000230w
7. Taylor S.S., Yang J., Wu J., Haste N.M., Radzio-Andzelm E., Anand G. (2004) PKA: A portrait of protein kinase dynamics. *Biochim. Biophys. Acta*, **1697**(1–2), 259–269. DOI: 10.1016/j.bbapap.2003.11.029
8. Word J.M., Lovell S.C., Richardson J.S., Richardson D.C. (1999) Asparagine and glutamine: Using hydrogen atom contacts in the choice of side-chain amide orientation. *J. Mol. Biol.*, **285**(4), 1735–1747. DOI: 10.1006/jmbi.1998.2401
9. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.*, **14**(1), 33–38. DOI: 10.1016/0263-7855(96)00018-5
10. Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kalé L., Schulten K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.*, **26**(16), 1781–1802. DOI: 10.1002/jcc.20289
11. Best R.B., Zhu X., Shim J., Lopes P.E.M., Mittal J., Feig M., MacKerell A.D. (2012) Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone  $\phi$ ,  $\psi$  and side-chain  $\chi_1$  and  $\chi_2$  dihedral angles. *J. Chem. Theory Comput.*, **8**, 3257–3273. DOI: 10.1021/ct300400x
12. Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C., Kundu S., Zhong S., Shim J., Darian E., Guvench O., Lopes P., Vorobyov I., Mackerell A.D. (2009) CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J. Comput. Chem.*, **31**, 671–690. DOI: 10.1002/jcc.21367
13. Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, **79**, 926–935. DOI: 10.1063/1.445869
14. Quigley D., Probert M.I.J. (2004) Langevin dynamics in constant pressure extended systems. *J. Chem. Phys.*, **120**(24), 11432–11441. DOI: 10.1063/1.1755657
15. Martyna G.J., Tobias D.J., Klein M.L. (1994) Constant pressure molecular dynamics algorithms. *J. Chem. Phys.*, **101**(5), 4177–4189. DOI: 10.1063/1.467468
16. Feller S.E., Zhang Y., Pastor R.W., Brooks B.R. (1995) Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. *J. Chem. Phys.*, **103**(11), 4613–4621. DOI: 10.1063/1.470648
17. Tubiana T., Carvaille J.-C., Boulard Y., Bressanelli S. (2018) TTClust: A versatile molecular simulation trajectory clustering program with graphical summaries. *J. Chem. Inf. Model.*, **58**(11), 2178–2182. DOI: 10.1021/acs.jcim.8b00512
18. Ward J.H. Jr. (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.*, **58**, 236–244. DOI: 10.1080/01621459.1963.10500845

Поступила в редакцию: 30. 10. 2024.  
После доработки: 17. 11. 2024.  
Принята к печати: 19. 11. 2024.

## CONFORMATIONAL DYNAMICS OF THE ENZYME-SUBSTRATE COMPLEX OF PROTEIN KINASE A WITH PSEUDOSUBSTRATE SP20 AND ADENOSINE TRIPHOSPHATE

*T.I. Mulashkina<sup>1,\*</sup>, M.S. Leonova<sup>1,2</sup>, M.G. Khrenova<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University,  
1/3 Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia; \*e-mail: mulashkinati@my.msu.ru

<sup>2</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences,  
4 Kosygina str., Moscow, 119334 Russia

<sup>3</sup>Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology"  
of the Russian Academy of Sciences, 33 Leninsky ave., Moscow, 119071 Russia

The phosphorylation reaction, catalyzed by the enzyme protein kinase A (PKA), plays one of the key roles in the work of the glutamatergic system, primarily involved in memory functioning. The analysis of the dynamic behavior of the enzyme-substrate complex allows one to learn the mechanism of the enzymatic reaction. According to the results of classical molecular dynamics calculations followed by hierarchical clustering, the most preferred proton acceptor during the phosphorylation reaction catalyzed by PKA is the carboxyl group of the amino acid residue Asp166; however, the  $\gamma$ -phosphate group of ATP can also act as an acceptor.

*The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.*

**Key words:** protein kinase A; molecular dynamics; conformations; enzyme-substrate complex; ATP

**Funding.** The study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 23-13-00011, to M.L.).

Received: 30.10.2024; revised: 17.11.2024; accepted: 19.11.2024.