

Міністерство освіти і науки України  
Національний університет «Києво-Могилянська академія»  
Факультет природничих наук  
Кафедра хімії

**Магістерська робота**

освітній ступінь - магістр

на тему: «ДОСЛІДЖЕННЯ СЕЛЕКТИВНОСТІ У РЕАКЦІЯХ  
ПРЕБІОТИЧНОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ ОРГАНІЧНИХ МОЛЕКУЛ»

Виконала: студентка 2-го року навчання,  
Спеціальності 102-Хімія

Железняк Алла Романівна *Железняк*

Науковий керівник: Бакалінська О.М.  
кандидат хімічних наук, доцент *Бакалінська*

Рецензент Журавський С.В. *Журавський*  
канд.хім.наук, н.с. (прізвище і підпис)

Магістерська робота захищена  
з оцінкою « *Відмінно* »

*Амур* Секретар ЕК: Мурланова Т.В.  
«08» *червня* 2023 р.

Міністерство освіти і науки України  
Національний університет «Києво-Могилянська академія»  
Факультет природничих наук  
Кафедра хімії

**Магістерська робота**

освітній ступінь - магістр

на тему: «ДОСЛІДЖЕННЯ СЕЛЕКТИВНОСТІ У РЕАКЦІЯХ  
ПРЕБІОТИЧНОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ ОРГАНІЧНИХ МОЛЕКУЛ»

Виконала: студентка 2-го року навчання,  
Спеціальності 102-Хімія

Желізняк Алла Романівна

Науковий керівник: Бакалінська О.М.  
кандидат хімічних наук, доцент

Рецензент Журавський С.В. \_\_\_\_\_  
канд.хім.наук, н.с. (прізвище і підпис)

Магістерська робота захищена  
з оцінкою «\_\_\_\_\_»

Секретар ЕК: Мурланова Т.В.  
«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 р.

Київ – 2023

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	6
1.1. Поняття пребіотичної хімії.....	6
1.1.1 Ключові концепції та теорії пребіотичної хімії.....	7
1.2. Фосфорилування у пребіотичних умовах.....	14
1.3. Роль фосфору та його сполук у процесах виникнення життя.....	19
1.3.1. Біологічна значимість фосфору.....	22
1.3.2. Доступність фосфору на ранніх етапах існування Землі.....	25
1.4. Імідазолфосфат кальцію як агент фосфорилування.....	27
1.4.1. Особливості електронної будови молекули імідазолфосфату кальцію.....	28
1.5. Пребіотичні органічні молекули: визначення та властивості.....	29
1.6. Потенційні механізми процесів фосфорилування.....	32
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	34
2.1. Об'єкти дослідження.....	34
2.1.1. Обладнання, реактиви та матеріали.....	34
2.2. Синтез агента фосфорилування.....	35
2.2.1. Методика Розенберга.....	36
2.2.2. Методика Купермана.....	38
2.3. Методи дослідження будови синтезованих сполук.....	39
2.3.1. Метод ядерного магнітного резонансу.....	39
2.3.2. Вимірювання часу релаксації T1 для кількісних експериментів ЯМР <sup>31</sup> P.....	40

2.4. Метод дослідження селективного фосфорилування пребіотично важливих органічних молекул у пасті .....	40
2.5. Визначення виходу реакцій за допомогою спектроскопії $^{31}\text{P}$ ЯМР ....	43
2.5.1. Солубілізація солей фосфату кальцію при використанні хелатуючого буфера .....	43
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ .	46
3.1. Одержання імідазолфосфату кальцію .....	46
3.1.1. Синтез дифосфоімідазолу кальцію .....	47
3.1.2. Синтез імідазолфосфату кальцію .....	48
3.2. Підтвердження будови синтезованих речовин .....	50
3.2.1. Аналіз ЯМР-спектрів дифосфоімідазолу кальцію .....	50
3.2.2. Аналіз ЯМР-спектрів імідазолфосфату кальцію .....	52
3.3. Дослідження кінетики у реакціях селективного фосфорилування органічних молекул .....	55
3.3.1. Фосфорилування у системі гліцерол - глюкоза .....	56
3.3.2. Фосфорилування у системі гліцерол - цитидинмонофосфат .....	59
3.3.3. Фосфорилування у системі гліцерол - уридинмонофосфат .....	62
3.3.4. Фосфорилування у системі гліцерол - дигідроксиацетон .....	65
3.3.5. Фосфорилування у системі гліцерол - гліцерат .....	68
3.4. Дослідження впливу каталізаторів на селективність реакцій пребіотичного фосфорилування .....	71
ВИСНОВКИ .....	80
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	82

## ВСТУП

Дослідження процесів зародження життя захоплювало вчених протягом століть, і вивчення хімічних реакцій, пов'язаних із появою живого на Землі, продовжує стимулювати дослідження у різних сферах науки. Серед багатьох фундаментальних хімічних процесів, які сформували пребіотичний світ, фосфорилування виділяється як одна з вирішальних хімічних реакцій. Фосфорилування – трансфер фосфатних груп до органічних молекул, відіграло ключову роль у формуванні багатьох важливих біомолекул, необхідних для становлення життя. Розуміння селективності реакцій фосфорилування є центральним напрямом досліджень у галузі хімії пребіотиків.

Реакції фосфорилування у пребіотичних системах виявляють певну селективність: одні нуклеофіли здатні реагувати з фосфорилуючими агентами, тоді як інші виявляють обмежену реакційну здатність або не виявляють її зовсім. Прагнення визначити фактори, які впливають на вибірковість у реакціях фосфорилування, стимулювало численні дослідження, спрямовані на те, аби встановити складні біохімічні шляхи, які привели до виникнення молекул життя.

Численні експериментальні дослідження були спрямовані на вивчення механізмів процесу фосфорилування, пропонуючи розуміння складної взаємодії між реагентами і каталізаторами у м'яких, пребіотично вірогідних умовах реакції. Крім того, дослідники зосереджувались на з'ясуванні каталітичних ефектів біомолекул, таких як цукри, нуклеотиди, амінокислоти та пептиди, а також на підвищенні селективності у реакціях фосфорилування. Серед цих біомолекул особливу увагу привернули гістидил-пептиди через їхню потенційну каталітичну роль у процесах фосфорилування. Розуміння впливу таких каталізаторів на селективність та ефективність реакцій фосфорилування може дати важливу інформацію про хімічні шляхи, що привели до утворення біологічно значущих молекул.

Аналізуючи результати досліджень фосфорилування органічних молекул, можна досягти всебічного розуміння селективності цих процесів у пребіотичних

системах. Ці знання потенційно можуть дати ключове уявлення про хімічну еволюцію життя та появу складних біомолекулярних структур із більш простих попередників.

**Актуальність.** Оскільки процеси зародження живого ще не повністю вивчені, аналіз пребіотичного фосфорилування молекул є актуальним напрямком досліджень, який може допомогти у визначенні необхідних умов для формування життя на Землі та інших планетах, а також з'ясуванні того, які біохімічні процеси передували еволюції.

Окрім цього, розуміння всіх аспектів селективного фосфорилування має потенційне практичне застосування у сфері розробки нових методів синтезу біологічно активних сполук та лікарських засобів. Отже, дослідження селективності у реакціях пребіотичного фосфорилування органічних молекул є важливим як з наукової, так і з прикладної точки зору.

**Метою** роботи був синтез імідазолфосфату кальцію як основного агента фосфорилування; з'ясування впливу гістидил-пептидних каталізаторів (His, His-Asp, His-Lys) на селективність процесів трансферу фосфатної групи у реакціях фосфорилування за участі триатомних спиртів, моносахаридів, нуклеотидів, алкоголятів (гліцерол, глюкоза, цитидинмонофосфат, уридинмонофосфат, гліцерат та дигідроксиацетон).

Для досягнення поставленої мети необхідно виконати такі завдання:

- синтезувати та підтвердити будову агента фосфорилування – імідазолфосфату кальцію;
- оптимізувати методологію кількісної оцінки фосфорильованих нуклеофілів за даними ЯМР-спектроскопії;
- кількісно дослідити та порівняти вплив гістидил-пептидних каталізаторів (His, His-Asp, His-Lys) на селективність фосфорилування за наявності у реакційному середовищі декількох нуклеофілів (гліцерол, глюкоза, ЦМФ, УМФ, гліцерат, дигідроксиацетон) та провести аналіз отриманих результатів.

## РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

### 1.1. Поняття пребіотичної хімії

Пребіотична хімія – це сфера наукових досліджень, що вивчає хімічні процеси, які відбувалися на Землі до виникнення життя. Вона заглиблюється у складні взаємодії та реакції, що відбувалися у початковому земному середовищі, з метою розкриття походження біологічно значущих молекул та фундаментальних будівельних блоків життя.

Термін «пребіотична хімія» може визначатися по-різному: це хімія, що виникла до появи життя, або хімія, що привела до виникнення життя на Землі і, можливо, на інших планетах. Науковці у цій галузі практично визначають це поняття, як органічну природну хімію навколишнього середовища Землі або іншої планети сонячної системи, яка, можливо, сприяла виникненню життя. Терміни «абіотична хімія» (хімія, що відбувається за відсутності біології) і «пребіотична хімія» у певному сенсі є синонімами. Оскільки прийнято вважати, що Всесвіт хаотичний і достеменно невідомо, які процеси привели до виникнення життя, вивчення пребіотичної хімії включає як продуктивні, так і непродуктивні хімічні процеси.

Походження життя залишається незрозумілим, попри десятиліття (чи, можливо, століття, залежно від цього, де історично відзначається відправна точка) досліджень. Значна кількість попередніх робіт надала переконливі деталі щодо того, як це могло статися, і чи це можна вважати універсальним явищем. Розвиток сучасної думки з цієї теми має довгу і звивисту історію у різних сферах науки, включаючи астрономію, біологію, хімію та геологію. Основні невизначеності пов'язані з тим, як сполуки самоорганізуються в системи, здатні до самовідтворення [1].

Вивчення хімії пребіотиків обумовлено надважливим питанням про те, як зародилося життя, та бажанням зрозуміти хімічні механізми, що привели до його виникнення. Вивчаючи хімічні перетворення, що відбувалися мільярди років тому,

дослідники прагнуть проаналізувати заплутані шляхи, якими прості неорганічні сполуки поступово перетворилися на складні органічні молекули. Одним з основних завдань пребіотичної хімії є з'ясування процесів, що привели до утворення біомолекул, таких як амінокислоти, нуклеотиди, цукри та ліпіди. Ці молекули є будівельними блоками білків, нуклеїнових кислот, вуглеводів і мембран, які є життєво важливими компонентами живих організмів. Вивчаючи їхній пребіотичний синтез і взаємодії, вчені отримують уявлення про хімічне походження життя та умови його виникнення [2, 3].

Пребіотична хімія також досліджує фактори довкілля, які впливали на хімічні реакції на ранній Землі. Дослідники вивчають різні сценарії, такі як наявність вулканічної активності, вплив ультрафіолетового випромінювання, наявність мінералів та металів, а також склад атмосфери та океанів. Ці фактори відіграють вирішальну роль у формуванні хімічного ландшафту та впливі на утворення органічних сполук.

Отже, пребіотична хімія – це міждисциплінарна область досліджень, що вивчає хімічні перетворення та взаємодії, що мали місце на ранній Землі. Ця галузь науки досліджує походження будівельних блоків життя, фактори довкілля, що вплинули на пребіотичні реакції, та можливість існування живого за межами нашої планети. Вивчаючи пребіотичну хімію, вчені прагнуть отримати глибше уявлення про фундаментальні принципи, які лежать в основі виникнення життя [3].

### **1.1.1 Ключові концепції та теорії пребіотичної хімії**

Пребіотична хімія – область науки, присвячена розумінню хімічних процесів, що відбувалися на Землі до появи життя, відіграє значну роль у вивченні походження життя й формуванні біологічно значимих молекул. Вона охоплює широкий спектр складних реакцій та взаємодій, які мали місце в середовищі ранньої Землі, і зрештою привели до виникнення життя, яким ми його знаємо сьогодні. Було запропоновано кілька ключових концепцій та теорій, які забезпечують важливі основи розуміння пребіотичної хімії та її наслідків.

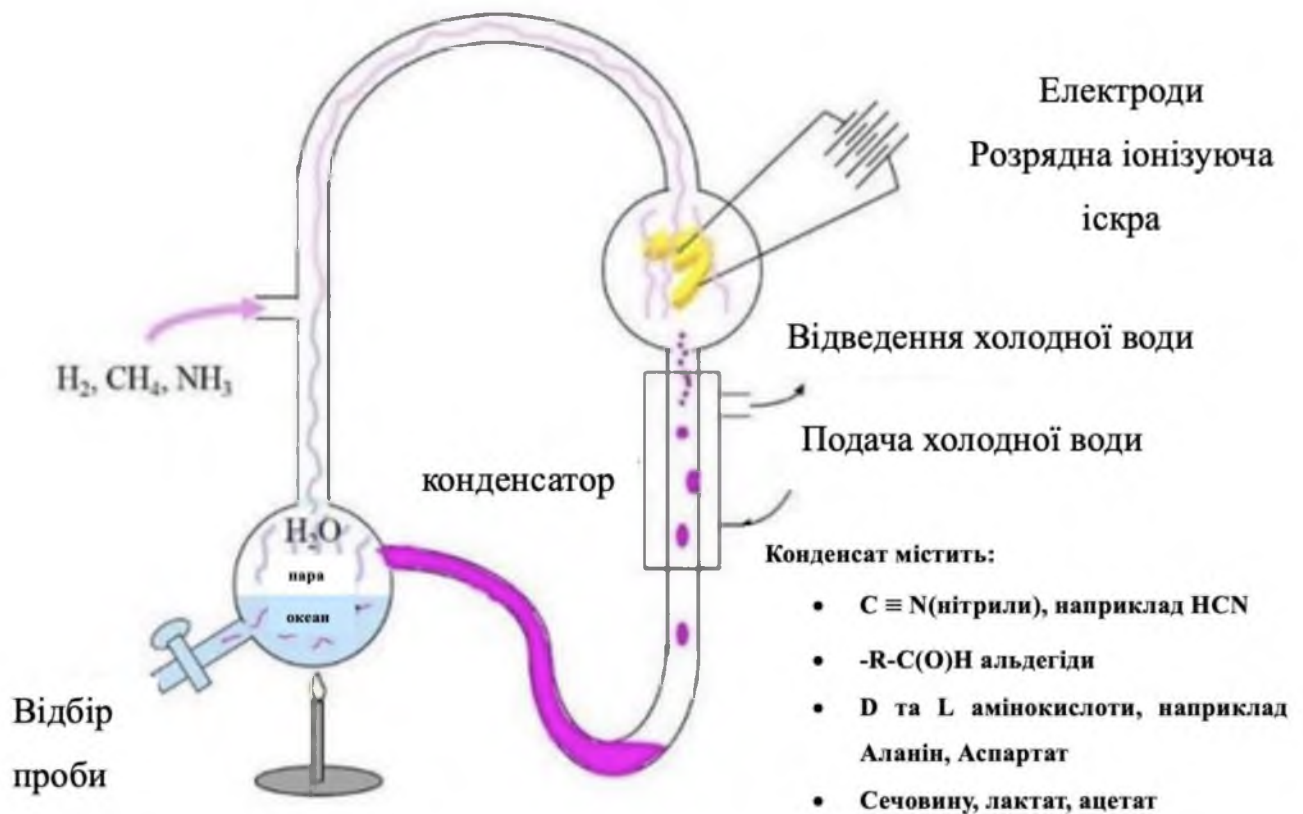
Ці ключові концепції та теорії допомагають зрозуміти хімічні перетворення та взаємодії, що відбувалися на Землі мільярди років тому. Вони пропонують основу для дослідження реакцій пребіотичного та селективного фосфорилування органічних молекул, таких як цукри, нуклеотиди, спирти тощо. Розуміння основних принципів та механізмів пребіотичної хімії дає змогу дослідникам пролити світло на походження життя та надає цінну інформацію про потенційні шляхи, що привели до утворення біомолекул, необхідних для існування живого [4].

Однією з найвпливовіших концепцій пребіотичної хімії є теорія «первинного бульйону», яка постулює існування розбавленої суміші простих органічних сполук у давніх океанах Землі.

Ця концепція представляє океани як великі посудини для хімічних реакцій, наповнені різноманітними органічними молекулами. У правильних умовах навколишнього середовища ці молекули брали участь у багатьох хімічних реакціях, приводячи до утворення більш складних і заплутаних сполук. «Первинний бульйон» став ідеальним середовищем для синтезу та накопичення біомолекулярних попередників, заклавши основу для подальшого виникнення життя.

У своїх дослідженнях, науковець Олександр Опарін припустив, що численні джерела вільної енергії сприяли відновному синтезу перших органічних молекул які взяли участь у формуванні того, що він назвав «первинним бульйоном» [5].

Гіпотеза Опаріна-Холдейна отримала сильну підтримку в результаті експериментів Стенлі Міллера та Гарольда Юрі (Г. Юрі отримав Нобелівську премію з хімії у 1934 році за відкриття дейтерію). Стенлі Міллер і Гарольд Юрі перевірили прогноз Д. Холдейна та Опаріна про те, що в пребіотичних земних умовах неорганічні молекули можуть утворювати органічні молекули в так званому «первинному бульйоні» [6]. Їхній знаменитий експеримент, у якому вони надавали енергію суміші неорганічних молекул із відновною здатністю, схематично зображено на рис.1.1.



**Рис.1.1.** Експеримент Стенлі Міллера та Гарольда Юрі

Перші опубліковані дані С. Міллера вказували на присутність органічних молекул у їхній «океанській» колбі, включаючи декілька добре відомих метаболічних органічних кислот (лактат, ацетат, декілька амінокислот тощо), а також високореактивних альдегідів та нітрילів. Останні можуть вступати у самочинні хімічні реакції з утворенням органічних сполук.

Пізніші результати аналізів виявили в колбі наявність пуринів, вуглеводів та жирних кислот. Ще пізніше, через 50 років після експериментів С. Міллера (і через кілька років після його смерті), було виявлено декілька непроаналізованих пробірок із відібраними пробами часів його ранніх експериментів. Коли вміст цих пробірок було проаналізовано за допомогою нових, більш чутливих інструментальних методів, виявилось, що вони містять додаткові органічні молекули, про які спочатку не повідомлялося, включаючи 23 амінокислоти [7].

Зрозуміло, що термодинамічні та хімічні умови, запропоновані О. Опаріним та Д. Холдейном, можуть сприяти відновному синтезу органічних молекул. Багатий на поживні речовини «первинний бульйон», імовірно, сприяв виникненню

гетеротрофних клітин, які могли використовувати ці поживні речовини з навколишнього середовища для отримання енергії та росту, що передбачає ранню еволюцію ферментативних шляхів, подібних до гліколізу.

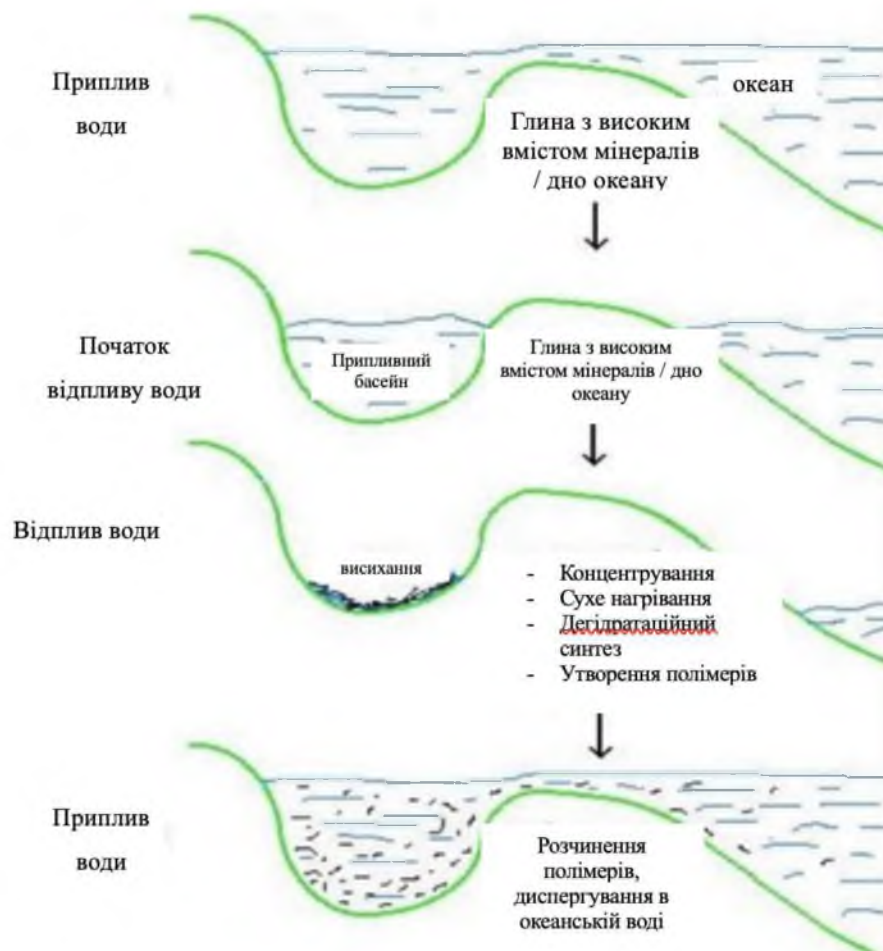
«Хімічна еволюція» – ще одна ключова концепція хімії пребіотиків, що підкреслює перетворювальний характер хімічних реакцій із часом. Такий підхід визначає перехід від більш простих хімічних попередників до складніших біомолекул за допомогою серії селективних реакцій.

Ідея хімічної еволюції полягає в тому, що в міру перебігу хімічних реакцій певні молекули виявляють більшу стабільність або функціональність, що приводить до їхнього переважного накопичення. Згодом ці накопичені молекули є основою для подальших хімічних реакцій та формування все більш складних біомолекулярних структур. Хімічна еволюція відіграла вирішальну роль у розвитку основних будівельних блоків життя, включаючи ліпіди, амінокислоти, нуклеотиди та цукри [8, 9].

У сценарії «припливного басейну» передбачається, що пребіотичні органічні мономери концентрувалися під час океанських припливів у невеликих басейнах за спекотних умов «первісного» дня з подальшою полімеризацією шляхом дегідратаційного синтезу. Цей сценарій пояснює походження полімерів та відтворюваних хімічних процесів

Утворення полімерних зв'язків є «висхідною» реакцією, що вимагає вільної енергії. Дуже високі температури (сухе нагрівання) можуть зв'язувати мономери шляхом дегідратації у лабораторних умовах, і, можливо, це сталося у стоячих водах припливних океанських басейнів і спричинило утворення полімерів. Цей сценарій передбачає подальше розосередження цих полімерів із приливних басейнів під час припливів та відпливів.

Сценарій «припливного басейну» проілюстровано на рис.1.2.



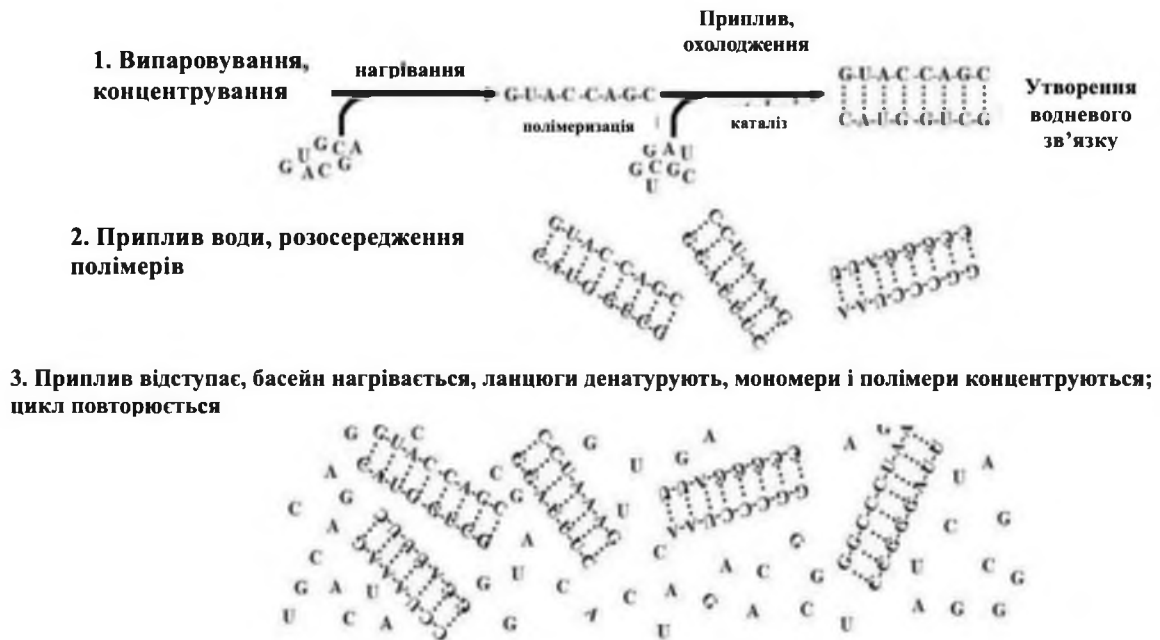
**Рис.1.2.** Пребіотичний сценарій синтезу полімерів у припливних басейнах

«Гіпотеза світу РНК» передбачає, що у ранніх стадіях життя переважала РНК (рибонуклеїнова кислота). РНК служила як генетичним матеріалом, здатним зберігати та передавати генетичну інформацію, так і каталізатором, здатним каталізувати основні хімічні реакції. Молекули РНК мають здатність складатися у тривимірні структури і виявляти каталітичні властивості. «Гіпотеза світу РНК» передбачає, що система, заснована на рибонуклеїновій кислоті, передувала появі ДНК та білків, слугуючи ключовою стадією еволюції життя. Ця теорія підкреслює значення нуклеїнових кислот та їхню потенційну участь у пребіотичних реакціях фосфорилування [10].

Концентрація передбачуваних органічних мономерів на дні припливних басейнів потенційно могла зумовити можливість каталізу полімеризації навіть за відсутності дуже високої температури. Велика кількість металів (нікель, платина, срібло тощо) є неорганічними каталізаторами, здатними прискорювати чимало

хімічних процесів. Важкі метали існували як у земній корі, так і у відкладеннях первісних океанів, як і сьогодні. Такі мінеральні агрегати в ґрунтах і глинах мають каталітичні властивості. Крім того, метали (наприклад, магній і манган) на даний час є невід'ємною частиною багатьох ферментів, що також узгоджується з походженням біологічних каталізаторів із більш простих мінеральних агрегованих каталізаторів в океанських відкладеннях.

Варто розглянути можливості перетворення мономерів та полімерів РНК, виходячи зі сценарію, запропонованого «гіпотезою світу РНК». Припущення щодо цієї моделі зображено на рис.1.3.



**Рис.1.3.** Відтворення полімерів у припливних басейнах

Результатом, передбаченим цією схемою, є утворення не тільки РНК-полімерів, а й дволанцюгових молекул РНК з формуванням водневих зв'язків, які можуть ефективно реплікуватися у кожному циклі концентрування, полімеризації та диспергування. Тепло й енергія, що вивільняється у результаті цих реакцій, могли підтримувати полімеризацію, а каталіз міг підвищити точність реплікації РНК.

Накопичення у навколишньому середовищі структурно споріднених, відтворюваних та стабільних полімерів відображає явище пребіотичного хімічного гомеостазу – однієї з властивостей живих організмів.

Загалом сценарій «припливного басейну» та «гіпотеза світу РНК» добре поєднуються один з одним. Однак нині виникають більш комплексні складні питання щодо середовища, у якому відбувається відновлення пребіотиків. Нові дані вказують на те, що земна атмосфера зовсім не відновлювалася, що ставить під сумнів ідею щодо ролі гетеротрофів як перших живих клітин на планеті [11].

Актуальні гіпотези висувають припущення щодо альтернативних джерел енергії, які відіграли вирішальну роль у полегшенні пребіотичних хімічних реакцій. У початковому земному середовищі були доступні різні джерела енергії, такі як вулканічна активність, блискавки та ультрафіолетове випромінювання. Ці джерела енергії забезпечували необхідну енергію активації для подолання термодинамічних бар'єрів, ініціювання хімічних реакцій та полегшення синтезу складніших органічних молекул. Внаслідок вулканічної діяльності у довікля було викинуто гази та мінерали, які стали джерелом походження реакційноздатних частинок. Блискавки з розрядами високої енергії стимулювали утворення хімічних зв'язків та сприяли синтезу органічних молекул. УФ-випромінювання, що переважало в атмосфері ранньої Землі, запускало фотохімічні реакції, що приводять до утворення важливих біомолекулярних попередників.

Концепція «самоскладання» відіграє значну роль у хімії пребіотиків, підкреслюючи здатність певних молекул самочинно організовуватися у складні структури. «Самозбірка» відноситься до процесу, при якому молекули під дією характерних для них хімічних та фізичних властивостей, збираються разом, утворюючи впорядковані та функціональні збірки. У пребіотичному середовищі процеси самоскладання, мабуть, грали вирішальну роль у формуванні протоклітин, ліпідних біошарів та інших організованих структур. Ці самозбірні структури забезпечували обмежене середовище для перебігу хімічних реакцій, захищаючи молекули від зовнішніх факторів і дозволяючи створювати більш складні системи.

Концепцією «емерджентних властивостей» в пребіотичних системах описують явище, коли прості компоненти демонструють складну емерджентну поведінку та функціональність при взаємодії один з одним. Ці емерджентні властивості виникають через колективну поведінку та взаємодії окремих молекул або компонентів у системі. У пребіотичній хімії емерджентні властивості можуть проявлятися по-різному, наприклад, у появі систем, що самовідтворюються, формуванні каталітичних мереж або появі кооперативних взаємодій між молекулами [12].

Вивчення ключових концепцій та теорій пребіотичної хімії забезпечує основу для розуміння хімічних процесів, що привели до виникнення життя. Вивчаючи «первинний бульйон», «хімічну еволюцію», «гіпотезу світу РНК», джерела енергії, «самоскладання» та «емерджентні властивості», дослідники отримують уявлення про умови і механізми, які сприяли утворенню біологічно значущих молекул і розвитку ранніх форм життя.

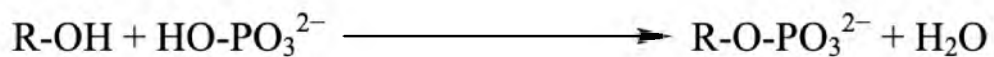
У цілому, вивчення ключових концепцій і теорій пребіотичної хімії забезпечує всебічне розуміння фундаментальних принципів, які лежали в основі хімічних процесів у середовищі ранньої Землі. Аналізуючи тонкощі пребіотичної хімії, дослідники прагнуть реконструювати молекулярні перетворення та вибіркові реакції, що відбувалися під час зародження життя. Завдяки вивченню цих ключових концепцій та теорій ми можемо отримати цінну інформацію щодо фосфорилування органічних молекул та селективність, яка спостерігається у пребіотичних реакціях фосфорилування.

## **1.2. Фосфорилування у пребіотичних умовах**

Визначення пребіотичного фосфорилування є важливим кроком у розумінні хімічних процесів, що можуть мати місце на ранніх етапах еволюції життя. Пребіотичне фосфорилування відноситься до процесу передачі фосфатних груп на органічні молекули. Цей процес може відбуватись за різних умов, включаючи умови ранньої Землі, де були присутні хімічні реагенти, такі як фосфати,

різноманітні органічні сполуки та відповідні джерела енергії. Пребіотичне фосфорилування може відбуватись через різноманітні механізми, включаючи фотохімічні, термічні, каталітичні та електрохімічні процеси [13].

Як правило, реакція фосфорилування означає реакцію дегідратації між ортофосфатом та органічною молекулою. Схема такої реакції у загальному вигляді наведена на рис.1.4.



**Рис.1.4.** Загальна схема реакції фосфорилування

Однак така реакція була б термодинамічно не вигідною. Це пов'язано з тим, що даний процес намагається «витягнути» молекулу  $\text{H}_2\text{O}$  у водне середовище, що робить фосфорилування надзвичайно складним та малоефективним. Це основна причина, через яку процес фосфорилування є актуальною проблемою для дослідження у пребіотичній хімії.

Використання різних органічних молекул як акцепторів фосфатних груп у пребіотичних умовах відкриває можливість формування багатьох біологічно активних сполук, таких як нуклеотиди, нуклеозиди та кофактори. Наприклад, пребіотичне фосфорилування глюкози може приводити до утворення глюкозо-6-фосфату, який є проміжним продуктом у гліколізі та глікогенезі [14, 15].

Дослідження селективності пребіотичного фосфорилування органічних молекул може допомогти встановити, які саме сполуки можуть бути утворені та які є переважаючими продуктами реакцій. Важливо розуміти, як властивості реагентів, каталізаторів та умов реакції впливають на вибірковість та ефективність фосфорилування органічних молекул. Наприклад, хімічна структура органічного акцептора фосфатної групи може впливати на швидкість реакції та тип утворених продуктів. Різні функціональні групи та їхнє розташування у молекулі можуть сприяти процесу фосфорилування, або ж навпаки – гальмувати його. [16].

Каталізатори також мають велике значення у пребіотичному фосфорилуванні. Вони можуть активувати реагенти, зменшувати енергію активації реакції та забезпечувати вищу селективність утворення фосфорильованих продуктів. Вибір підходящого каталізатора може значно покращити ефективність фосфорилування органічних молекул.

Наприклад, деякі металеві каталізатори, такі як нікель, платина або паладій, можуть бути використані для активації фосфатних реагентів та сприяння фосфорилуванню органічних молекул. Вони можуть утворювати комплекси з реагентами, забезпечуючи сприятливі умови для фосфатного трансферу [17].

Також, ферменти, які є біологічними каталізаторами, можуть грати важливу роль у пребіотичному фосфорилуванні. Вони дозволяють проводити фосфорилування з високою селективністю та ефективністю, допомагаючи контролювати реакційні шляхи та склад продуктів реакції.

Розуміння взаємодії каталізаторів з реагентами та молекулярними умовами реакції дозволяє встановити оптимальні умови для пребіотичного фосфорилування. Це може включати оптимізацію температури, рН середовища, концентрації реагентів та наявності кофакторів. Дослідження селективності та ефективності фосфорилування органічних молекул у пребіотичних умовах має велике значення для розуміння походження життя та хімічних процесів, які можуть відбуватись у ньому.

Огляд досліджень, пов'язаних з пребіотичним фосфорилуванням, є важливим етапом для розуміння проблематики та виявлення наукових досягнень у цій області.

Один зі згаданих вище ранніх дослідників, який зробив значний внесок у цю галузь науки – Гарольд Юрі [6]. Він провів дослідження з реакціями фосфорилування органічних сполук, використовуючи різні реагенти та каталізатори. Дослідив вплив таких факторів, як рН, температура та концентрація реагентів на селективність та швидкість реакцій фосфорилування. Дослідження фосфорилування органічних молекул за присутності різних каталізаторів, таких як йони металів, були також предметом багатьох досліджень. Наприклад, дослідження

з використанням каталізаторів, які моделюють мінеральні поверхні, показали, що вони можуть сприяти ефективнішому пребіотичному фосфорилуванню [9].

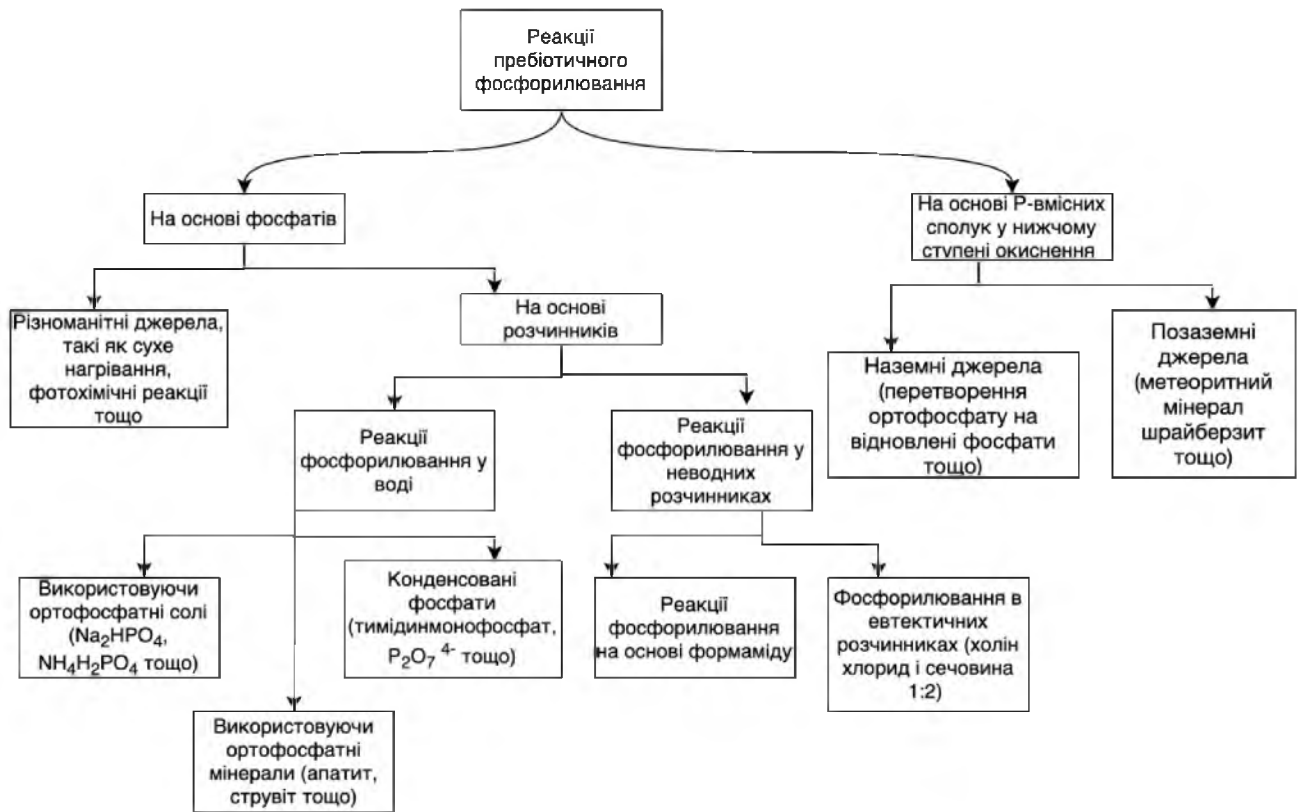
Були також проведені експерименти із вивчення впливу різних реагентів на селективність фосфорилування. Наприклад, дослідження показали, що у присутності оксиду цинку (ZnO) селективність фосфорилування може бути підвищена, що вказує на важливу роль каталізаторів у регулюванні селективності реакцій.

Окрім експериментальних досліджень, були проведені також теоретичні моделювання та обчислювальні дослідження, спрямовані на розуміння механізмів та кінетики реакцій пребіотичного фосфорилування. Використання методів квантової хімії та молекулярного моделювання дозволяє детально вивчити взаємодію реагентів, каталізаторів та зрозуміти як певні фактори впливають на селективність реакцій [18].

Значна увага приділяється дослідженню реакцій фосфорилування в умовах, які відповідають можливим пребіотичним середовищам, наприклад, водний розчин. Вивчення впливу розчинників та фізико-хімічних умов на реакції фосфорилування є важливим аспектом досліджень у цій галузі.

Крім того, в останні роки з'явилися дослідження, спрямовані на вивчення взаємодії органічних молекул з мінеральними поверхнями, що можуть слугувати потенційними джерелами фосфору на ранніх етапах еволюції. Ці дослідження показують, як мінерали можуть каталізувати реакції фосфорилування та сприяти формуванню пребіотичних органічних сполук [19].

На рис.1.5 зображено загальну схему, що демонструє варіації реакцій пребіотичного фосфорилування, які були описані вченими на даний момент [13].



**Рис.1.5.** Узагальнена схема, що демонструє варіації реакцій пребіотичного фосфорилування

Загалом, огляд досліджень, пов'язаних з пребіотичним фосфорилуванням, свідчить про активність наукової спільноти у цій області та великий інтерес до розуміння процесів, які можуть бути важливими для пояснення виникнення життя на Землі. Вивчення селективності та ефективності фосфорилування органічних молекул у пребіотичних умовах відкриває широкі перспективи для розуміння пребіотичної хімії та можливих механізмів, які сприяли виникненню життя. Дослідження у цій області надає не тільки фундаментальні знання щодо пребіотичної хімії, але й може мати практичні застосування [20].

Зокрема, розуміння селективності реакцій фосфатного трансферу може мати важливе значення для розробки нових методів синтезу органічних сполук та фармацевтичних препаратів. Дослідження у цій області може допомогти підібрати оптимальні умови та каталізатори для проведення реакцій фосфорилування з високою селективністю та виходом продукту.

Крім того, знання про механізми та фактори, що впливають на пребіотичне фосфорилування, може також сприяти встановленню початкових умов та стадій хімічної еволюції, які привели до виникнення життя на Землі. Розуміння процесів хімічного переносу фосфатної групи може допомогти реконструювати можливі сценарії, які привели до формування пребіотичних органічних молекул на ранніх стадіях еволюції планети [21]. Огляд досліджень, пов'язаних з пребіотичним фосфорилуванням, підкреслює значення цієї галузі для розуміння процесів, що передували виникненню життя на Землі.

Результати проведених досліджень мають великий потенціал у розробці нових методів синтезу біологічно активних сполук і фармацевтичних препаратів, а також у встановленні початкових стадій пребіотичної хімії та еволюції живого.

### **1.3. Роль фосфору та його сполук у процесах виникнення життя**

Роль фосфору в пребіотичній хімії є досить значущою, оскільки його сполуки пов'язані з виникненням та становленням ранніх форм життя. На рис.1.6 наведено основні відомості щодо будови атома фосфору. Він зустрічається в живих організмах у формі фосфатів, які поширені у біохімії, в основному у вигляді сполук, необхідних для формування життя, що мають зв'язки C-O-P (карбон, кисень і фосфор), C-P або P-O-P [22]. У рамках пребіотичної хімії виникло кілька ключових запитань, які стосуються хімії фосфору: які були найімовірніші джерела фосфору на ранній Землі? Як він став частиною біологічного світу, утворивши фосфорвмісні сполуки, які сьогодні наявні у живих організмах? Чи могли метеорити бути основними джерелами фосфору? Які розчинники були найбільш імовірними на ранній Землі, та які з них сприятливі для фосфорилування? Чи, навпаки, сполуки фосфору, швидше за все, утворилися у відносно сухому середовищі? Які температурні умови були найбільш підходящими для фосфорилування?

Шлях до ефективного утворення біологічних сполук фосфору досі залишається питанням, що кидає виклик науковцям [13].

Схема будови атома	Електронна формула	Графічна електронна формула
${}_{15}\text{P} \left. \begin{array}{l} ) \\ ) \\ ) \end{array} \right\} \begin{array}{l} 2e \\ 8e \\ 5e \end{array}$	${}_{15}\text{P} 1\text{S}^2 2\text{S}^2 2\text{P}^6 3\text{S}^2 3\text{P}^3$ ${}_{15}\text{P} [\text{Ne}] 3\text{S}^2 3\text{P}^3$	

**Рис.1.6.** Основні відомості щодо будови атома фосфору

Фосфор має декілька властивостей, які роблять його важливим у цьому контексті. По-перше, фосфор є складовою частиною нуклеотидів – основних будівельних блоків нуклеїнових кислот, які несуть генетичну інформацію. Процеси фосфорилування можуть бути відповідальними за формування фосфодіестерних зв'язків між нуклеотидами та утворення ланцюгів РНК або ДНК. Це можливо у пребіотичних умовах, де відбуваються хімічні реакції між сполуками, що містять фосфатну групу, та різними органічними речовинами.

По-друге, фосфор є ключовим компонентом енергетичного молекулярного «палива», такого як АТФ (аденозинтрифосфат), який грає роль основного носія енергії у клітинних процесах. У пребіотичних умовах можуть відбуватись реакції фосфорилування, що приводять до синтезу АТФ або подібних молекул, що забезпечують енергію для хімічних процесів, які були надзвичайно важливими для появи та розвитку примітивного життя [23]. Крім того, фосфор може бути присутній в органічних молекулах, таких як фосфоліпіди, які утворюють основну структуру клітинних мембран. Це може мати значення у пребіотичній хімії, оскільки мембрани були важливими для формування обмежених просторів, де відбувалися хімічні реакції та зберігалась біологічна матерія [24, 25]. Отже, розуміння потенційних джерел фосфору на ранніх етапах існування Землі є важливим для пребіотичної хімії. Деякі можливі джерела фосфору включають мінерали, які містять фосфати, такі як апатити, що поширені в скелях та ґрунтах.

Умови ранньої Землі, зокрема часті вулканічні виверження та метеоритні дощі, могли сприяти вивільненню фосфатів із мінералів [26]. Наукові дані свідчать про те, що вулканічні гарячі джерела можуть грати важливу роль у концентруванні фосфатів у ранніх водних середовищах. Ці фосфати можуть бути використані для реакцій фосфорилування органічних молекул [27]. Крім того, існує гіпотеза, що метеоритні зіткнення на ранній Землі могли сформувати зовнішні джерела фосфору, наприклад, у формі фосфатів, які були присутні на метеоритах чи астероїдах. Такі «поставки» фосфору можуть бути важливим джерелом для пребіотичних реакцій та формування біомолекул.

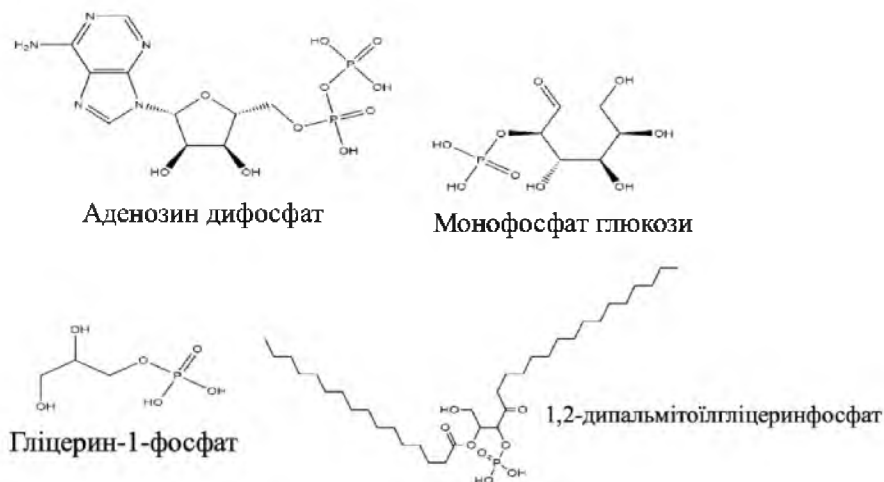
Фосфор може бути присутнім у формі органічних сполук у ранніх водних середовищах, наприклад, внаслідок хімічних реакцій між більш простими органічними молекулами. Ці органічні фосфоровмісні сполуки можуть бути початковими реагентами для пребіотичного фосфорилування та розвитку хімії життя [28]. Усі ці потенційні джерела фосфору на ранніх етапах існування Землі створювали сприятливі пребіотичні умови. Вони забезпечували наявність фосфатів, необхідних для реакцій фосфорилування, які могли сприяти формуванню складних органічних сполук та появі життя. Процеси фосфорилування у пребіотичній хімії могли мати ключове значення у створенні біохімічних шляхів, які могли вести до розвитку примітивних метаболічних систем. Фосфор, як основний компонент АТФ, міг бути важливим джерелом енергії для хімічних реакцій, необхідних для молекулярного синтезу та функціонування примітивних організмів [29, 30].

Розуміння ролі фосфору в пребіотичній хімії дозволяє краще оцінити можливі механізми, які лежать в основі виникнення життя на Землі. Вивчення пребіотичного фосфорилування та його впливу на виникнення біологічної активності може сприяти кращому розумінню процесів, які могли мати місце на ранніх стадіях еволюції життя, та які можуть бути присутніми і досліджуваними й дотепер у різних формах живого світу.

### 1.3.1. Біологічна значимість фосфору

Фосфор є ключовою біогенною молекулою, що становить близько 1 % сухої маси клітин [31]. Цей елемент присутній у всіх процесах та ознаках, властивих живому, таких як клітинний метаболізм (клітинне дихання, за участю цукрофосфатів, фосфоровмісних ферментів тощо), структура (фосфоліпиди) і наявність у частині молекул, що зберігають інформацію (РНК та ДНК). Реплікація та метаболізм є двома основними біохімічними процесами, які в основному залежать від фосфору, оскільки він становить 3 % атомного складу РНК [31, 32]. Найцікавіше, що близько 44 % всіх метаболічних сполук є біологічними сполуками фосфору [32].

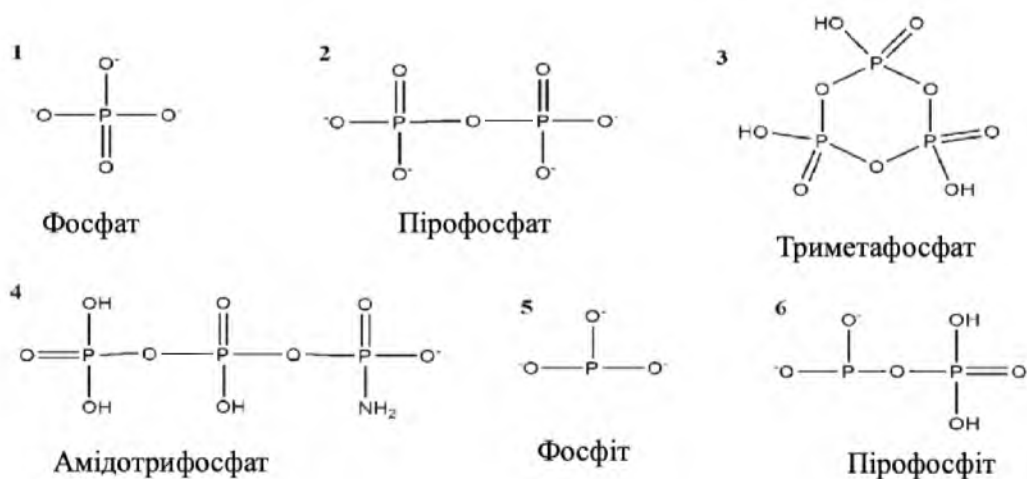
Фосфорильовані біомолекули, що зустрічаються в живих організмах, поділяються на такі категорії: (1) реактивні орґанофосфати, такі як ацетилфосфат, фосфоенолпіруват, фосфокреатин, трифосфати (АТФ); (2) біологічні фосфати, що містять зв'язки С-О-Р, потрібні для існування життя. На рис.1.7 наведено деякі важливі фосфатвмісні сполуки, життєво необхідні для клітинної діяльності. До них відносяться прості фосфорильовані цукри, такі як гліцеролфосфат (для дихання та структури клітини), дуже складні молекули, такі як нуклеотиди (для зберігання інформації) та фосфоліпиди (для структури).



**Рис.1.7.** Фосфатвмісні сполуки, необхідні для клітинної діяльності

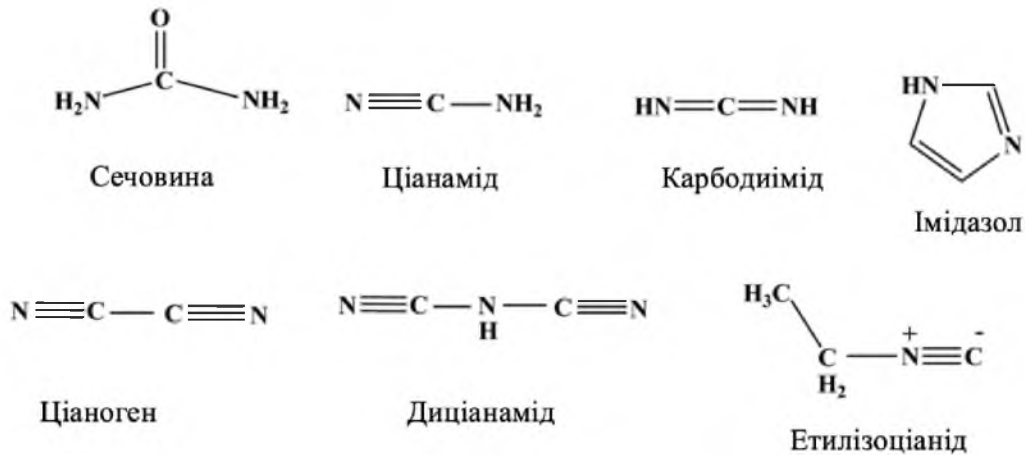
Присутність і значимість фосфору у походженні біологічних сполук і, отже, життя – це стара концепція, що сягає часів Дарвіна. Думки Дарвіна щодо значення фосфору і походження життя можна добре зрозуміти з його листа, написаного його близькому другові Джозефу Далтону Хукеру: «Часто говорять, що зараз є усі умови для першої появи живої істоти, які могли б колись були присутніми. Але якби (...) ми могли уявити собі, що в якомусь теплому маленькому ставку з усілякими аміачними та фосфорними солями, світлом, теплом та електрикою відбулось хімічне утворення білкової сполуки, готове до ще більш складних змін (...)» [33]. З інших листів своїм друзям [33] можна ясно зрозуміти, що Дарвін вважав фосфор одним із найбільш важливих компонентів для походження пребіотичних біомолекул і замислювався над тим, як прості сполуки, такі як карбонатна кислота, азотовмісні молекули та фосфор, могли лежати в основі утворення більш ранніх пребіотичних молекул.

Існує чимало можливостей для вивчення потенційних реакцій пребіотичного фосфорилування з використанням різних джерел фосфору. На рис.1.8 проілюстровано різні форми фосфатів (прості та конденсовані фосфати) та відновлені сполуки фосфору, які використовувалися у різних пребіотичних реакціях фосфорилування.



**Рис.1.8.** Пребіотичні форми існування фосфору

Вода є найбільш поширеним розчинником, і стратегія пошуку життя або можливості його виникнення у Всесвіті полягає в тому, щоб знайти воду [34], але вода водночас є проблемою для реакцій фосфорилування, тому часто до процесів залучають пребіотично вірогідні агенти конденсації (рис. 1.9).



**Рис.1.9.** Найпоширеніші агенти конденсації, що використовуються у пребіотичних реакціях фосфорилування

Ф. Вестхаймер у своєму дослідженні [35] описує важливе значення фосфору та ортофосфату, а також природного відбору фосфатів для різноманітних цілей у біохімії живих істот. Крім того, у багатьох метаболічних реакціях групою, яка переноситься, зазвичай є фосфат або навіть пірофосфат [35, 36]. Ще одна особливість щодо значення фосфатів пов'язана з тим, що живі істоти повинні зберігати свої метаболіти у клітинних мембранах [32, 37]. Якби біомолекули могли проникати через клітинні мембрани під час метаболізму, вони дифундували б у навколишнє середовище (воду), залишаючи клітину. Велика кількість нейтральних незаряджених молекул може легко проникати через клітинні мембрани, тоді як оргонофосфати, які є зарядженими частинками, не мають такої здатності.

Отже, біомолекули могли перебувати лише у межах клітини, якщо це заряджені частинки, тобто фосфати [32, 36]. Крім того, заряд фосфатів у ДНК та РНК забезпечує більшу структурну стабільність. Однією з найбільш вражаючих

особливостей є те, що складні естери фосфорної кислоти у складі ДНК і РНК мають негативні заряди і, таким чином, стійкі до гідролізу [32].

### 1.3.2. Доступність фосфору на ранніх етапах існування Землі

На ранній Землі геохімічні джерела фосфатів були мізерні і, швидше за все, наявні у таких мінералах, як апатит, вівіаніт, берлініт і струвіт, або ж могли бути утворені в результаті гідролізу мінералів, що містять фосфор, таких як штрайберсит (рис.1.10) [38]. Для того, щоб ортофосфат був доступний для переходу в органічні сполуки, необхідно його вивільнення з мінералу, що, швидше за все, відбувалося при розчиненні мінералу [39]. Варто відмітити, що у водному розчині найбільш термодинамічно стабільною формою фосфору є ортофосфат. Отже, перенесення ортофосфатів із цих геохімічних джерел до пребіотично важливих органічних сполук є ключовою вимогою для процесу виникнення життя [40].



**Рис.1.10.** Деякі фосформісні мінерали, присутні на ранніх етапах існування Землі

Найбільша кількість досліджень геохімії пребіотичних процесів присвячена вивченню штрайберситу і апатиту як основних потенційних джерел ортофосфатів.

Штрайберсит є перспективним кандидатом на роль пребіотичного джерела фосфору завдяки його високій реакційній здатності та розчинності у природних водах різного складу в умовах навколишнього середовища, але він дуже рідко зустрічається серед наземних порід [41–45]. Високо ймовірною є екзогенна доставка штрайберситу: огляд метеоритної мінералогії переконливо підтверджує, що ця форма була однією із найпоширеніших ортофосфатних сполук, представлених на ранній Землі [46]. Ключовим питанням щодо пребіотичної відповідності форм штрайберситу з відновленим фосфором є їхня розчинність у водному розчині. Відомо, що під час корозії штрайберситу відбувається пряме активне фосфорилювання органічних сполук [47]. Однак швидкість розчинення та граничні рівноважні концентрації хімічно активного фосфору в середовищах, які могли взаємодіяти з фазами, що містять відновлений фосфор, залишаються невідомими. Ці обмеження мають вирішальне значення для оцінки ролі фази, що містить відновлений фосфор, для якої, можливо, були необхідні певні молярні концентрації для забезпечення ефективної буферизації водневого показника та селективних прямих реакцій фосфорилювання [48, 49].

Апатит має дуже низьку розчинність у більшості розчинів, виявлених сьогодні на поверхні Землі [50]. Однак насправді існує кілька способів різко збільшити розчинність апатиту. Ці механізми включають хімічний вплив катіонів на конкретних ділянках, підвищення температури та фізичне вивітрювання [51, 52]. Найбільш важливим та універсальним засобом контролю розчинності апатиту є рН [53]. Швидкість розчинення апатиту і добуток розчинності збільшуються на порядки як за шкалою температури, так і за шкалою рН, що означає, що водне середовище з  $T > 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  і  $\text{pH} < 7$  легко розчинятиме апатит під час взаємодії типу вода – порода [54]. Апатит також відноситься до найбільш поширених фосфорвмісних мінералів з екзогенною доставкою. Екзогенний апатит, очевидно, не має явної переваги перед ендегенним апатитом для забезпечення високої доступності фосфору для процесів пребіотичної хімії [55, 56].

#### 1.4. Імідазолфосфат кальцію як агент фосфорилювання

У пребіотичних умовах властивості імідазолфосфату кальцію як фосфорилюючого агента можуть мати певні відмінності від його властивостей у лабораторних умовах [57–59]. Хоча конкретні експериментальні дані щодо поведінки імідазолфосфату кальцію у пребіотичному середовищі можуть бути обмежені, слід виокремити загальні міркування:

1. Стабільність. Стабільність імідазолфосфату кальцію в пребіотичних умовах залежить від таких факторів, як температура, рН та наявність інших реакційноздатних компонентів. Пребіотичне середовище часто включає різні хімічні реакції та змінні умови, тому може знадобитися оцінка стабільності імідазолфосфату кальцію щодо цих конкретних умов [60].

2. Розчинність. Розчинність імідазолфосфату кальцію у пребіотичних середовищах може відрізнитись від його розчинності у стандартних лабораторних умовах. Пребіотичне середовище може містити ряд розчинників та розчинених речовин, які можуть впливати на розчинність імідазолфосфату кальцію [61]. Для визначення поведінки розчинності в пребіотичних умовах будуть потрібні експериментальні дослідження або комп'ютерне моделювання.

3. Реакційна здатність. На реакційну здатність імідазолфосфату кальцію як агента фосфорилювання у пребіотичних умовах може впливати наявність різних органічних та неорганічних сполук. Пребіотичне середовище може містити різні молекули, які можуть взаємодіяти з імідазолфосфатом кальцію та впливати на його фосфорилюючу активність [62].

4. Селективність. На селективність імідазолфосфату кальцію як агента фосфорилювання у пребіотичних умовах може впливати наявність різних органічних компонентів. Пребіотичне середовище може містити різні органічні молекули, які потенційно можуть конкурувати за трансфер фосфатної групи, впливаючи на селективність молекули імідазолфосфату кальцію. Вивчення селективності імідазолфосфату кальцію у пребіотичних умовах вимагає експериментальних досліджень із використанням відповідних пребіотичних

модельних систем [63]. Важливо, що пребіотичні умови охоплюють широкий діапазон змінних, і поведінка імідазолфосфату кальцію як агента фосфорилування залежатиме від конкретних умов [64]. Необхідні подальші експериментальні дослідження, присвячені пребіотичному середовищу, щоб отримати повне уявлення про його властивості як агента фосфорилування.

#### **1.4.1. Особливості електронної будови молекули імідазолфосфату кальцію**

Імідазолфосфат кальцію як фосфорилуючий агент виявляє певні особливості, пов'язані з його електронною структурою, які роблять його потенційно придатним для реакцій фосфорилування у пребіотичних умовах [65]. Розуміння цих особливостей може пролити світло на його реакційну здатність та функціональність у таких середовищах. Одним із важливих аспектів електронної структури імідазолфосфату кальцію є наявність йону кальцію ( $\text{Ca}^{2+}$ ) та його координація з імідазольною та фосфатною групами. Йон кальцію відіграє ключову роль у полегшенні реакцій фосфорилування шляхом координації з фосфатною групою, стабілізації перехідного стану та посилення нуклеофільної атаки фосфатної групи на молекулу-мішень. Ця координаційна хімія дозволяє імідазолфосфату кальцію слугувати ефективним агентом реакцій фосфорилування [66].

Імідазол, п'ятичленний ароматичний гетероцикл, є ще одним ключовим компонентом молекули імідазолфосфату кальцію. Імідазол має унікальну електронну структуру завдяки наявності атомів азоту та делокалізованої  $\pi$ -електронної системи. Ця багата електронами природа дозволяє імідазолу виявляти властивості як основи Льюїса, так і нуклеофіла, який під час реакцій фосфорилування віддає електрони фосфатній групі [65, 67]. Окрім того, присутність ароматичної системи в імідазолі забезпечує стабільність проміжних сполук, що утворюються у процесі фосфорилування. Фосфатна група в імідазолфосфаті кальцію має високу реакційну здатність завдяки наявності

електронегативних атомів кисню та негативно зарядженої фосфатної групи. Ці характеристики полегшують перенесення ортофосфату на молекулу-мішень, забезпечуючи утворення фосфоефірних зв'язків.

У пребіотичних умовах, коли доступність складних органічних молекул і факторів навколишнього середовища може змінюватись, електронна структура імідазолфосфату кальцію дозволяє йому взаємодіяти з різноманітними субстратами. Унікальна комбінація йону кальцію, імідазолу та фосфатної групи надає універсальності імідазолфосфату кальцію як агента фосфорилування, дозволяючи йому реагувати з різними функціональними групами та біомолекулами [68]. Електронні властивості імідазолфосфату кальцію не лише полегшують утворення фосфоефірних зв'язків, але також впливають на селективність та специфічність реакцій фосфорилування. Координація йону кальцію та електронно-багата природа імідазолу визначають певний рівень селективності по відношенню до деяких функціональних груп, дозволяючи агенту переважно фосфорилувати одні субстрати порівняно з іншими [69].

Підсумовуючи, електронна структура імідазолфосфату кальцію, що характеризується наявністю йону кальцію, імідазолу та фосфатної групи, надає йому необхідної реакційної здатності та селективності для функціонування у ролі фосфорилуючого агента у пребіотичних умовах. Ці особливості дозволяють йому брати участь у реакціях фосфорилування, тим самим сприяючи утворенню фосфоефірних зв'язків і потенційно відіграючи важливу роль у ранніх хімічних процесах, які стосуються походження життя. Необхідні подальші дослідження та експерименти, аби повністю з'ясувати специфічні електронні взаємодії та реакційну здатність імідазолфосфату кальцію у пребіотичному середовищі.

## **1.5. Пребіотичні органічні молекули: визначення та властивості**

Ключовими компонентами для розуміння походження життя на землі є пребіотичні органічні молекули. Вони представляють собою хімічні сполуки, які можуть бути утворені у примітивних умовах планетарної атмосфери, океанів та

інших середовищ, у яких дані молекули передували біологічним системам. Визначення пребіотичних органічних молекул зазвичай базується на їхній хімічній структурі та спроможності утворювати складні молекулярні системи, які можуть мати потенціал для самозбереження та еволюції. Ці молекули включають різноманітні класи сполук, такі як амінокислоти, нуклеотиди, цукри, ліпіди та інші органічні речовини, які відіграють важливу роль у життєвих процесах сучасних організмів [70].

Властивості пребіотичних органічних молекул досліджуються з метою розуміння їхньої поведінки, стабільності та можливих реакційних шляхів. Ці молекули можуть мати різні фізико-хімічні властивості, такі як розчинність у воді, термостабільність, реакційна активність та інші характеристики, які можуть впливати на їхнє утворення, перенесення, збереження та взаємодію з іншими молекулами. Одним з ключових аспектів пребіотичних органічних молекул є їхня здатність до полімеризації та утворення біомолекулярних систем. У процесі полімеризації молекули можуть з'єднуватись у довгі ланцюги або мережі, що мають здатність до самозбереження та реплікації. Такі полімери можуть включати білки, які складаються з послідовності амінокислот, або нуклеїнові кислоти, які мають послідовність нуклеотидів [71].

Пребіотичні органічні молекули також можуть мати хімічну реактивність, що дозволяє їм утворювати нові зв'язки та реагувати з іншими молекулами. Це може бути важливим для створення біомолекулярної різноманітності та пояснення походження різних хімічних шляхів у примітивних системах. Загальна властивість пребіотичних органічних молекул – це їхній потенціал до самореплікації та еволюції. Вони можуть мати механізми, які дозволяють їм зберігати і переносити інформацію, а також здатність пристосовуватись до мінливих умов. Це відіграло важливу роль у розвитку життя та виникнення біологічної різноманітності [72].

Один з прикладів пребіотичних органічних молекул – це амінокислоти. Амінокислоти є будівельними блоками білків, які виконують ключові функції у живих системах. У дослідженні [73] вчені зосередилися на утворенні амінокислот під впливом метеоритних ударів, що може бути важливим фактором у формуванні

життя на ранніх стадіях розвитку планети. Ще один важливий клас пребіотичних органічних молекул – це нуклеотиди. Нуклеотиди входять до складу нуклеїнових кислот, таких як ДНК і РНК, які забезпечують зберігання та передачу генетичної інформації. Різні шляхи синтезу нуклеотидів у примітивному середовищі досліджуються у роботі [74], де автор пропонує сценарій хімічної еволюції, включаючи можливості утворення нуклеотидів. Цукри, такі як глюкоза, рибоза і дезоксирибоза, також відіграють важливу роль у пребіотичних процесах. Вони є складовими частинами нуклеотидів і виконують ключову функцію у структурі та функціонуванні нуклеїнових кислот. У оглядовій статті [75] досліджується можливість пребіотичного синтезу цукрів, включаючи формування рибози, що є важливим кроком у становленні життя. Ліпіди також мають велике значення у пребіотичних процесах. Вони є складовими частинами біологічних мембран, що утворюють оболонки клітин, і мають функцію захисту та регуляції проникнення речовин.

Приклади пребіотичних органічних молекул таких як амінокислоти, нуклеотиди, цукри і ліпіди, підтверджують потенційну можливість їхнього синтезу в умовах, які були присутні на ранній стадії існування Землі [73]. Вивчення цих процесів сприяє розумінню проблеми виникнення життя і відкриває шляхи для подальших досліджень у цій області. Важливо зазначити, що такі приклади є лише декількома з багатьох можливих пребіотичних органічних молекул, і дослідження в цій галузі ще тривають. Вивчення пребіотичних органічних молекул інтегрує результати з різних наукових статей та досліджень, що дозволяє зрозуміти більш повну картину формування життя. Крім амінокислот, нуклеотидів, цукрів і ліпідів, існує безліч інших пребіотичних органічних молекул, які грають важливу роль у хімічній еволюції [70, 74]. Наприклад, однією з ключових груп пребіотичних органічних молекул є гліцинатні молекули. Дослідження, проведені у роботі [76], вказують на можливість утворення гліцинатних молекул на ранній Землі через хімічні реакції із газоподібним аміаком та формальдегідом. Ці молекули можуть слугувати будівельними блоками для білків і нуклеїнових кислот. Окрім того, дослідження в області пребіотичної хімії розкривають можливості синтезу простих

циклічних сполук, які могли бути утворені у реакціях між хімічними сполуками, що були присутні на ранній Землі, такими як формальдегід та амінокислоти. Ці циклічні сполуки можуть мати значення як прекурсори для утворення більш складних хімічних структур [77].

### 1.6. Потенційні механізми процесів фосфорилювання

Механізм фосфорилювання включає передачу фосфатної групи на органічну молекулу, що приводить до утворення фосфорилюваної сполуки. Існує декілька шляхів фосфорилювання, включаючи пряме фосфорилювання та фосфатний трансфер.

1. Пряме фосфорилювання: даний механізм передбачає безпосередню передачу фосфатної групи з донора фосфату на акцептор. У пребіотичних умовах можуть бути використані різні донори фосфату, такі як фосфорилювані нуклеотиди, фосфорилювані карбонові кислоти або фосфатні мінерали [78].

2. Фосфатний трансфер: цей механізм включає передачу фосфатної групи з однієї органічної сполуки на іншу за участю групи-посередника. Посередник може бути фосфорилюваною гетероциклічною сполукою, яка функціонує як носій фосфатної групи. Цей механізм може бути особливо важливим у пребіотичних умовах, де наявність стійких фосфатних посередників може забезпечити ефективність передачі фосфату між сполуками, що взаємодіють [79].

У обох механізмах фосфорилювання важливу роль відіграє присутність каталізаторів або каталітичних умов, які можуть забезпечувати збільшення швидкості реакції та сприяти правильному орієнтуванню молекул.

У даній роботі досліджувались особливості взаємодії імідазолфосфату кальцію з конкуруючими нуклеофілами за рН 7,5 та  $T = 20$  °C. Такий сценарій можна розглядати з хімічної точки зору як реакції між двома нуклеофілами та електрофілом. У цьому випадку, гліцерол та інший нуклеофіл вступають у реакцію з імідазолфосфатом кальцію (електрофілом), що містить фосфатну групу. Реакція відбувається наступним чином [80]:

1. Активування імідазолфосфату: у розчині з рН 7,5, імідазолфосфат кальцію може розпадатися на йони імідазолу та фосфат-йони. Це створює наявність електрофільної фосфатної групи, доступної для реакції.

2. Нуклеофільна атака гліцеролу: гліцерол, який є нуклеофілом, здійснює атаку на фосфатний центр імідазолфосфату. Нуклеофільна атака включає здатність парамагнітного атома гліцеролу займати місце в бінарному комплексі, тоді як електрони з фосфатного йону переходять на фосфатний центр.

3. Утворення нового зв'язку: нуклеофільна атака гліцеролу на фосфатний центр імідазолфосфату приводить до утворення нового зв'язку між фосфатним атомом і киснем гліцеролу. Це приводить до формування фосфорильованого гліцеролу, в якому фосфатна група приєднана до молекули гліцеролу.

В результаті цих стадій, гліцерол фосфорильовується й утворюється фосфорильований гліцерол. Важливо зазначити, що за умови рН 7,5 імідазолфосфат кальцію може існувати як катіонний комплекс, що полегшує нуклеофільну атаку. Значення водневого показника рН 7,5 зазвичай сприяє оптимальній протонізації імідазолу, який має  $pK_a$  близьке до цього значення. Присутність протонованого імідазолу ( $ImH^+$ ) може сприяти нуклеофільній атаці, оскільки це забезпечує позитивний заряд імідазолфосфатного комплексу, що залучає кисень гліцеролу.

Отже, у процесі взаємодії імідазолфосфату кальцію з гліцеролом за значення рН 7,5, активований імідазолфосфат притягує нуклеофіл, і в результаті формується фосфорильований продукт [81]. Окремі стадії механізму реакції можуть бути каталізовані наявністю сполук, які сприяють підвищенню швидкості та ефективності реакції. Цей механізм фосфорильовання може відігравати важливу роль у пребіотичних умовах, де наявність імідазолфосфату та підходящих нуклеофілів може сприяти фосфорильованню органічних сполук [82].

## РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 2.1. Об'єкти дослідження

Об'єктом дослідження даної роботи є селективність пребіотичних реакцій фосфорилування органічних молекул. Це стосується дослідження специфічних хімічних взаємодій та реакцій, що відбуваються, коли органічні молекули, такі як, наприклад, гліцерол і глюкоза, піддаються фосфорилуванню у пребіотичних умовах. Основна увага приділяється розумінню факторів, що впливають на селективність цих реакцій та утворення фосфорильованих продуктів.

Предметом дослідження даної роботи є вивчення селективності реакцій за участю різних органічних молекул, у тому числі гліцеролу, глюкози, ЦМФ, УМФ, гліцерату та дигідроксиацетону (ДГК) у пребіотичних умовах. Дослідження спрямоване на вивчення ролі гістидилів як каталізаторів перебігу реакцій фосфорилування та на розуміння того, як присутність імідазолфосфату кальцію у ролі агента фосфорилування впливає на селективність цих реакцій.

Дослідження спрямоване на виявлення конкретних молекулярних механізмів та факторів, які сприяють кращому фосфорилуванню одних органічних молекул порівняно з іншими. Воно включає вивчення структурних властивостей органічних молекул, каталітичної активності гістидилів та впливу фосфорилуючого агента на результати реакції.

#### 2.1.1. Обладнання, реактиви та матеріали

Усі реагенти були використані у тому вигляді, в якому вони були отримані від комерційних постачальників. Була використана вода MilliQ (MQ) (тобто надчиста деіонізована вода) від Millipore Corporation.

Наступні сполуки були придбані у Sigma Aldrich: оксид дейтерію, імідазол, магнію (II) хлорид, оксихлорид фосфору (V), монохлорид L-гістидину, хлорид цинку, гліцерол, аденозин 5'-монофосфат динатрієва сіль, дигідроксиацетон.

Наступні сполуки були придбані у Fisher Scientific: одноосновний безводний фосфат натрію, D-глюкоза, розчин 2,0 М хлоридна кислота, 2,0 М розчин гідроксиду натрію, універсальний рН-буферний набір Scientific Orion Standard All-in-One.

Наступні сполуки були придбані в TCI Europe: гліцерат кальцію.

У компанії Carbosynth були придбані такі сполуки: натрієва сіль цитидин-2'-монофосфату, уридин-3',5'-циклічний монофосфат натрієва сіль.

Наступні сполуки були придбані у Bachem: His-Lys, His-Asp.

Наступні сполуки були придбані у Fluorochem: лимонна кислота.

Спектри ядерного магнітного резонансу (ЯМР) на ядрах  $^1\text{H}$  та  $^{31}\text{P}$  вимірювали на спектрометрі Bruker-AVANCE III 500 при 500 МГц або на спектрометрі Bruker-AVANCE III 400 при 400 МГц.

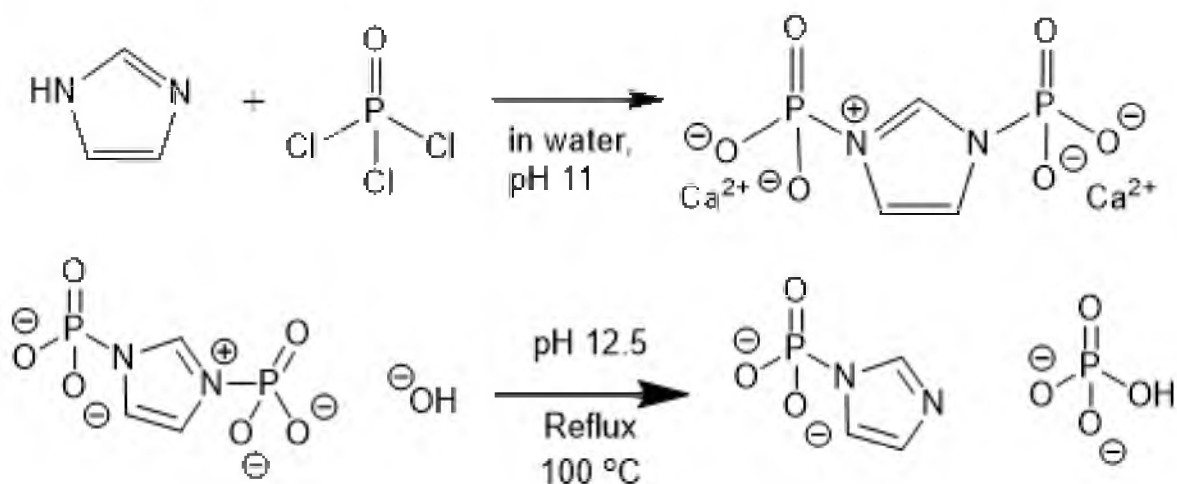
рН розчинів визначали за допомогою рН-метра Mettler Toledo Five Easy FE20 та рН-зонду Hamilton SpinTrodе. Вимірювач рН відкалібрований буферами Thermo Scientific Orion Standard при рН 4,01, рН 7,00, рН 10,00.

Всі дані були оброблені в MestReNova 14, Microsoft Excel та OriginPro 2018b.

## **2.2. Синтез агента фосфорилювання**

Синтез імідазолфосфату кальцію відбувається у два етапи. На першому етапі одержують дифосфоімідазол кальцію [83], після чого на другому етапі проводять його гідроліз з одержанням основного агента фосфорилювання [84].

Для синтезу імідазолфосфату кальцію через дифосфоімідазол кальцію було проведено ряд процесів із залученням імідазолу, оксихлориду фосфору (V), подальші реакції із солями магнію та кальцію, а також ряд фільтраційних процесів, промивка одержаних продуктів та висушування їх на лінії високого вакууму протягом ночі. Загальну схему реакцій синтезу імідазолфосфату кальцію зображено на рис.2.1.



**Рис.2.1.** Схема реакцій синтезу імідазолфосфату кальцію

Ці реакції та процеси приводять до утворення бажаних сполук, а кінцевий продукт – імідазолфосфат кальцію – можна використовувати як агент фосфорилування у дослідженнях пребіотичної хімії.

### 2.2.1. Методика Розенберга

- 1) 100 мл MilliQ і 5,05 г (0,073 моль) імідазолу додавали в тригорлу круглодонну колбу на 500 мл, з термометром, крапельною лійкою і магнітною мішалкою.
- 2) 5 М гідроксиду калію отримували шляхом розчинення 86,6 г 300 мл MQ, і за тією ж методикою готували ще більше.
- 3) Розчин імідазолу охолоджували в морозильній камері і потім поміщали на лазню з льодом до  $T=5^{\circ}\text{C}$  перемішуванні. 5 М КОН охолоджували в холодильнику, а потім поміщали в лазню з льодом, щоб мінімізувати підвищення температури при додаванні.
- 4) рН доводили до  $\sim 11$  додаванням 5 М КОН.
- 5) У крапельну воронку за допомогою шприца додавали 28 мл (0,300 моль) оксихлорид фосфору(V). POCl<sub>3</sub> у шприці руйнували етанолом, розведеним у діоксані.

- 6) Невелику порцію (<0,5 мл)  $\text{POCl}_3$  додавали до розчину імідазолу і відразу ж додавали 2 – 4 мл 5 М  $\text{KOH}$ , щоб довести рН до рН 11 – 12. рН регулярно перевіряли за допомогою скляна піпетка для вилучення розчину та два типи паперу для вимірювання рН у діапазоні рН від 1 до 11 та в діапазоні рН від 9,0 до 13,5. Пізніше в ході реакції виникли проблеми зі змішуванням, через що передбачається, що рідкий  $\text{POCl}_3$  частково відокремлюється від водного шару і залишається зверху. Доказом цього є вимірювання рН піпетками на різній глибині реакційної суміші. рН нагорі часто був нижчим, ніж на дні, незважаючи на те, що його добре перемішували. Між наступними додаваннями  $\text{POCl}_3$  залишали більше часу, щоб реакція могла пройти остаточно. Іноді рН падав приблизно до 7.
- 7) Температуру підтримували в межах 4 – 13 °C під час реакції (давали охолонути приблизно до 5 °C щоразу, коли вона досягала 15 – 20 °C). Охолодження 5 М розчину  $\text{KOH}$  на лані з кригою допомогло значно знизити температуру порівняно з попередніми синтезами. Температуру легко підтримували лише на рівні 10 °C.
- 8) Реакційну суміш залишали перемішувати ще на 50 хв. Спочатку рН підтримували лише на рівні 11, але цей період він знизився приблизно до 8.
- 9) рН реакційної суміші доводили до рН 9,5 за допомогою 3 мл 5 М  $\text{KOH}$ .
- 10) 24,95 г (близько 25 г)  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  розчиняли у 65 мл  $\text{MQ}$  і додавали до реакційної суміші, яку перемішували протягом 25 хвилин (15 у літературі). рН становить близько 7,5 М  $\text{KOH}$  підвищення рН до 8. За цей час утворюється осад.
- 11) Осад відфільтровували на вирві Бюхнера і відкидали (за літературними даними в основному складається з ортофосфату магнію). Деяка кількість ррт пройшла, але не була відфільтрована вдруге, так як було вирішено відфільтрувати його на наступному етапі з осадженням  $\text{CaPO}_4$ .
- 12) рН фільтрату впав до рН 6 і до фільтрату додали 5М  $\text{KOH}$  для отримання рН 8. При цьому утворився осад.

- 13) 15,1 г  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  розчиняли в 50 мл MQ і додавали велику частину до фільтрату, при цьому утворювалася молочно-біла суміш ( $\text{pH} = 6 - 7$ ). Додавали 5 М КОН для одержання  $\text{pH} 8$ .
- 14) Осад відфільтровували під вакуумом (через фільтр пройшло невелику кількість твердої речовини, за літературними даними фільтрат складається з ортофосфату кальцію та карбонату кальцію). Фільтрат знову фільтрували для видалення останнього шматочка осаду.
- 15) До фільтрату додавали 300 мл етанолу (1/2 об'єму, загальний об'єм 600 мл), при цьому випадав білий осад. Суміш залишають стояти у холодильнику на 2 години.
- 16) Утворився дрібний білий осад, який фільтрували під вакуумом. Осад двічі промивали 15 мл 25:75 етанолу: MQ, двічі 15 мл 50:50 етанолу: MQ і двічі 15 мл чистого етанолу, а потім поміщали вакуумну лінію на ніч для сушіння.
- 18) Додавали ще 300 мл етанолу, додавали до фільтрату та поміщали в холодильник на ніч.
- 19) Наступного дня перший осад сушили протягом ночі у високому вакуумі. Цей другий осад відфільтровували під вакуумом, промивали, як зазначено вище, і сушили у вакуумі протягом ночі.
- 20) Наступного дня перший осад був білим порошком масою 31,27 г [83].

### 2.2.2. Методика Купермана

Гідроліз  $\text{Ca}_2\text{DPI}$  до  $\text{CaImP}$ :

- 1) Масляну баню нагрівали до  $120\text{ }^\circ\text{C}$ . 402 мл розчину КОН з  $\text{pH} 12,5$  попередньо нагрівали до  $95\text{ }^\circ\text{C}$ .
- 2) 6,11 г (0,020 ммоль) твердого  $\text{Ca}_2\text{DPI}$  додавали до розчину КОН, відбувалось часткове розчинення. Розчин доводили до  $\text{pH} 12,5$  за допомогою 5 М КОН.  $\text{pH}$  розчину відстежували протягом усього процесу і підтримували на рівні 12,0 – 12,5 додаванням 5 М КОН.

- 3) Через 30 хв розчин зняли з нагрівальної поверхні та перелили у колбу, яку помістили на льодяну баню. Розчин охолоджували до 25 °С. Білий осад, що утворився, відфільтровували з використанням воронки Бюхнера.
- 4) Додавали 3,23 г (0,022 моль)  $\text{CaCl}_2$ , рН розчину доводили до 8,5. Осад, що утворився, видаляли фільтрацією у вакуумі з використанням воронки Бюхнера, а потім гравітаційною фільтрацією.
- 5) Додавали 1240 мл етанолу (попередньо охолодженого в холодильнику) та поміщали розчин в холодильник на 4 години. Білий осад, що утворився, відфільтровували і промивали 10 мл суміші, яка містила 75% етанолу і 25% води MQ, для наступної промивки використовували 10 мл чистого етанолу та 5 мл діетилового естеру, відповідно.
- 6) Білу тверду речовину поміщали на високовакуумну лінію на ніч [84].

### 2.3. Методи дослідження будови синтезованих сполук

#### 2.3.1. Метод ядерного магнітного резонансу

Сpektри ядерного магнітного резонансу (ЯМР) на ядрах  $^1\text{H}$  та  $^{31}\text{P}$  вимірювали на спектрометрі Bruker-AVANCE III 500 при 500 МГц або на спектрометрі Bruker-AVANCE III 400 при 400 МГц. Хімічні зсуви для  $^1\text{H}$  дані в мільйонних частках (ppm) і відкалібровані з використанням піку залишкового розчинника 4,79 для  $\text{D}_2\text{O}$  в  $^1\text{H}$  ЯМР. Мультиплети  $^{31}\text{P}$  позначаються як s (синглет), d (дублет), dd (дублет дублету), t (триплет), q (квартет) та m (мультиплет). Константи зв'язку,  $J$ , вказані у герцах (Гц). Кількість протонів (n) для даного резонансу позначається як nH і ґрунтується на значеннях спектрального інтегрування.

Кількісну спектроскопію проводили всім спектрам  $^{31}\text{P}$  ЯМР. Імпульсна послідовність була встановлена з 8 перехідними процесами ( $nt = 8$ ),  $P1 = 13$  мс, що наближено відповідає куту імпульсу  $90^\circ$ , і затримкою релаксації  $d1$ , що дорівнює 30 с, для забезпечення повної релаксації ядер між кожним перехідним процесом.

Послідовність пригнічення розчинника використовували для вимірювання спектрів  $^1\text{H}$  ЯМР, коли використовували розчинник 9:1  $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$  [38].

### **2.3.2. Вимірювання часу релаксації T1 для кількісних експериментів ЯМР $^{31}\text{P}$**

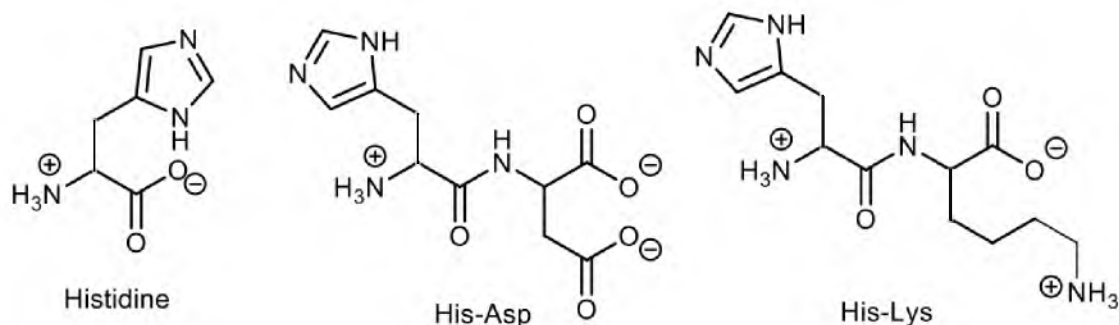
Було виміряно кут імпульсу  $90^\circ$  і час релаксації T1 для ядер  $^{31}\text{P}$  у ряді важливих фосфатвмісних сполук, які використовувалися у дослідженні. Максимальний вимірний час релаксації T1 становив 3,2 с для ортофосфату.

Для того, щоб на основі одержаних в результаті ЯМР-аналізу даних, розрахувати кількісний вихід, експеримент ЯМР з  $90^\circ$  імпульсом вимагає затримки  $5 \cdot T1$ . Ця затримка забезпечує повну релаксацію ядер у орієнтацію прикладеного магнітного поля. Для даних експериментів  $^{31}\text{P}$ -ЯМР з ортофосфатом  $T1 = 3,2$  це означає, що для кількісних експериментів  $^{31}\text{P}$ -ЯМР потрібна мінімальна затримка у 16,0 с [38].

Отже, ми використовували затримку d1, рівну 30,0 с. Враховуючи час збору даних, який становить 1,5 – 2,0 с, це означає, що на релаксацію ядер було виділено в цілому 31,5 – 32,0 с. Таким чином, затримка приблизно вдвічі перевищує мінімальне необхідне значення, тому наші експерименти на  $^{31}\text{P}$ -ЯМР є кількісними.

### **2.4. Метод дослідження селективного фосфорилування пребіотично важливих органічних молекул у пасті**

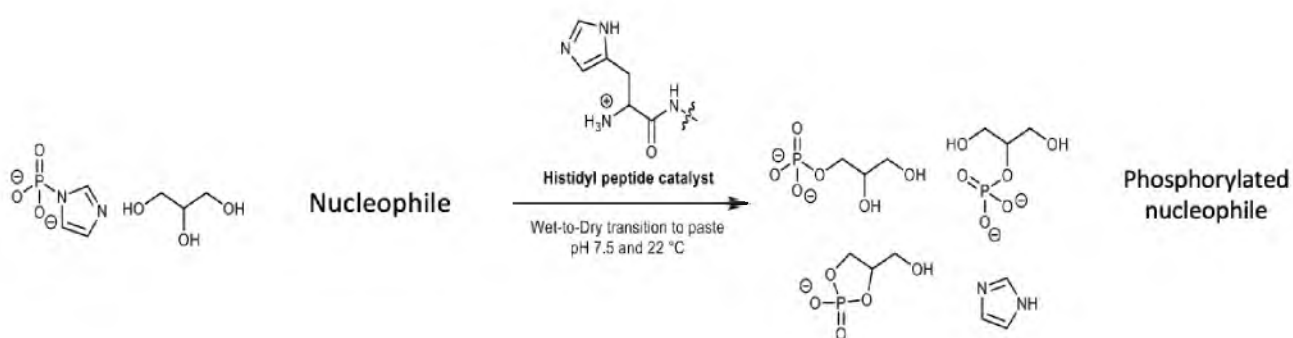
Задля вивчення селективного фосфорилування у пасті (під час переходу досліджуваних систем від мокрого стану до більш сухого пастоподібного стану), готували розчин з імідазолфосфата кальцію з двома нуклеофілами та гістидил-пептидним каталізатором (His, His-Asp, His-Lys, рис.2.2).



**Рис.2.2.** Гістидил-пептидні каталізатори, які використовувались у даній роботі

Активність води у системах зменшувалася з часом завдяки її випаровуванню з реакційного середовища під час висихання систем під витяжною шафою протягом ночі. Для контролю селективності процесів фосфорилування у присутності каталізаторів було також здійснено некаталізовані реакції для усіх систем.

Селективність реакцій досліджували на прикладі фосфорилування двох нуклеofilів, одним з яким завжди виступав гліцерол. У ролі другого нуклеофіла було обрано такі реагенти, як глюкоза, дигідроксиацетон (ДГА), цитидинмонофосфат (ЦМФ), уридинмонофосфат (УМФ), а також гліцерат. Усі реакції проводили з моделюванням м'яких пребіотично вірогідних умов та концентрацій реагентів. Загальна схема процесу фосфорилування зображена на рис.2.3.



**Рис.2.3.** Загальна схема процесу фосфорилування за присутності двох нуклеофілів та імідазолфосфату кальцію у ролі агента фосфорилування

Для дослідів з глюкозою та гліцератом додавали 25-кратний надлишок нуклеофілів, що має перешкоджати утворенню ортофосфату або пірофосфату – продуктам гідролізу імідазолфосфату кальцію. З цією ж метою, для дослідів з цитидинмонофосфатом та уридинмонофосфатом додавали їх у 4-кратному надлишку. Гліцерол у всіх випадках додавали в 25-кратному надлишку.

**Табл.2.1.** Молекулярна маса, кількість та концентрація сполук, використаних під час пребіотичних реакцій селективного фосфорилування

Сполука	М (г/моль)	N (ммоль)	Маса (г)	С, М
Гістидин	155,157	0,13	0,020	0,065
Гістидин-Аспаргат	270,25	0,13	0,035	0,065
Гістидин-Лізин	364,2	0,13	0,047	0,065
Гліцерол	92,09382	3,25	0,299	1,625
Глюкоза	180,156	3,25	0,5855	1,625
Імідазолфосфат кальцію	186,12	0,13	0,024	0,065
Дигідроксиацетон	90,078	0,13	0,293	1,625
ЦМФ (2Na <sup>+</sup> )	367,16	0,544	0,2	0,272
УМФ (2Na <sup>+</sup> )	368,15	0,544	0,2	0,272
Гліцерат (Na <sup>+</sup> )	128,06	3,25	0,416	1,625

Нуклеофіли розчиняли у 2 мл води MilliQ, додавали імідазолфосфат кальцію та гістидил-пептидні каталізатори.

Водневий показник розчинів було скориговано до рН = 7,5 на початку процесів з використанням 5,0 М розчину КОН та 1,0 М розчину НСІ.

Розчин поміщали у чашки Петрі діаметром близько 5 см у вигляді однієї рідкої краплі та залишали висихати під витяжною шафою протягом ночі. Перший зразок відбирали одразу після перенесення розчинів на чашки Петрі. Далі відбирали зразки отриманих паст з часом, поміщали їх до морозильної камери за температури -20 °С, після чого згодом розчиняли у буфері з лимонною кислотою для ЯМР-аналізу. Відбирали зразки з розчину/пасти кожні 2 години протягом

робочого дня. У випадках, коли реакційна система мала більш рідкий, сиропоподібний вигляд, відбирали пробу у вигляді 10 мкл розчину. Якщо ж реакційна система перебувала у пастоподібному стані, використовували шпатель для відбору проби. Для проведення ЯМР-аналізу використовували 0,5 М буфер лимонної кислоти за рН 6,85 (9:1 H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O) об'ємом 500 мкл (0,5 мл) для повного розчинення зразка перед аналізом на ЯМР-спектрометрі.

## **2.5. Визначення виходу реакцій за допомогою спектроскопії <sup>31</sup>P ЯМР**

Кількісні виходи продуктів усіх реакцій фосфорилування були визначені шляхом інтегрування всіх піків у спектрах <sup>31</sup>P ЯМР, підсумовування всіх цих інтегралів та розрахунку виходу на основі цього загального підсумованого інтеграла. Для реакцій фосфорилування у більшості випадків єдиною речовиною, що містить фосфат на початку реакції, був імідазолфосфат. Таким чином, шляхом підсумовування інтегралів всіх сполук, що містять фосфат, ми отримали загальну вихідну концентрацію імідазолфосфату. Виходи визначали щодо сумарного інтегралу для всіх фосфорильованих сполук. Винятком були експерименти, у яких монофосфати фосфорилувалися з утворенням дифосфатів. У цих випадках для розрахунку сумарного інтегралу враховувалися ті сигнали фосфату в спектрах <sup>31</sup>P ЯМР, які виникають через ортофосфат (наприклад, включався сигнал від бета-фосфату в уридиндифосфаті, але не від альфа-фосфату). За селективність реакції фосфорилування приймали долю (у відсотках) фосфату гліцеролу у продуктах реакції фосфорилування двох нуклеофілів.

### **2.5.1. Солубілізація солей фосфату кальцію при використанні хелатуючого буфера**

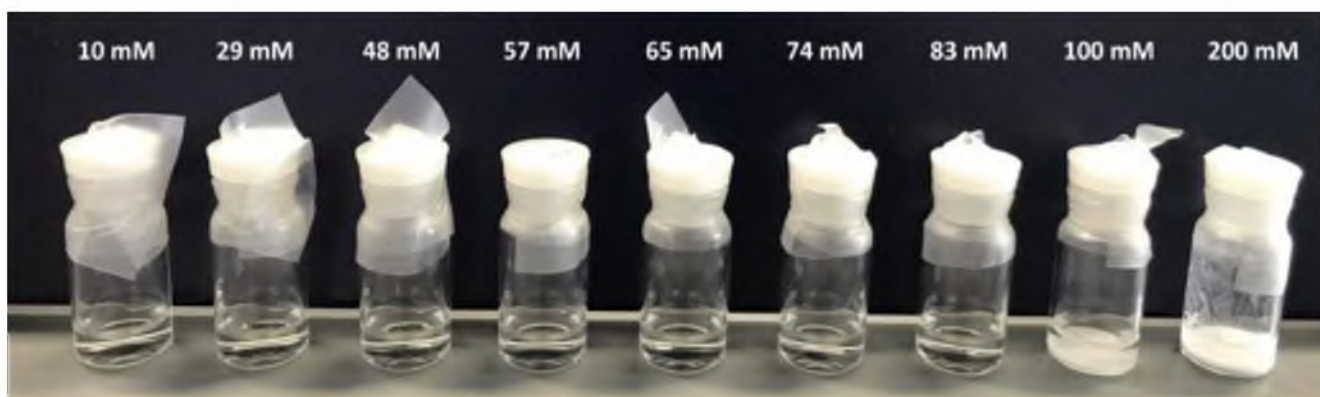
У всіх селективних реакціях пребіотичного фосфорилування присутні фосфат кальцію, імідазолфосфат кальцію і складні моноефіри фосфату кальцію. Добре відомо, що фосфат кальцію та споріднені з ним сполуки легко осаджуються

у воді, і якби такі осади були присутні під час аналізу за допомогою ЯМР-спектроскопії, це призвело б до неточних результатів. Однак у наших експериментах ми уникнули даної проблеми осадження солей фосфату кальцію, використовуючи буфер лимонної кислоти. Аналіз паст проводили у 0,5 М буфері лимонної кислоти при рН 6,85. Лимонна кислота (технічно цитрат) хелатує іони  $\text{Ca}^{2+}$  і, таким чином, забезпечує повну розчинність реакційних систем (паст). Це надає впевненість у тому, що всі сигнали фосфору були присутні у спектрах ЯМР, і, отже, обчислені виходи продуктів фосфорилування, наведені у наступному розділі, є точними.

Для визначення межі розчинності фосфату кальцію в 0,5 М буфері лимонної кислоти були приготовлені еквімолярні розчини кальцію хлориду і фосфату натрію з концентрацією від 10 мМ до 200 мМ. Вихідні розчини 2 М хлориду кальцію (222 мг, 2 ммоль в 1 мл води); (додавали воду краплями до твердого хлориду кальцію на крижаній бані, оскільки розчинення сильно екзотермічне) і 2 М одноосновного фосфату натрію (240 мг, 2 ммоль в 1 мл води). Відповідні об'єми цих вихідних розчинів додавали до 1 мл 0,5 М буферу лимонної кислоти, щоб приготувати розчини 10-83 мМ хлориду кальцію і фосфату натрію.

Розчини 100 мМ і 200 мМ готували шляхом розчинення хлориду кальцію (для 100 мМ 11,1 мг, для 200 мМ 22,2 мг) та одноосновного фосфату натрію (для 100 мМ 12,0 мг, для 200 мМ 24,0 мг) 0,5 М буфер лимонної кислоти рН 6.9. Розчини залишали на 24 години для утворення осаду перед перевіркою. На рис.2.4 показано, що фосфат кальцію осідає при концентраціях вище 83 мМ і, отже, межа розчинності фосфату кальцію у цих умовах становить від 74 до 83 мМ.

Фосфат кальцію можна побачити у вигляді білого осаду у розчинах з концентрацією 83 мМ та вище. При 83 мМ спостерігалася лише незначна кількість осаду, тому його не видно на фотографії. Розчини залишали на 24 години перед фотографуванням, щоб дати час для утворення осаду.



**Рис.2.4.** Флакони, що містять розчини з еквімолярними концентраціями хлориду кальцію та фосфату натрію від 10 мМ до 200 мМ у 0,5 М буфері лимонної кислоти, рН 6,5

Зазначимо, що в той час як фосфат кальцію ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) має співвідношення іонів кальцію до іонів фосфату становить 3:2, ми готували розчини у співвідношенні 1:1. Таке рішення біло прийнято, адже кожного разу під час додавання іонів кальцію до реакції, вони були у формі імідазолфосфату кальцію, де співвідношення іонів кальцію до іонів фосфату становить 1:1. Тому для отримання результатів, які найбільш підходять для даної роботи, також готували розчини з еквімолярними (1:1) концентраціями хлориду кальцію та одноосновного фосфату натрію у 0,5 М буфері лимонної кислоти.

Для дослідження реакцій селективного фосфорилування у пребіотичних умовах, де ми стежили за перебігом реакції між імідазолфосфатом кальцію та різними нуклеофілами в пасті з плином часу, ми проаналізували хід реакції, відібравши приблизно 10 мг зразків з паст, які потім були розчинені в 0,5 мл 0,5 М буфера лимонної кислоти (рН 6,85). Виходячи з сухої маси реагентів, доданих до пасти, максимальна концентрація іонів кальцію та іонів фосфату становитиме 30 мМ. Практичні концентрації, імовірно, були нижчими, оскільки пасти були ще вологими. Враховуючи, що межа розчинності фосфату кальцію становить від 74 до 83 мМ, максимальна концентрація 30 мМ у наших експериментах значно нижча за межу розчинності, і, отже, весь фосфат кальцію був солубілізований, і тому ЯМР-аналіз був кількісним.

## РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 3.1. Одержання імідазолфосфату кальцію

Для того, аби синтезувати імідазолфосфат кальцію, на першому етапі одержали дифосфоімідазол кальцію за адаптованою методикою Розенберга. На другому етапі синтезу проводили гідроліз дифосфоімідазолу кальцію, використовуючи адаптовану методику Купермана для одержання імідазолфосфату кальцію.

У табл.3.1 наведено маси, кількість речовини та об'єми сполук, використаних під час синтезу на першому та другому етапах.

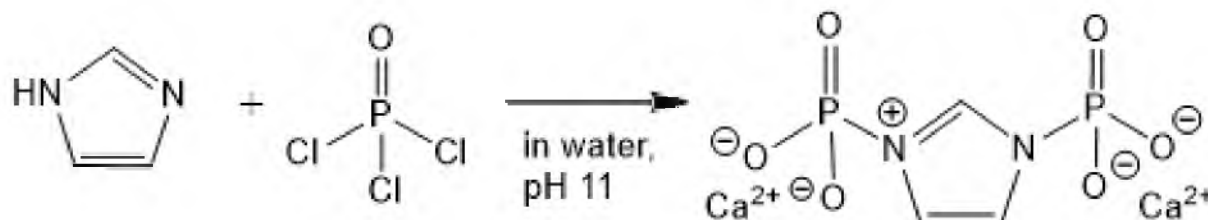
**Табл.3.1.** Маси, кількість речовини та об'єми сполук, використаних під час синтезу

Компонент	Молекулярна маса, г/моль	Кількість речовини, моль	Маса, г
$\text{POCl}_3$	153.33	0.300	46.06
Імідазол	68.08	0.073	5
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	203.3	0.123	25
$\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	110.99	0.136	15.1
КОН	56.11	1.543	86.58

Будову одержаних сполук на кожному етапі синтезу перевіряли та підтверджували з використанням ЯМР-аналізу на ядрах  $^1\text{H}$  та  $^{31}\text{P}$ .

### 3.1.1. Синтез дифосфоїмідазолу кальцію

Для отримання дифосфоїмідазолу кальцію використовували адаптовану методику Розенберга (рис.3.1) [83].



**Рис.3.1.** Схема реакції синтезу дифосфоїмідазолу кальцію за адаптованою методикою Розенберга

У тригорлу круглодонну колбу на 500 мл поміщали 5,05 г (0,073 моль) імідазолу та додавали магнітну мішалку. Доливали 100 мл води MilliQ для розчинення імідазолу з одержанням розчину з концентрацією 730 мМ. Водневий показник розчину доводили до рН 11, використовуючи 5 М розчин КОН. Потім розчин імідазолу охолоджували до 5 °С у холодильнику. Після охолодження розчин імідазолу поміщали на льодяну баню, вмикаючи магнітну мішалку та приєднували крапельну воронку, через яку згодом додавали 28 мл (0,3 моль) оксихлориду фосфору (V). Оксихлорид фосфору (V) додавали по краплях до розчину імідазолу, що постійно перемішувався, протягом 5,25 год, підтримуючи температуру в межах 5 – 15 °С.

Сильно екзотермічна реакція між оксихлоридом фосфору (V) і водою вимагає часу для охолодження розчину. Після кожного додавання оксихлориду фосфору (V) рН розчину перевіряли за допомогою індикаторного паперу і підтримували на рівні рН 11 за допомогою 5 М розчину КОН (5 М розчин КОН витримували на льодяній бані, щоб звести до мінімуму підвищення температури).

Після останнього додавання оксихлориду фосфору (V) розчину залишали нагріватися до кімнатної температури протягом 50 хвилин, у той час як рН підтримували на рівні 11 за допомогою 5 М розчину КОН.

Для виділення дифосфоімідазолу кальцію знадобився ряд стадій. Після досягнення кімнатної температури рН розчину доводили до рН 9,5 завдяки 5 М розчину HCl. 25,0 г (0,123 моль)  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  розчиняли у 65 мл води MilliQ з отриманням 1,9 М розчину. До реакційного розчину додавали розчин солі  $MgCl_2$  та перемішували протягом 25 хв, при цьому утворювався білий осад. Водневий показник знизився до рН 7 при додаванні розчину  $MgCl_2$  і був скоригований до рН 8 за допомогою розчину 5 М KOH.

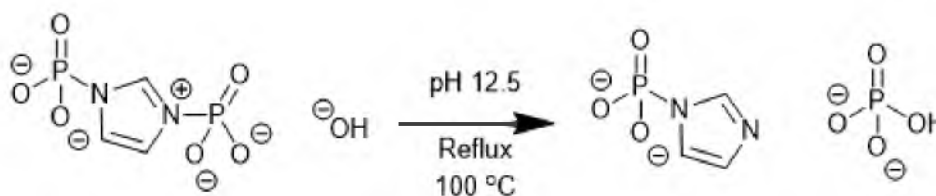
Осад, що утворився, видаляли вакуумною фільтрацією з використанням воронки Бюхнера. Водневий показник фільтрату доводили до рН 8.

15,1 г (0,136 моль)  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  розчиняли в 50 мл води MilliQ з отриманням 2,72 М розчину. До фільтрату з попередньої стадії додавали розчин  $CaCl_2$ , при цьому утворювався молочно-білий осад, а рН підтримували на рівні рН 8. Розчин двічі фільтрували під вакуумом для видалення всього осаду і знову доводили фільтрат до рН 8. Об'єм фільтрату тепер становив приблизно 600 мл; до фільтрату додали 300 мл етанолу (1/2 об'єму фільтрату) і потім помістили у холодильник на 2 години.

Через 2 години утворився дрібний білий осад, який відфільтрували під вакуумом. Осад двічі промивали 25 мл суміші води MilliQ з етанолом у співвідношенні 25 : 75, двічі промивали 25 мл суміші води MilliQ з етанолом у співвідношенні 50 : 50 і двічі промивали 25 мл етанолу. Потім осад збирали та сушили на лінії високого вакууму протягом ночі.

### **3.1.2. Синтез імідазолфосфату кальцію**

Для отримання імідазолфосфату кальцію використовували адаптовану методику Купермана (рис.3.2) [84].



**Рис.3.2.** Схема реакції синтезу імідазолфосфату кальцію за адаптованою методикою Купермана

Тригорлу круглодонну колбу на 500 мл наповнювали 402 мл розчину КОН при рН 12,5 і нагрівали до температури кипіння зі зворотним холодильником на масляній бані. Після кип'ятіння до розчину додавали 6,11 г (0,020 моль) дифосфоімідазолу кальцію, синтезованого на попередньому етапі. Значення водневого показника підтримували між рН 12,0 – 12,5 з використанням 5 М КОН.

Розчин кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 30 хвилин, зняли з нагрівальної поверхні і охолодили до 15 °С на льодяній бані. Білий осад видаляли фільтруванням під вакуумом, рН фільтрату доводили до рН 8,5.

3,23 г (0,022 моль)  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  розчиняли у 10 мл води MilliQ з отриманням 2,2 М розчину. Цей розчин  $\text{CaCl}_2$  додавали до фільтрату, при цьому утворювався білий осад. Водневий показник постійно підтримували лише на рівні рН 8,5. Більшу частину білого осаду видаляли вакуумною фільтрацією, а для видалення залишків осаду використовували гравітаційну фільтрацію.

Об'єм фільтрату становив 413 мл; до фільтрату додали 1240 мл етанолу (3-кратний об'єм фільтрату). Розчин помістили у холодильник на 4 години. Дрібний білий осад, що утворився, відфільтровували під вакуумом і промивали 10 мл суміші етанолу та води MilliQ у співвідношенні 75:25, згодом промивали 10 мл етанолу і 5 мл діетилового ефіру.

Одержану в результаті синтезу білу тверду речовину збирали та сушили на лінії високого вакууму протягом ночі.

### 3.2. Підтвердження будови синтезованих речовин

Будову одержаних у процесі синтезу дифосфоїмідазолу кальцію та імідазолфосфату кальцію було перевірено та підтверджено за допомогою методу ядерного магнітного резонансу.

#### 3.2.1. Аналіз ЯМР-спектрів дифосфоїмідазолу кальцію

Отриманий твердий дифосфоїмідазол кальцію мав масу 31,3 г (кількісний вихід). Одержаний  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр зразка підтверджує будову дифосфоїмідазолу кальцію (рис.3.3).

$^1\text{H}$  ЯМР (400,2 МГц, 9:1  $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ ): дифосфоїмідазол  $\delta$  (м.д.) = 8,3 (с, 1H), 7,36 (д,  $J = 1,6$  Гц, 2H).

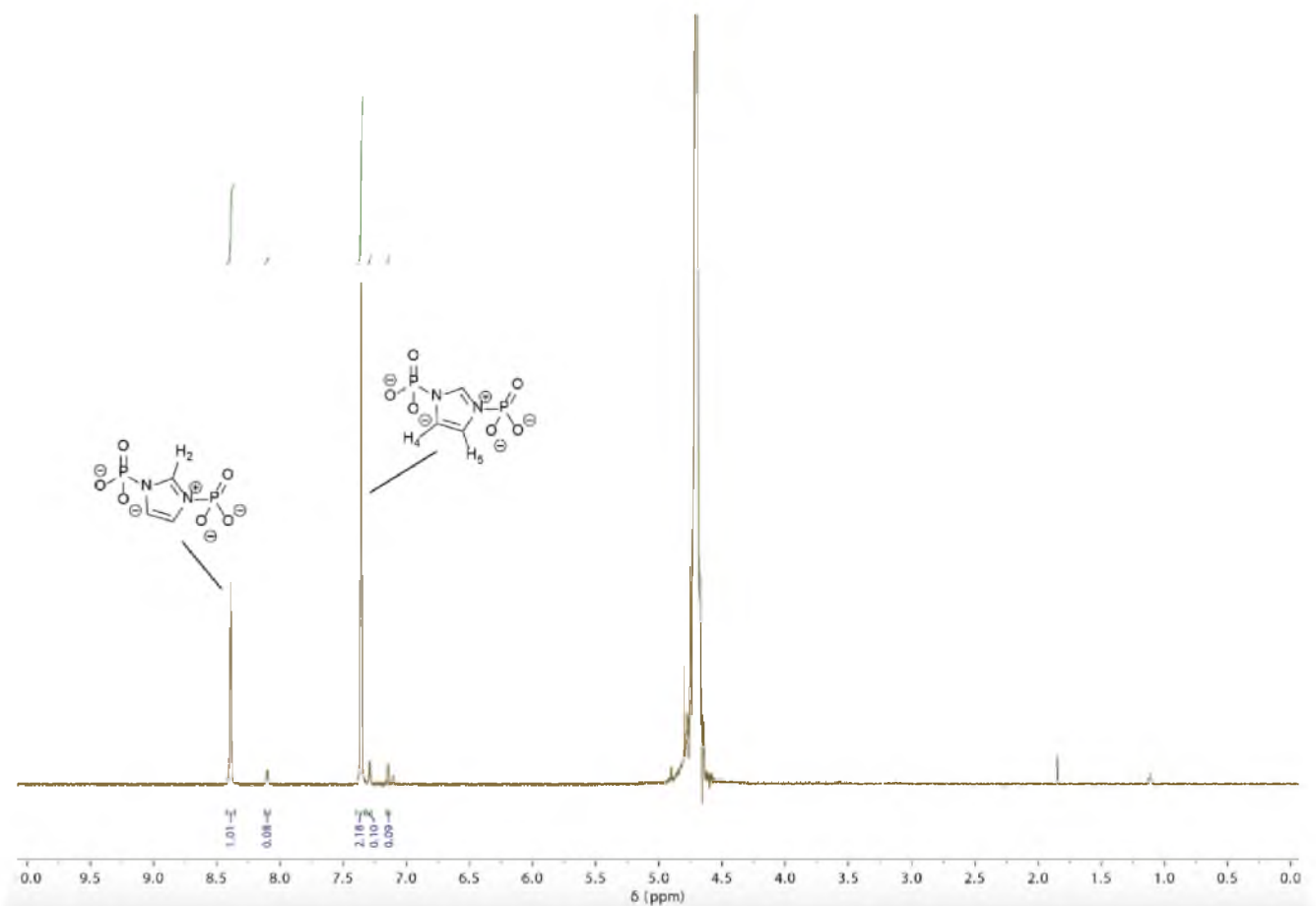
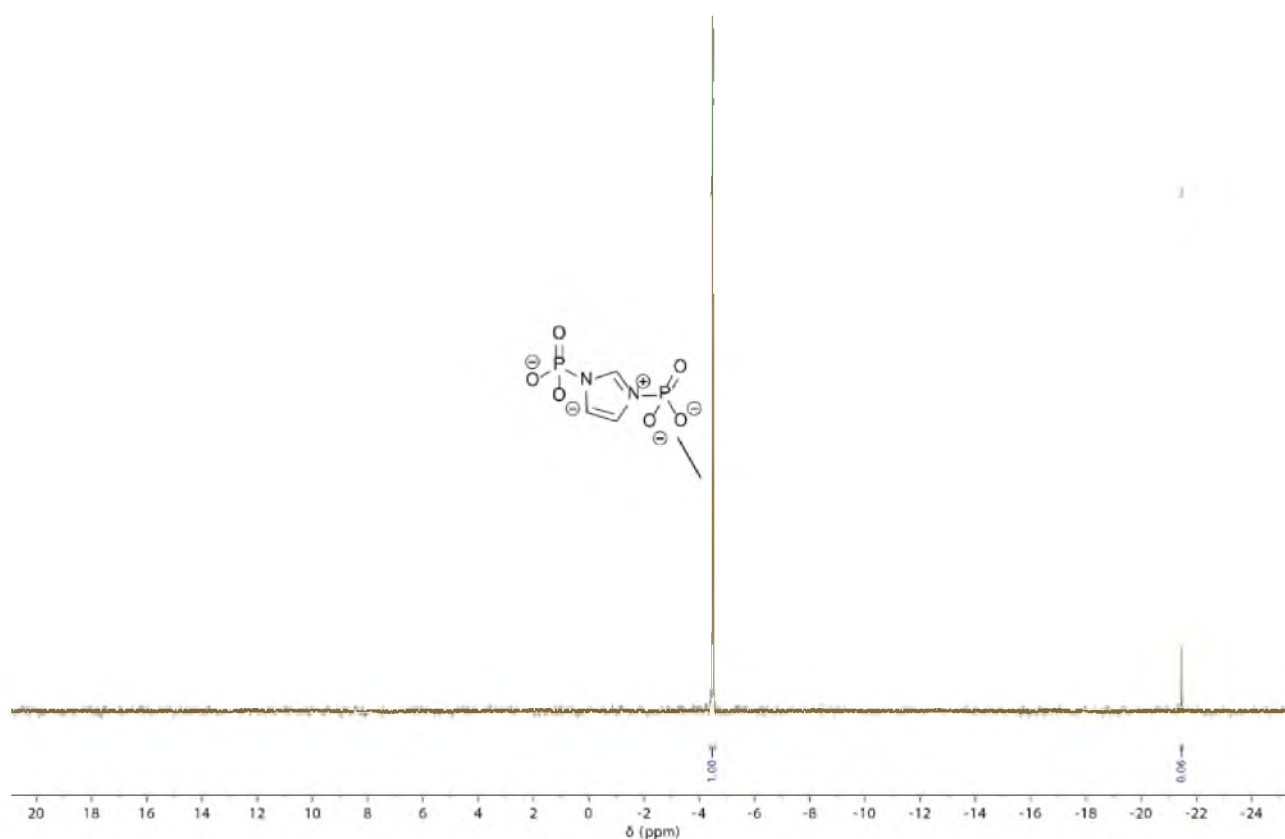


Рис.3.3. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР дифосфоїмідазолу кальцію

На спектрі  $^1\text{H}$  ЯМР спостерігаються два чітко виражені піки. Перший пік проявляється як синглет при хімічному зсуві 8,3 м.ч., що відповідає атому гідрогену в структурі імідазольного кільця, позначеного на рис.3.3. Другий пік проявляється як дублет при 7,36 м.ч. із константою зв'язку (J) 1,6 Гц, що передбачає наявність двох протонів з однаковим оточенням в структурі імідазольного кільця. Хімічні зсуви дають уявлення про електронне оточення та молекулярну структуру протонів у дифосфоімідазолі кальцію.

Одержаний  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектр зразка підтверджує будову дифосфоімідазолу кальцію (рис.3.4).

$^{31}\text{P}$  ЯМР (162,0 МГц, 9:1  $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ ): дифосфоімідазол  $\delta$  (м.д.) = -4,41 (с, 2P).



**Рис.3.4.** Спектр  $^{31}\text{P}$  ЯМР дифосфоімідазолу кальцію

На спектрі  $^{31}\text{P}$  ЯМР спостерігається один пік при зсуві -4,41 м.ч. Сигнал проявляється у вигляді синглету, що вказує на присутність двох атомів фосфору з

ідентичним оточенням у структурі дифосфоїмідазолу кальцію. Хімічний зсув надає інформацію про електронне оточення та зв'язок атомів фосфору.

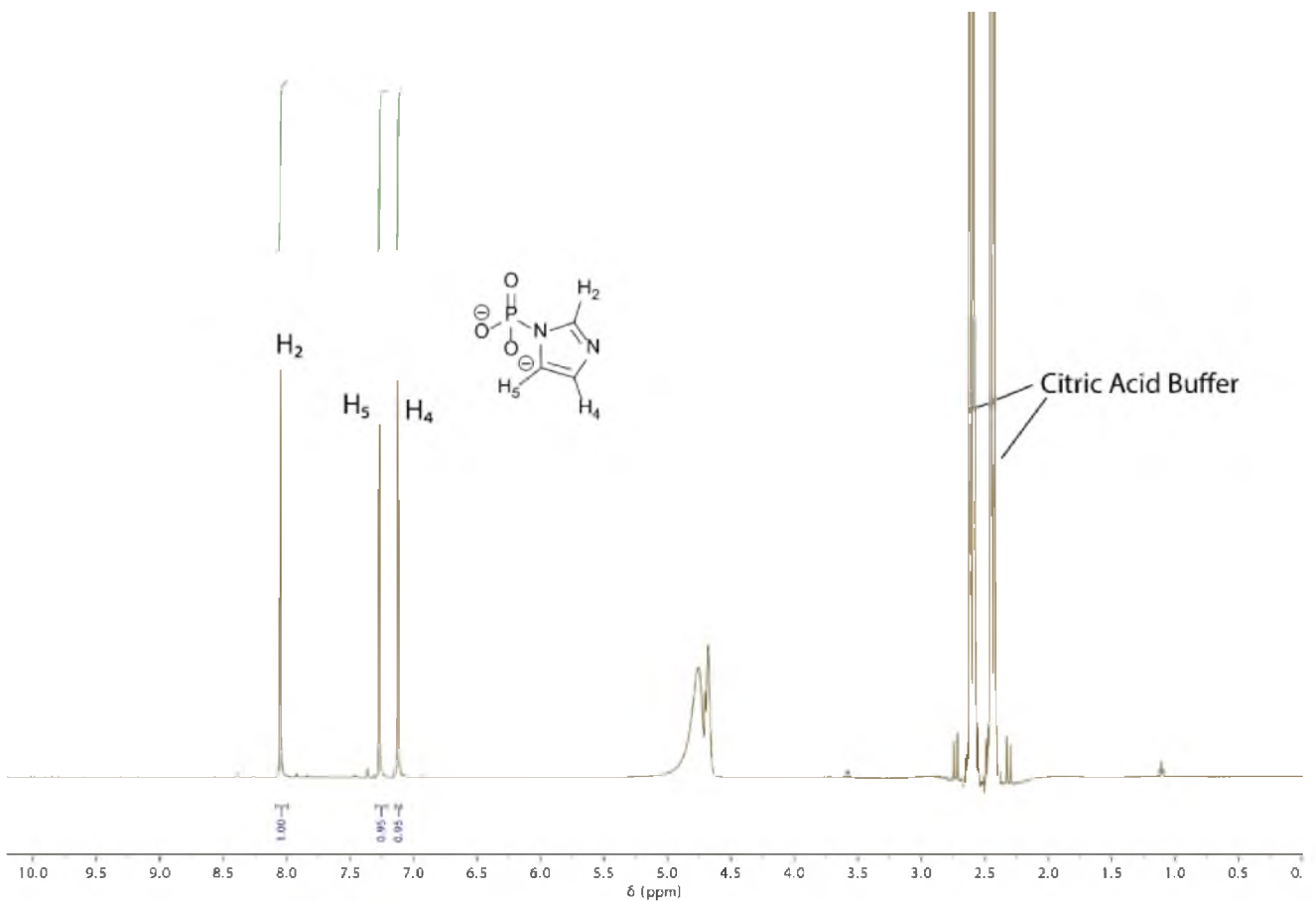
В цілому дані спектрів ЯМР для дифосфоїмідазолу кальцію свідчать про успішний синтез сполуки з високим кількісним виходом. Спектр  $^{31}\text{P}$  ЯМР містить один пік  $-4,41$  м.ч., що підтверджує наявність двох атомів фосфору. Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР містить піки на  $8,3$  м.ч. та  $7,36$  м.ч., що вказує на присутність атомів гідрогену у різних хімічних оточеннях. Ці дані ЯМР-аналізу надають важливу інформацію про молекулярну структуру та хімічні властивості дифосфоїмідазолу кальцію, підтверджуючи його характеристики для подальшого застосування у процесі синтезу імідазолфосфату кальцію.

### 3.2.2. Аналіз ЯМР-спектрів імідазолфосфату кальцію

Отриманий твердий імідазолфосфат кальцію мав масу  $1,09$  г ( $0,006$  моль, вихід  $29\%$ ). Такий кількісний вихід свідчить про успішність застосування адаптованої методики Купермана для одержання імідазолфосфату кальцію.

Одержаний  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр зразка підтверджує будову імідазолфосфату кальцію (рис.3.5).

$^1\text{H}$  ЯМР ( $500,1$  МГц,  $9:1$   $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ ): імідазолфосфат  $\delta$  (м.д.) =  $8,05$  (с,  $1\text{H}$ ),  $7,27$  (д,  $J = 1,0$  Гц,  $1\text{H}$ ),  $7,13$  (д,  $J = 1,0$  Гц,  $1\text{H}$ ).

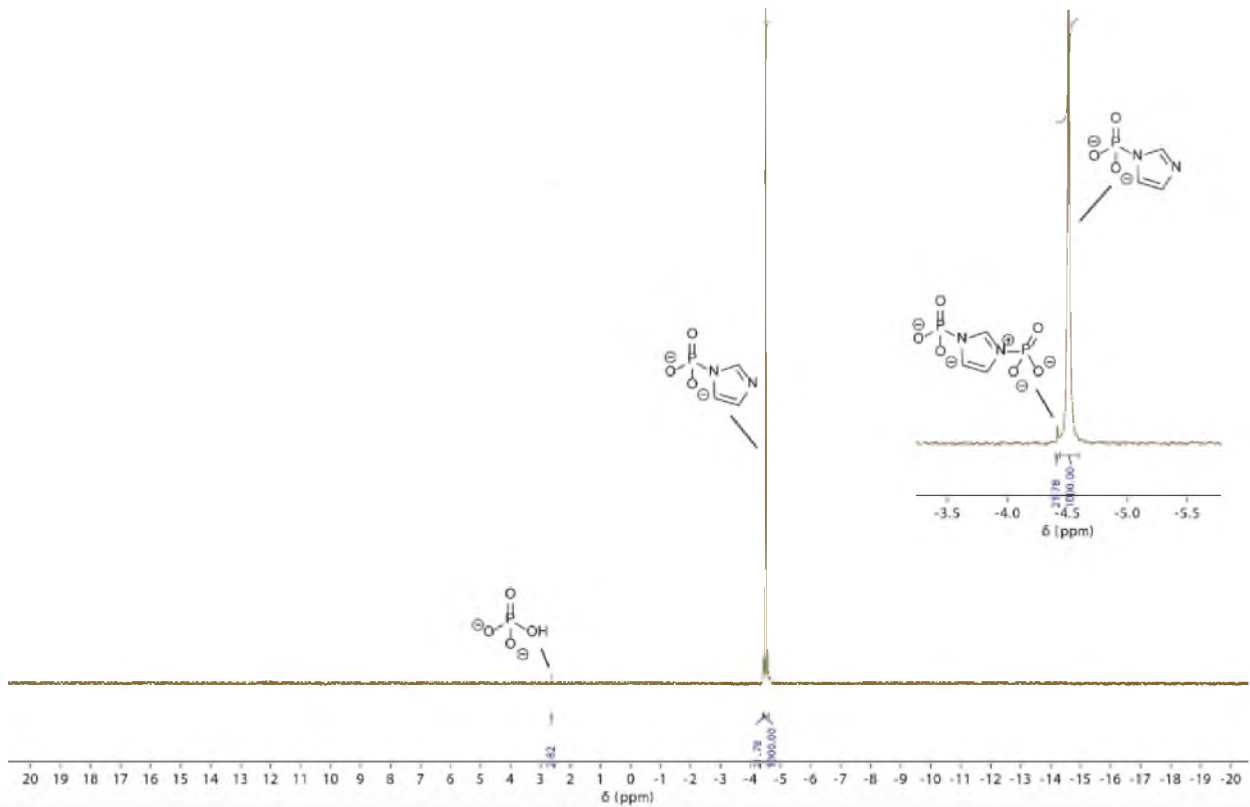


**Рис.3.5.** Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР імідазолфосфату кальцію

Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР імідазолфосфату кальцію демонструє три виразні піки. Перший пік проявляється у вигляді синглету при хімічному зсуві 8,05 м.ч., що вказує на присутність протона в унікальному хімічному оточенні і відповідає атому гідрогена  $\text{H}_2$  на рис.3.5. Другий і третій піки проявляються у вигляді дублетів при 7,27 м.ч. і 7,13 м.ч. із константою зв'язку ( $J$ ) 1,0 Гц, і відповідають сигналам атомів  $\text{H}_5$  та  $\text{H}_4$  у структурі імідазольного кільця (рис.3.5).

Одержаний  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектр зразка підтверджує будову імідазолфосфату кальцію (рис.3.6).

$^{31}\text{P}$  ЯМР (202,5 МГц, 9:1  $\text{H}_2\text{O}$ :  $\text{D}_2\text{O}$ ): імідазолфосфат  $\delta$  (м.д.) = -4,51 (с, 1P).



**Рис.3.6.** Спектр  $^{31}\text{P}$  ЯМР імідазолфосфату кальцію

Спектр  $^{31}\text{P}$  ЯМР імідазолфосфату кальцію демонструє один пік при хімічному зсуві -4,51 м.ч. Цей пік має вигляд синглету, що відповідає фосфору у структурі молекули імідазолфосфату кальцію. Пік при хімічному зсуві 2,82 м.ч. відповідає фосфору у складі ортофосфатної групи; пік при -4,41 м.ч. відповідає залишкам дифосфоімідазолу кальцію, що є нормальним явищем і не спричиняє негативного впливу на реакції фосфорилування. Хімічний зсув дає цінну інформацію про електронне оточення та реакційні властивості атома фосфору в імідазолфосфаті кальцію.

Дані спектрів ЯМР для імідазолфосфату кальцію дозволяють перевірити склад та хімічні властивості синтезованої сполуки. Ці дані дають змогу підтвердити та краще зрозуміти будову імідазолфосфату кальцію, підкреслюючи його потенційну роль фосфорилуючого агента у пребіотичних реакціях.

Інформація, одержана зі спектрів ЯМР є цінним інструментом для оцінки чистоти та ідентичності синтезованої сполуки, що дозволяє проводити подальші

дослідження реакційної здатності та потенційних застосувань імідазолфосфату кальцію у дослідженнях пребіотичної хімії.

### 3.3. Дослідження кінетики у реакціях селективного фосфорилування органічних молекул

Для усіх реакцій селективного фосфорилування було використано імідазолфосфат кальцію у ролі агента фосфорилування. Досліджували процес фосфорилування двох нуклеофілів, що конкурують у процесі атакуювання фосфатної групи, з яких один завжди був гліцерол. Вивчали як некаталізовану реакцію фосфорилування нуклеофілів, так і за присутності гістидил-пептидних каталізаторів. Якісні та кількісні визначення складу реакційної суміші було проведено за допомогою методу  $^{31}\text{P}$  ЯМР,  $^1\text{H}$ -ЯМР та  $^1\text{H}$   $^{31}\text{P}$  НМВС (гетероядерна кореляція множинних зв'язків) методом ЯМР-спектроскопії. Спектри, отримані в результаті аналізів  $^1\text{H}$ -ЯМР та  $^1\text{H}$   $^{31}\text{P}$  НМВС, були використані для однозначного підтвердження приналежності сигналів на спектрі до утворених фосфорильованих продуктів. Для визначення кількісних виходів продуктів реакцій фосфорилування використовували  $^{31}\text{P}$  ЯМР спектроскопію. Шляхом інтегрування піків у спектрах  $^{31}\text{P}$  ЯМР та підсумовування цих інтегралів з використанням програми Microsoft Excel, було розраховано загальний показник розподілу фосфату серед усіх утворених продуктів фосфорилування.

Зокрема, у реакціях селективного фосфорилування основною речовиною, яка містить фосфат на початку реакції, був імідазолфосфат кальцію. Тому, методом підсумовування інтегралів всіх сполук, які містять фосфат, ми змогли визначити загальну початкову концентрацію імідазолфосфату. Цей підхід дозволяє нам кількісно оцінити ефективність фосфорилування, зокрема, визначити відсоток утворення цільових фосфорильованих сполук від загального пулу реагентів.

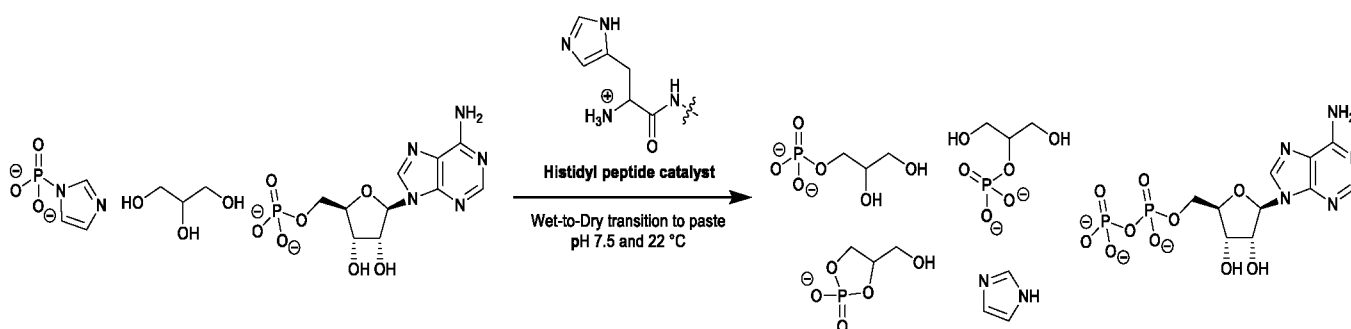
Для кожної системи реагентів було використано 4 чашки Петрі. Вивчали кінетику фосфорилування. Проби для аналізу відбирали кожні дві години протягом робочого дня; усього було відібрано 14 проб для кожної чашки Петрі. Загалом, у цій

роботі представлено кількісні результати виходу продуктів реакцій селективного фосфорилування у м'яких пребіотичних умовах, одержані унаслідок аналізу 280 спектрів  $^{31}\text{P}$  ЯМР. Під час виконання даної роботи було записано та проаналізовано понад 1000 спектрів  $^{31}\text{P}$  ЯМР.

Застосування  $^{31}\text{P}$  ЯМР спектроскопії та інтегрування піків сприяє точному визначенню концентрації імідазолфосфату та інших фосфорильованих сполук, що утворюються в процесі реакцій. Це важливий крок у розумінні механізмів фосфорилування та вивченні його значення для пребіотичної хімії. Аналіз спектрів  $^{31}\text{P}$  ЯМР надає чимало цінних даних щодо селективності пребіотичних реакцій фосфорилування за участю важливих органічних молекул.

### 3.3.1. Фосфорилування у системі гліцерол - глюкоза

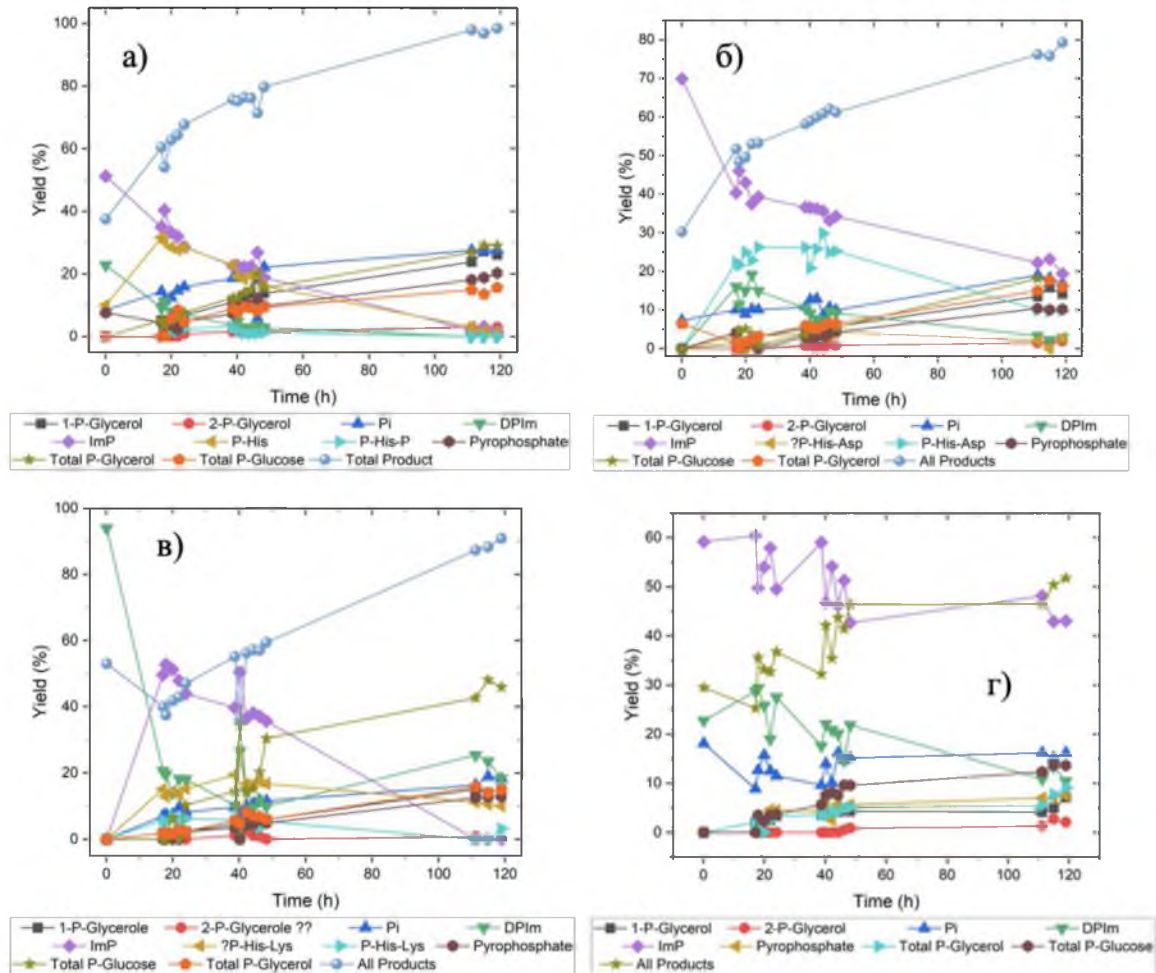
На рис.3.7 наведено загальну схему реакції взаємодії імідазолфосфату з гліцеролом та глюкозою за участі гістидил-пептидного каталізатору.



**Рис.3.7.** Схема реакції взаємодії імідазолфосфату з гліцеролом та глюкозою за участі гістидил-пептидного каталізатору

Досліджено кінетику реакції фосфорилування. На рис.3.8 (а – г) наведено результати визначення продуктів фосфорилування під час перебігу реакцій пребіотичного фосфорилування для систем, що складаються з 0,13 ммоль  $\text{CaImP}$ , 3,25 ммоль гліцеролу, 3,25 ммоль глюкози та 0,13 ммоль каталізатору. За віссю X - час реакції, за віссю Y – виходи фосфорильованих продуктів. Усі реакції

відбувались за  $\text{pH} = 7,5$  і  $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$ . В усіх чотирьох досліджених системах реакції пребіотичного фосфорилування утворювалося кілька ключових продуктів, а саме Р-1-гліцерол (1-P-Glycerol), Р-2-гліцерол (2-P-Glycerol) та фосфорильована глюкоза.



**Рис.3.8** Кінетика утворення продуктів фосфорилування (%) в пастоподібних умовах за  $22\text{ }^\circ\text{C}$  для реакції  $0,13\text{ ммоль CaImP} + 3,25\text{ ммоль гліцеролу} + 3,25\text{ ммоль глюкози} + 0,13\text{ ммоль каталізатору}$ : а) гістидин; б) гістидин-аспарат; в) гістидин-лізин; г) некаталізована реакція

Фосфорильовані сполуки глюкози, отримані в результаті цих реакцій, в сукупності називаються загальною фосфорильованою глюкозою (Total P-Glucose). Крім того, в усіх системах утворювалися продукти гідролізу імідазолфосфату, а саме ортофосфат (Pi) та пірофосфат (Pyrophosphate).

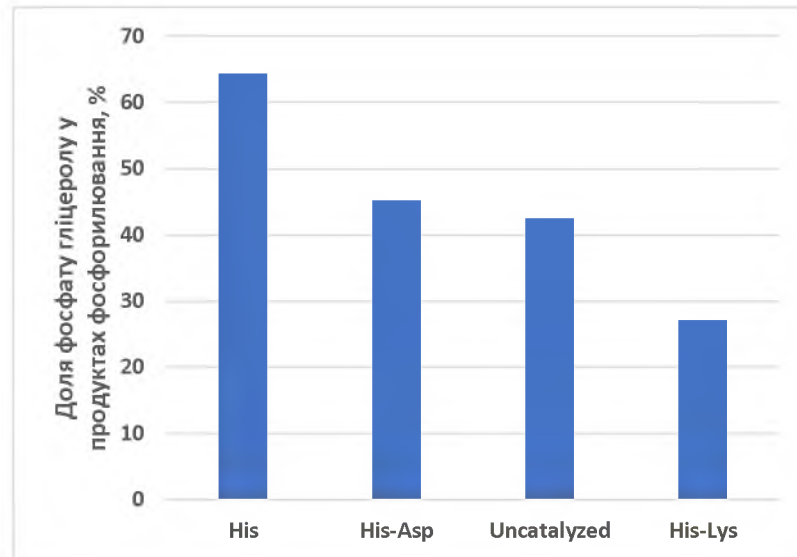
У ході реакції присутній дифосфоімідазол спочатку поступово перетворювався на імідазолфосфат, який до кінця перебігу реакції (приблизно 120 годин) майже повністю гідролізувався. Це перетворення свідчить, що дифосфоімідазол служить проміжною ланкою в процесі фосфорилування, що зрештою приводить до утворення імідазолфосфату.

Варто зазначити, що у системах (а – в) відбувалося фосфорилування гістидилпептидного каталізатора (а – P-His, б – P-His-Asp, в – P-His-Lys). Для полегшення порівняння та інтерпретації результатів графіки, представлені у дослідженні, також включають загальний вихід усіх продуктів фосфорилування, за винятком виходу, який відповідає фосфорильованим каталізаторам.

Включення виходу всіх продуктів фосфорилування у графіки дає всебічний огляд продуктивності реакцій фосфорилування за участю гліцеролу та глюкози як двох конкуруючих нуклеофілів у присутності різних досліджених каталізаторів. Розглядаючи як конкретні продукти фосфорилування, так і продукти гідролізу, графіки надають вагому інформацію про селективність та ефективність вивчених процесів пребіотичного фосфорилування.

Одержані результати дозволяють оцінити селективність процесу фосфорилування гліцеролу та глюкози за відносним вмістом (%) фосфорильованого гліцеролу у продуктах реакції, та оцінити за цим параметром активність використаних каталізаторів та ефективність фосфорилування за відсутності каталізаторів. За зменшенням виходу фосфорильованого гліцеролу (%) каталізатори розташовано у ряд:

His (64) > His-Asp (45) > Uncatalyzed (42) > His-Lys (27) (рис.3.9).

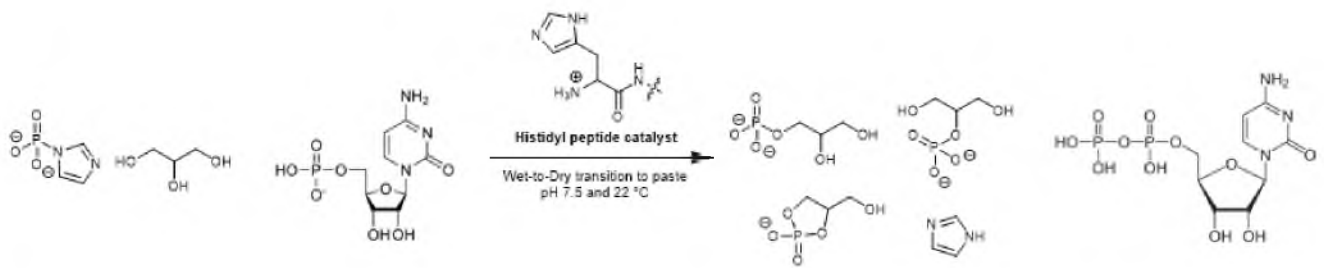


**Рис.3.9.** Вміст фосфату гліцеролу (%) у продуктах взаємодії імідазолфосфату із гліцеролом та глюкозою на 70-ту годину перебігу реакції за пребіотичних умов

Встановлено, що в дослідженій системі двох нуклеофілів найбільша селективність виходу фосфату гліцеролу – 64 % досягається за присутності Гістидина (His) як каталізатора. Присутність His-Lys інгібує реакцію фосфорилування гліцеролу (27 %), оскільки без каталізатора при конкурентному фосфорилуванні утворюється більша кількість фосфату гліцеролу (42 %). Активність His-Asp низька (45 %), не набагато більша, якщо реакція перебігає за відсутності каталізатора.

### 3.3.2. Фосфорилування у системі гліцерол - цитидинмонофосфат

При дослідженні чотирьох систем, що містили 0,13 ммоль CaImP, 3,25 ммоль гліцеролу, 0,544 ммоль цитидинмонофосфату і 0,13 ммоль каталізатору, було одержано ряд важливих продуктів, утворених внаслідок реакцій пребіотичного фосфорилування (рис.3.10).



**Рис.3.10.** Схема реакції взаємодії імідазолфосфату з гліцеролом та цитидинмонофосфатом за участі гістидил-пептидного каталізатору

На основі розрахунків, одержаних в результаті аналізу та інтегрування ЯМР-спектрів, було побудовано графіки, які демонструють вихід основних продуктів фосфорилування, таких як P-1-гліцерол (1-P-Glycerol), P-2-гліцерол (2-P-Glycerol) та цитидиндифосфат (CDP).

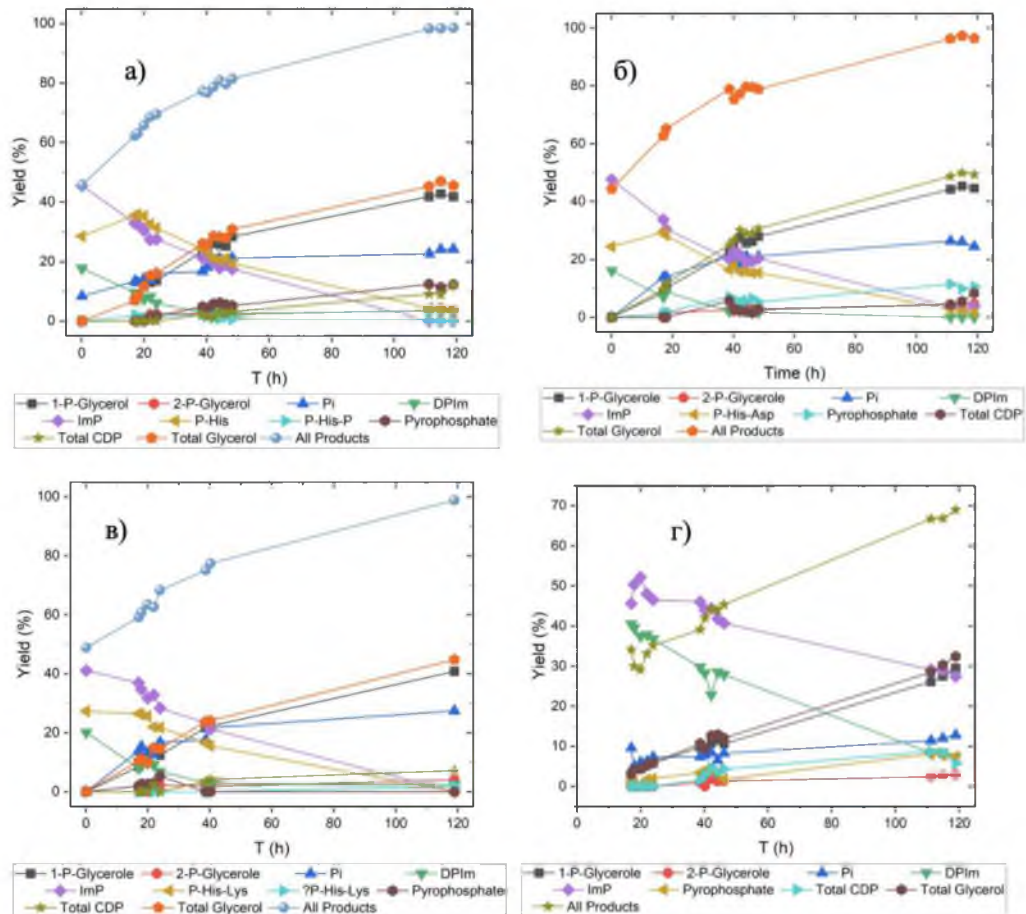
Крім того, продукти гідролізу імідазолфосфату, а саме ортофосфат та пірофосфат, також наявні у системі.

У системах на рис.3.11 (а – в) відбувалось фосфорилування гістидилпептидного каталізатора.

Щоб забезпечити порівняльний аналіз та послідовну інтерпретацію, графіки, представлені у дослідженні, охоплюють сукупний вихід усіх продуктів фосфорилування, за винятком виходу фосфорильованих каталізаторів.

Криві загального виходу продуктів фосфорилування для кожної системи дають змогу провести порівняльний аналіз щодо продуктивності реакцій фосфорилування за участю гліцеролу, цитидинмонофосфату (CMP) та різних досліджених каталізаторів.

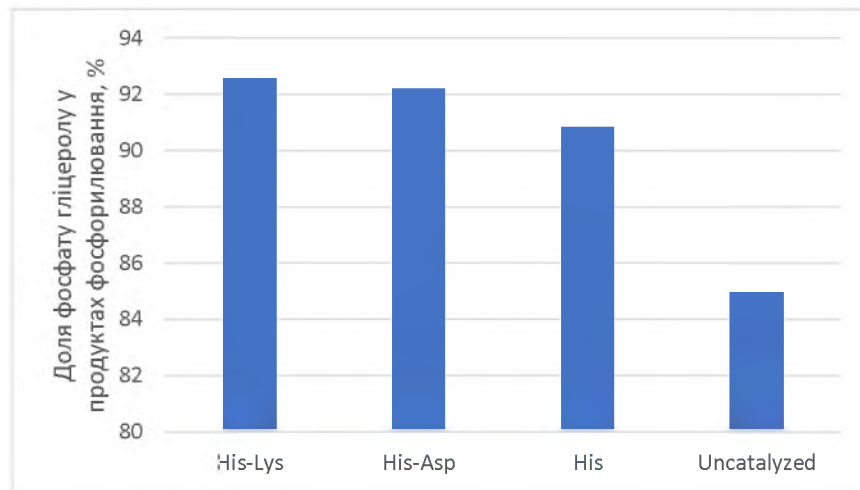
З урахуванням конкретних продуктів фосфорилування та супутніх продуктів гідролізу ці графіки надають дані щодо селективності та ефективності досліджених процесів пребіотичного фосфорилування.



**Рис.3.11.** Зміни виходу продуктів фосфорилювання в часі в пастоподібних умовах за 22 °С для реакції 0,13 ммоль CaImP + 3,25 ммоль гліцеролу + 0,544 ммоль цитидинмонофосфату + 0,13 ммоль каталізатору: а) гістидин; б) гістидин-аспартат; в) гістидин-лізин; г) некаталізована реакція

Одержані результати дозволяють оцінити селективність процесу фосфорилювання гліцеролу та цитидинмонофосфату за відносним вмістом (%) фосфорилюваного гліцеролу у продуктах реакції, та оцінити за цим параметром активність використаних каталізаторів та ефективність фосфорилювання за відсутності каталізаторів. За зменшенням виходу фосфорилюваного гліцеролу (%) каталізатори розташовано у ряд:

His-Lys (93) > His-Asp (92) > His (91) > Uncatalyzed (85) > (рис.3.12).

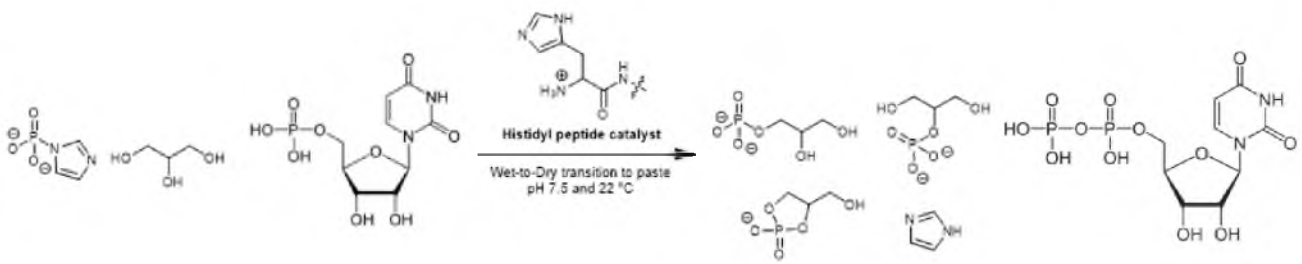


**Рис.3.12.** Вміст фосфату гліцеролу (%) у продуктах взаємодії імідазолфосфату із гліцеролом та цитидинмонофосфатом на 70-ту годину перебігу реакції за пребіотичних умов

Встановлено, що в дослідженій системі двох нуклеофілів найбільша селективність виходу фосфату гліцеролу – 93 % досягається за присутності His-Lys як каталізатора. Активність His-Asp (92 %) та His (91 %) настільки ж висока, як у His-Lys і знаходиться у межах похибки визначення кількості фосфоровмісних речовин за даними ЯМР спектроскопії. За відсутності каталізатора вихід фосфату гліцеролу складає 85 %. Можна зробити висновок, що реакція фосфорилування цитидинмонофосфату із гліцеролом інгібується як за присутності каталізаторів, так і без них.

### 3.3.3. Фосфорилування у системі гліцерол - уридинмонофосфат

Дослідження також охопило систему, що включає 0,13 ммоль CaImP, 3,25 ммоль гліцеролу, 0,544 ммоль уридинмонофосфату та 0,13 ммоль каталізатору. В цій системі одночасного фосфорилування гліцеролу та уридинмонофосфату відбувається утворення фосфорильованого гліцеролу та дифосфату уридину (UDP), як характерних продуктів реакції (рис.3.13).

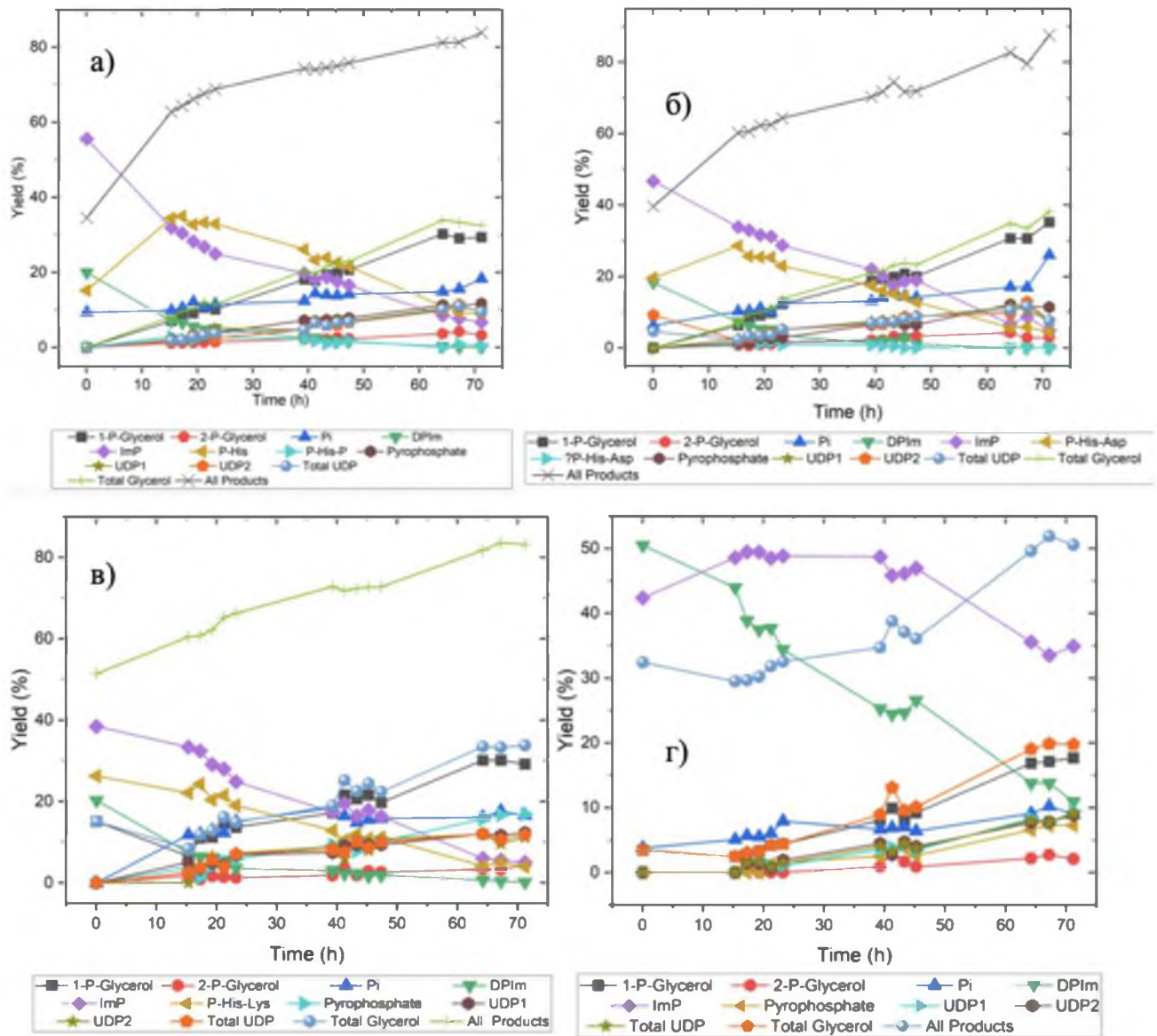


**Рис.3.13.** Схема реакції взаємодії імідазолфосфату з гліцеролом та уридинмонофосфатом за участі гістидил-пептидного каталізатору

Крім того, гідроліз дифосфоімідазолу та імідазолфосфату приводить до утворення ортофосфату та пірофосфату.

Аналіз і ідентифікація продуктів реакції (рис.3.14) у системах (а – в) свідчить про те, що відбувалося фосфорилування гістидинових каталізаторів. Ця специфічна система, що включає імідазолфосфат, гліцерол та УМФ, дає унікальне уявлення про реакції фосфорилування для системи, яка містить трьохамтомний спирт та нуклеотид у ролі конкуруючих за фосфатну групу нуклеофілів. Поява фосфорильованого у двох позиціях гліцеролу та уридиндифосфату підкреслює наявність селективності та загальну ефективність реакції у цих умовах. Присутність ортофосфату та пірофосфату вказує на гідроліз дифосфоімідазолу та імідазолфосфату, що дає додаткову інформацію про трансформацію та частку фосфатних сполук у системі.

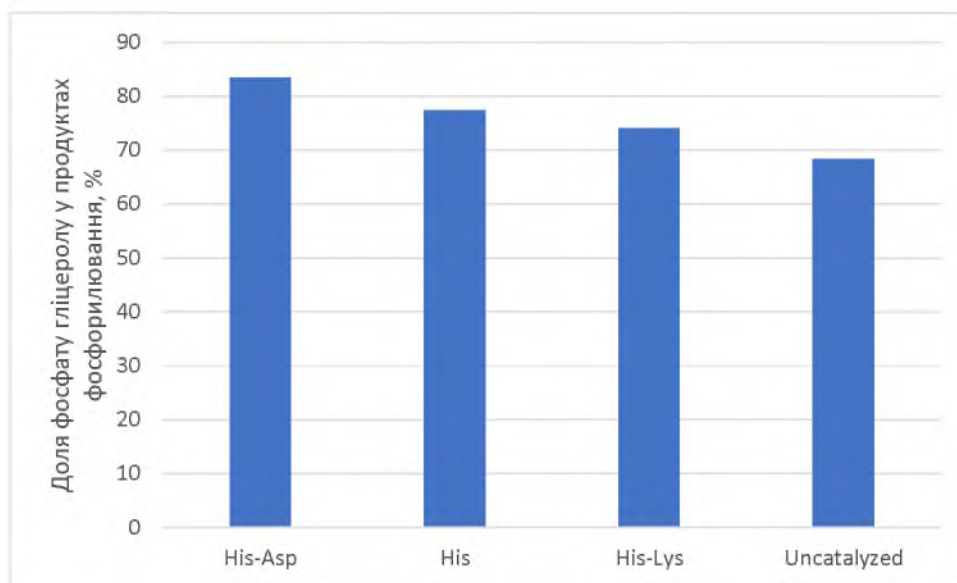
Крім того, участь гістидинових каталізаторів у системах (а – в) підтверджує їхню важливу роль у полегшенні процесу фосфорилування. Аналіз та порівняння графіків, пов'язаних з цією системою, забезпечує краще розуміння реакцій вибіркового фосфорилування за участю імідазолфосфату, гліцеролу та нуклеотиду УМФ.



**Рис.3.14.** Зміни виходу продуктів фосфорилування в часі в пастоподібних умовах за 22 °С для реакції 0,13 ммоль CaImP + 3,25 ммоль гліцеролу + 0,544 ммоль уридинмонофосфату + 0,13 ммоль каталізатору: а) гістидин; б) гістидин-аспартат; в) гістидин-лізін; г) некаталізована реакція

Одержані результати дозволяють оцінити селективність процесу фосфорилування гліцеролу та уридинмонофосфату за відносним вмістом (%) фосфорильованого гліцеролу у продуктах реакції, та оцінити за цим параметром активність використаних каталізаторів та ефективність фосфорилування за відсутності каталізаторів. За зменшенням виходу фосфорильованого гліцеролу (%) каталізатори розташовано у ряд:

His-Asp (83) > His (77) > His-Lys (74) > Uncatalyzed (68) (рис.3.15).

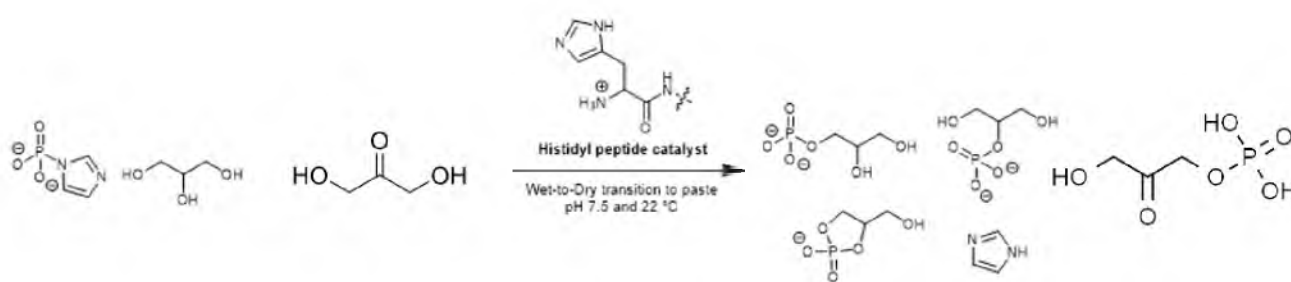


**Рис.3.15.** Вміст фосфату гліцеролу (%) у продуктах взаємодії імідазолфосфату із гліцеролом та уридинмонофосфатом на 70-ту годину перебігу реакції за пребіотичних умов

Встановлено, що в дослідженій системі двох нуклеофілів найбільша селективність виходу фосфату гліцеролу – 83 % досягається за присутності His-Asp як каталізатора. Вихід фосфату гліцеролу у некаталізованій реакції суттєво менший і складає 68 %.

### 3.3.4. Фосфорилування у системі гліцерол - дигідроксиацетон

Для дослідження селективності реакцій фосфорилування у присутності моносахариду, а саме у співвідношенні концентрацій 1:1 з фосфорилуючим агентом, досліджували систему, що включає 0,13 ммоль CaImP, 3,25 ммоль гліцеролу, 0,13 ммоль дигідроксиацетону, 0,13 ммоль каталізатору (рис.3.16).

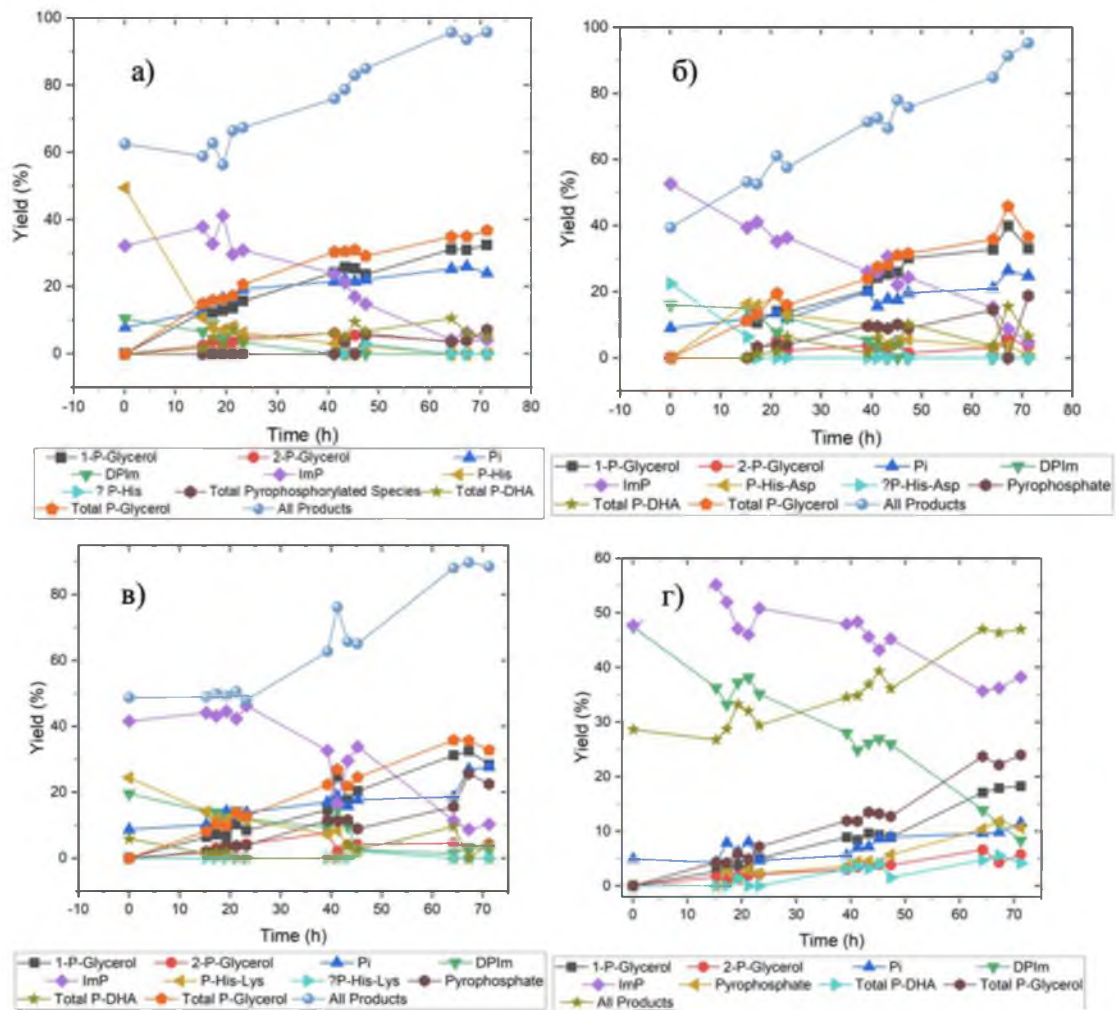


**Рис.3.16.** Схема реакції взаємодії імідазолфосфату з гліцеролом та дигідроксиацетоном за участі гістидил-пептидного каталізатору

Графіки виходу фосфорильованих продуктів у часі для досліджуваних систем демонструють утворення основних продуктів фосфорильовання, а саме Р-гліцеролу та Р-дигідроксиацетону. Фосфорильовані сполуки дигідроксиацетону, отримані в результаті цих реакцій, в сукупності називаються загальним фосфорильованим дигідроксиацетоном (Total P-DHA) Ці продукти є прямим результатом процесу фосфорильовання та свідчать про успішне перенесення фосфатних груп від фосфорильовуючого агента до нуклеофілів.

Крім того, наявність ортофосфатних та пірофосфатних сполук служить підтвердженням гідролізу фосфорильовуючого агента. Процес гідролізу приводить до розпаду імідазолфосфату на імідазол та ортофосфатну групу з подальшим утворенням пірофосфату як побічного продукту.

Важливим аспектом досліджуваних систем є фосфорильовання гістидильних каталізаторів (рис.3.17 а – в). Ці каталізатори піддаються фосфорильованню, що приводить до утворення стабільних комплексів. Хоча кількісні виходи фосфорильованих каталізаторів пнаведено на графіках, важливо відзначити, що вони не включені до розрахунку загального виходу продуктів фосфорильовання. Ця відмінність дозволяє чітко оцінити продукти, що безпосередньо виникають у процесі селективного переносу фосфатних груп, без впливу утворених фосфорильованих гістидинових комплексів.



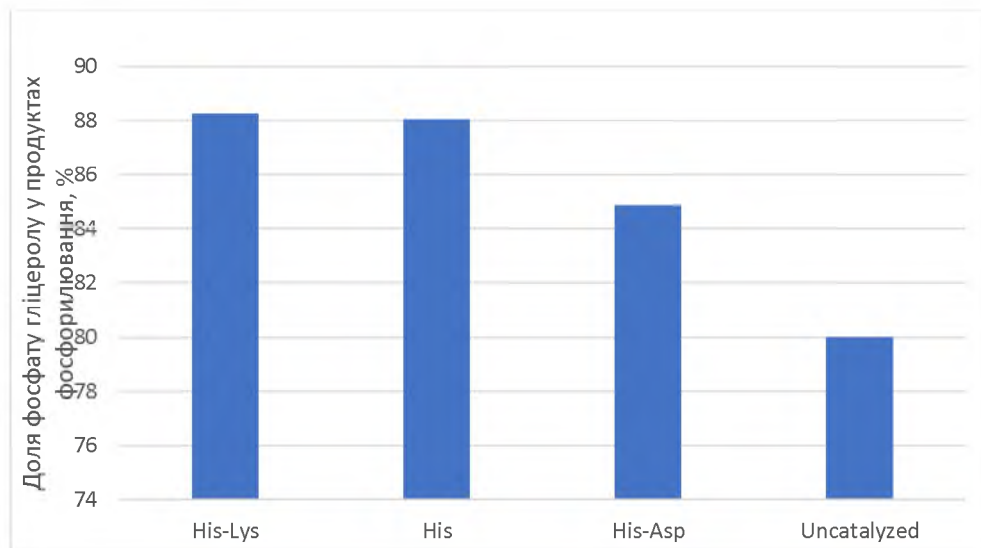
**Рис.3.17.** Зміни виходу продуктів фосфорилювання в часі в пастоподібних умовах за 22 °С для реакції 0,13 ммоль CaImP + 3,25 ммоль гліцеролу + 0,13 ммоль дигідроксиацетону + 0,13 ммоль каталізатору: а) гістидин; б) гістидин-аспарат; в) гістидин-лізин; г) некаталізована реакція

Аналіз даних систем забезпечує всебічне розуміння селективності та ефективності реакцій фосфорилювання за участю дигідроксиацетону та гліцеролу. Кількісне визначення специфічних продуктів фосфорилювання поряд із виявленням побічних продуктів гідролізу дозволяє провести поглиблену оцінку селективності реакції та долі фосфатних груп у системі. Крім того, розгляд фосфорилювання гістидильних каталізаторів проливає світло на їхню участь у механізмі реакції та їхній вплив на загальні результати процесів.

Одержані результати дозволяють оцінити селективність процесу фосфорилювання гліцеролу та дигідроксиацетону за відносним вмістом (%)

фосфорильованого гліцеролу у продуктах реакції, та оцінити за цим параметром активність використаних каталізаторів та ефективність фосфорилування за відсутності каталізаторів. За зменшенням виходу фосфорильованого гліцеролу (%) каталізатори розташовано у ряд:

His-Lys (88) = His (88) > His-Asp (84) > Uncatalyzed (80) (рис.3.18).

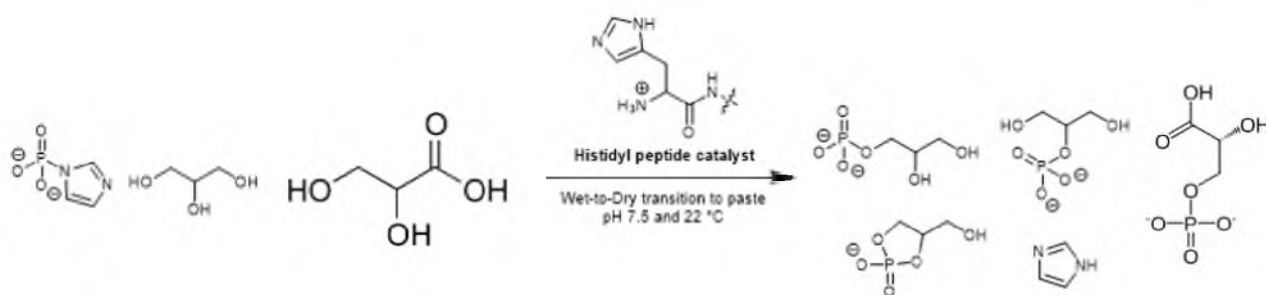


**Рис.3.18.** Вміст фосфату гліцеролу (%) у продуктах взаємодії імідазолфосфату із гліцеролом та дигідроксиацетоном на 70-ту годину перебігу реакції за пребіотичних умов

Встановлено, що в дослідженій системі двох нуклеофілів найбільша селективність виходу фосфату гліцеролу (%) досягається за присутності як His-Lys (88), так і His (88). Активність His-Asp на 3 % менша. За відсутності каталізатора вихід фосфату гліцеролу становить 80 %, що свідчить про низьку здатність дигідроксиацетону бути фосфорильованим за присутності гліцеролу.

### 3.3.5. Фосфорилування у системі гліцерол - гліцерат

Для дослідження селективності у присутності алкогольного нуклеофіла використовували систему, що містить 0,13 ммоль CaImP, 25 ммоль гліцеролу, 3,25 ммоль гліцерату та 0,13 ммоль каталізатору (рис.3.19).

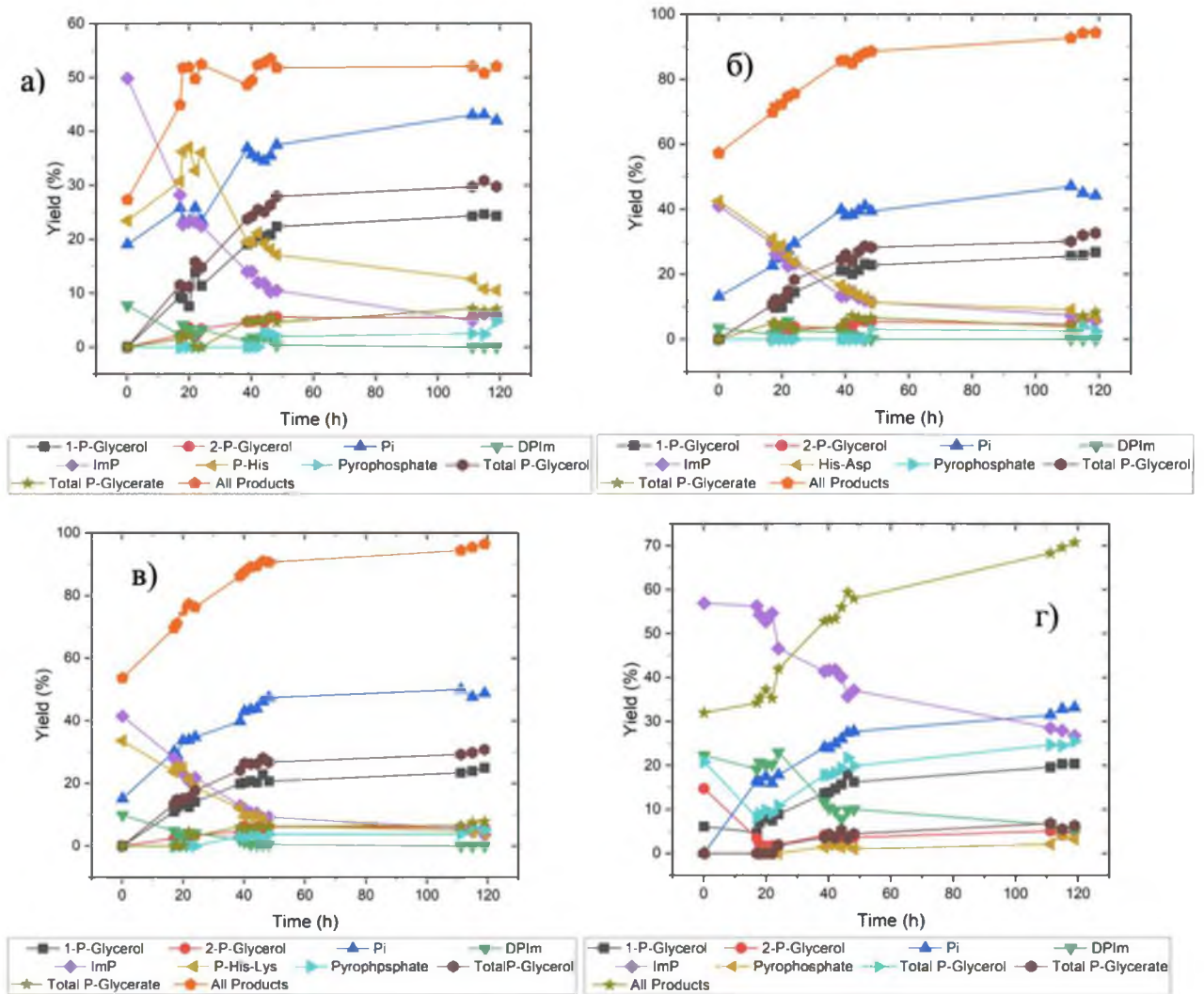


**Рис.3.19.** Схема реакції взаємодії імідазолфосфату з гліцеролом та гліцератом за участі гістидил-пептидного каталізатору

Результати всіх досліджуваних систем (рис.3.20) продемонстрували утворення фосфорильованого гліцеролу та фосфорильованого гліцерату як ключових продуктів. Фосфорильовані сполуки гліцерату, отримані в результаті цих реакцій, в сукупності називаються загальним фосфорильованим гліцератом (Total P-Glycerate). Крім того, гідроліз імідазолфосфату та дифосфоімідазолу приводить до утворення ортофосфату та пірофосфату як побічних продуктів.

Ще одним важливим спостереженням у досліджених системах було фосфорилування всіх гістидильних каталізаторів. Цей процес фосфорилування привів до утворення стабільних комплексів між каталізаторами та фосфатними сполуками. Важливо, що це каталітичні комплекси не враховувалися при розрахунку загального виходу препарату.

Включення в систему гліцерату в ролі нуклеофіла дозволило провести порівняльний аналіз селективності реакцій фосфорилування за участю різних органічних молекул. Присутність фосфорильованого гліцеролу, як і наявність фосфорильованого гліцерату вказує на здатність імідазолфосфату взаємодіяти з кількома нуклеофілами і здійснювати трансфер фосфатної групи. Наявність у системі ортофосфату та пірофосфату дає уявлення про шляхи гідролізу фосфорилуючого агента.



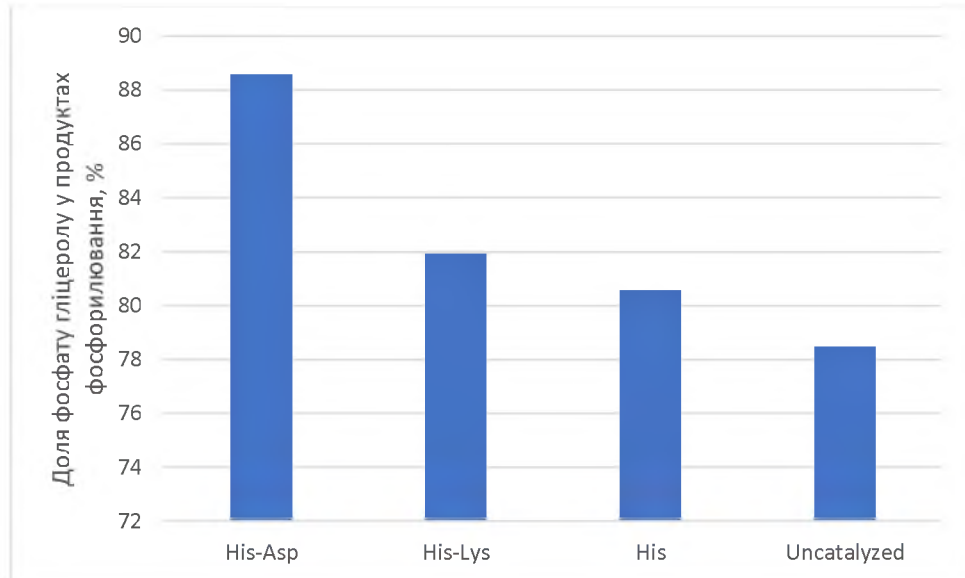
**Рис.3.20.** Зміни виходу продуктів фосфорилювання в часі в пастоподібних умовах за 22 °С для реакції 0,13 ммоль CaImP + 3,25 ммоль гліцеролу + 3,25 ммоль гліцерату + 0,13 ммоль каталізатору: а) гістидин; б) гістидин-аспартат; в) гістидин-лізин; г) некаталізована реакція

Враховуючи фосфорилювання гістидильних каталізаторів, видно, що їхня участь у реакції суттєво впливає на загальну динаміку реакції. Стійкі комплекси фосфорилюваних каталізаторів кількісно не враховуються при розрахунку загального виходу фосфорилюваних продуктів.

Одержані результати дозволяють оцінити селективність процесу фосфорилювання гліцеролу та гліцерату за відносним вмістом (%) фосфорилюваного гліцеролу у продуктах реакції, та оцінити за цим параметром активність використаних каталізаторів та ефективність фосфорилювання за

відсутності каталізаторів. За зменшенням виходу фосфорильованого гліцеролу (%) каталізатори розташовано у ряд:

His-Asp (89) > His-Lys (82) > His (81) > Uncatalyzed (78) (рис.3.21).

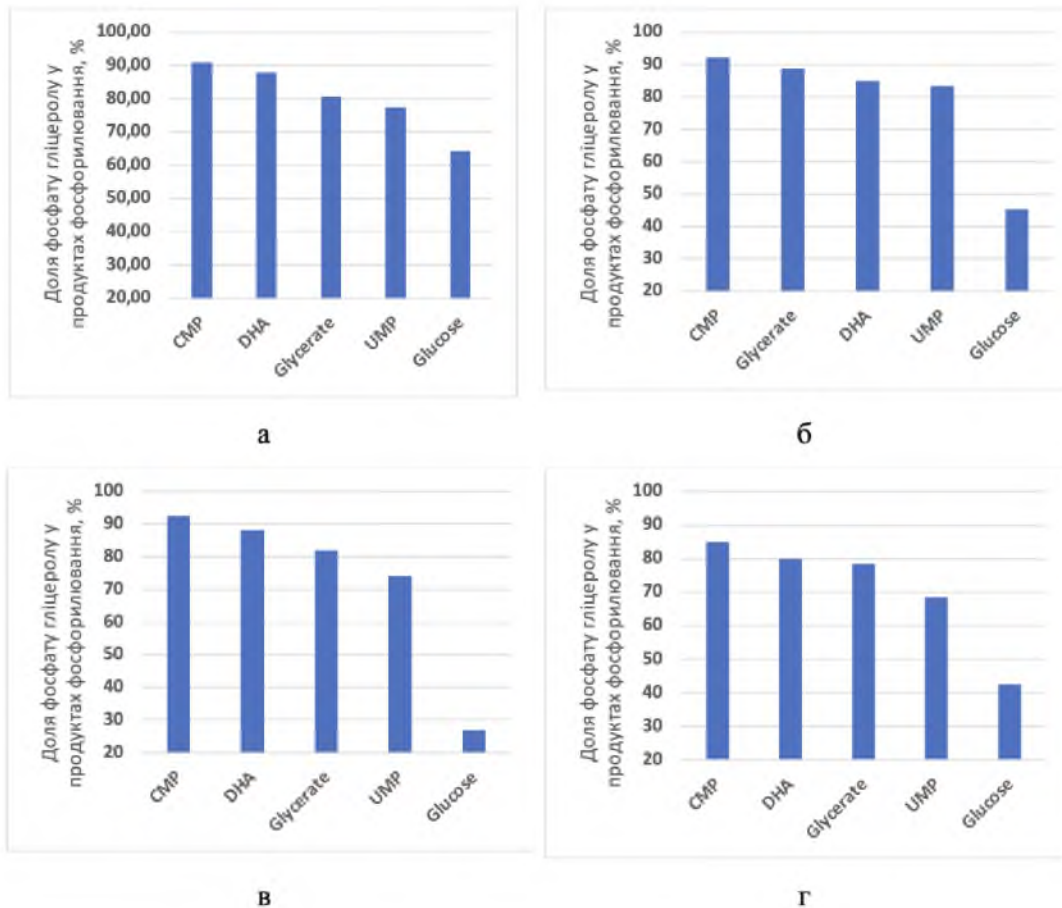


**Рис.3.21.** Вміст фосфату гліцеролу (%) у продуктах взаємодії імідазолфосфату із гліцеролом та гліцератом на 70-ту годину перебігу реакції за пребіотичних умов

Встановлено, що в дослідженій системі двох нуклеофілів найбільша селективність виходу фосфату гліцеролу – 89 % досягається за присутності His-Asp як каталізатора. Активність His-Lys (82) та His (81) схожа і знаходиться у межах похибки методу визначення вмісту фосфоровмісних продуктів у реакційній суміші методом ЯМР спектроскопії. За відсутності каталізатора вихід фосфату гліцеролу становить 78 %, що свідчить про низьку здатність гліцерату бути фосфорильованим за присутності гліцеролу.

#### **3.4. Дослідження впливу каталізаторів на селективність реакцій пребіотичного фосфорильовання**

Одержані результати експериментів проливають світло на каталітичну дію різних гістидилпептидів у реакціях фосфорилування за участі двох нуклеофілів та присутності імідазолфосфату в ролі фосфорилуючого агента (рис.3.22 а – г).

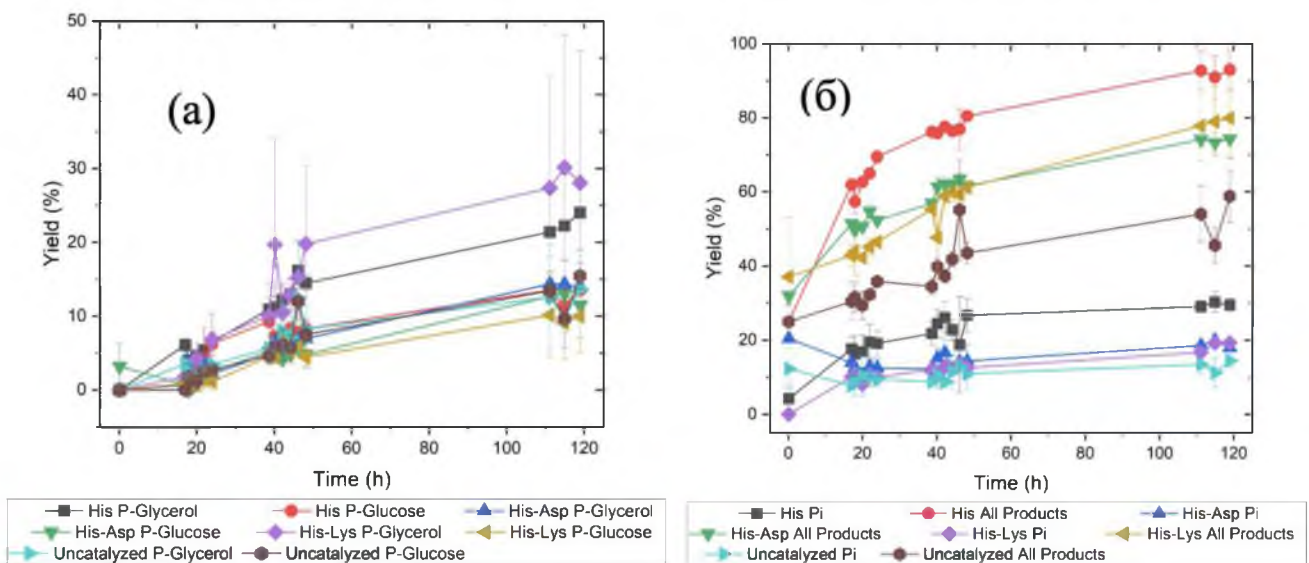


**Рис.3.22.** Активність гістидилових каталізаторів у реакції фосфорилування двох нуклеофілів на 70-ту годину перебігу реакції за пребіотичних умов за присутності каталізаторів (а - His, б – His-Asp, в – His-Lys) та без них (г)

Порівняння виходу всіх продуктів фосфорилування і виходу ортофосфату має важливе значення для оцінки ефективності реакцій фосфорилування та розуміння хімічних процесів, які відбуваються на ранніх стадіях еволюції життя. Саме це дозволяє встановити, наскільки ефективно відбувається гідроліз імідазолфосфату з перенесенням фосфатної групи на нуклеофіл. Якщо вихід ортофосфату значно перевищує вихід продуктів фосфорилування, це може свідчити про низьку ефективність реакцій та незначну участь нуклеофілів у процесі

атаки імідазолфосфату і подальшому фосфорилуванні. З іншого боку, якщо вихід ортофосфату виявляється порівняним або нижчим за вихід продуктів фосфорилування, це свідчить про успішне здійснення реакцій та ефективне використання імідазолфосфату для фосфорилування важливих органічних молекул у пасті.

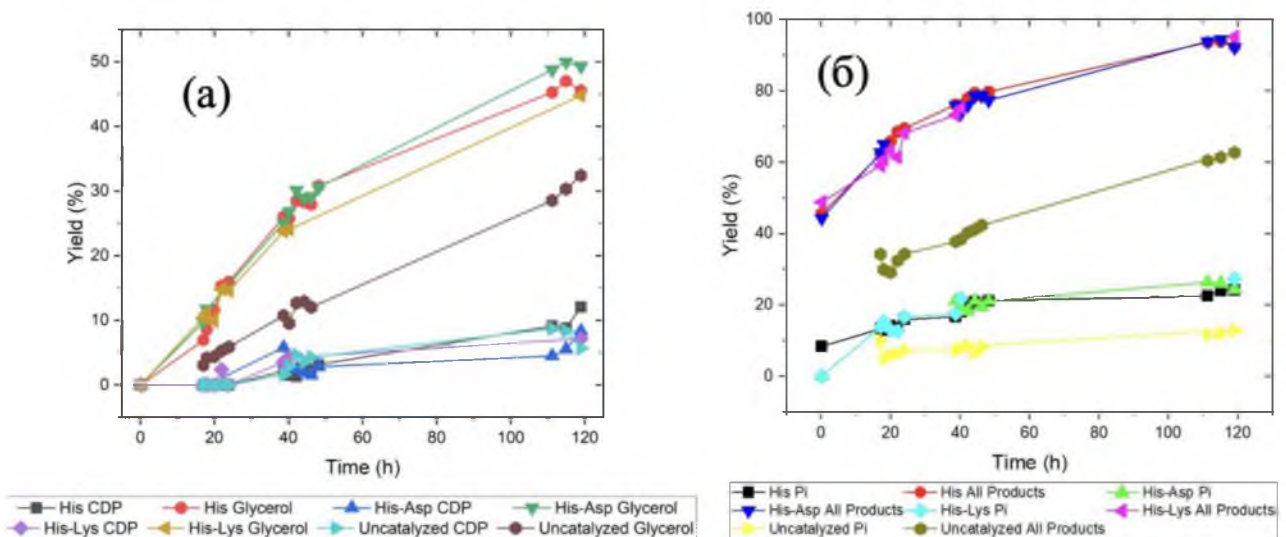
Так, для системи, яка містила гліцерол та глюкозу у ролі нуклеофілів, було виявлено, що гістидин та гістидин-лізин каталізують фосфорилування гліцеролу, що приводить до утворення більшого виходу фосфорильованого гліцеролу (рис.3.23). Однак гістидин-аспартат не виявляв жодної каталітичної дії на утворення Р-гліцеролу. Це явище дозволяє припустити, що присутність певних амінокислот у гістидилпептидних каталізаторах відіграє вирішальну роль у визначенні їхньої каталітичної активності в процесах фосфорилування гліцеролу у присутності глюкози. При цьому жоден із протестованих гістидилових пептидів не каталізує фосфорилування глюкози. Це спостереження вказує на необхідність проведення подальших експериментів для вивчення факторів, що впливають на фосфорилування глюкози, та виявлення потенційних каталізаторів, які можуть сприяти цій реакції.



**Рис.3.23.** Порівняння кількісного виходу: (а) – фосфорильованих Р-гліцеролу та Р-глюкози, (б) – ортофосфату та усіх фосфорильованих продуктів у присутності різних гістидил-пептидних каталізаторів

Варто відзначити, що у присутності глюкози як нуклеофіла, стала очевидною залежність селективності від присутності різних гістидилпептидних каталізаторів. У той час як His та His-Lys сприяли перенесенню фосфату з молекули імідазолфосфату на гліцерол, His-Asp не виявляв цього каталітичного ефекту. Ця селективність додатково підкреслює важливість впливу специфічного амінокислотного складу гістидилпептидних каталізаторів на їхню реакційну здатність у реакціях селективного фосфорилування.

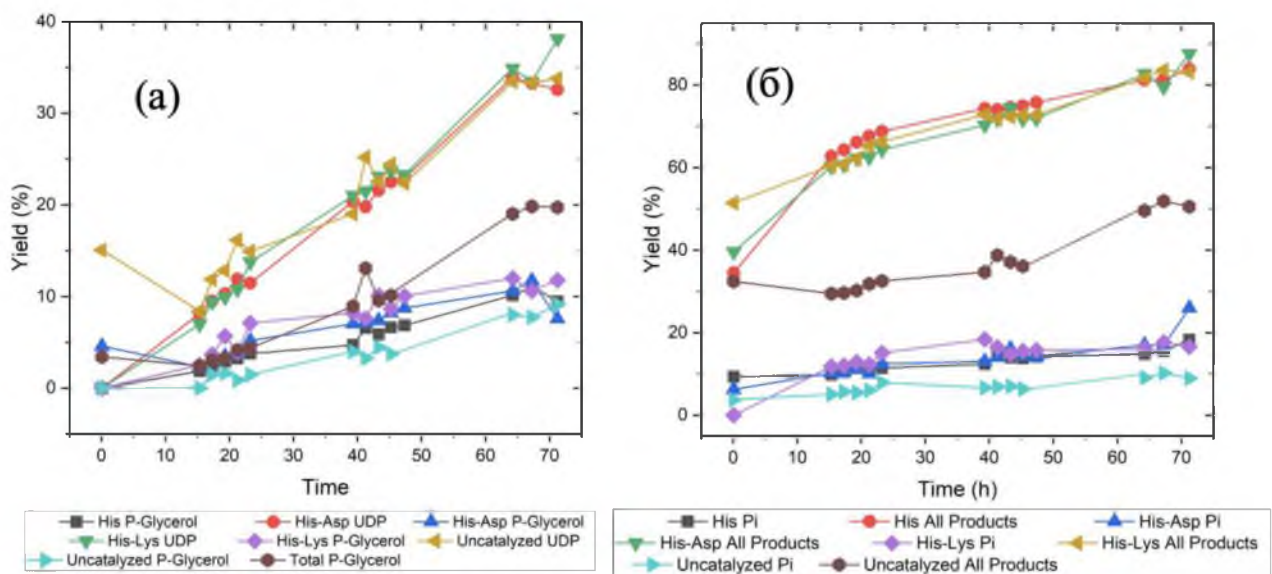
Щодо перенесення фосфатних груп від імідазолфосфату (ImP) до різних нуклеотидів за присутності у системі гліцеролу як конкуруючого нуклофілу, було виявлено, що каталітичне перенесення фосфатної групи з молекули ImP на цитидинмонофосфат (CMP) відсутнє (рис.3.24). Навпаки, трансфер фосфату з молекули фосфорилуючого агента на гліцерол каталізувався всіма випробуваними гістидилпептидами, включаючи His, His-Lys та His-Asp. Ця зміна каталітичної активності наголошує на селективності різних гістидилпептидних каталізаторів у полегшенні реакцій перенесення фосфатної групи у присутності цукрів та нуклеотидів.



**Рис.3.24.** Порівняння кількісного виходу: (а) – фосфорильованих Р-гліцеролу та цитидиндифосфату, (б) – ортофосфату та усіх фосфорильованих продуктів у присутності різних гістидил-пептидних каталізаторів

Крім того, у реакціях за участю цитидинмонофосфату та уридинмонофосфату у присутності каталізаторів спостерігається загальна тенденція до селективності. Зокрема, гліцерол селективно фосфорилувався в обох випадках, тоді як монофосфати – ні. Ця селективність підкреслює перевагу гліцеролу в ролі атакуючого нуклеофіла у цих реакціях фосфорилування.

Для систем з монофосфатом уридину (UMP) аналіз отриманих результатів також демонструє вибірковість фосфорилування (рис.3.25). Зокрема, у цій системі фосфорилується гліцерол, тоді як уридинмонофосфат не зазнає значного фосфорилування у присутності гістидил-пептидів. Ця селективність підкреслює перевагу нуклеофільної атаки гліцеролом фосфорилуючого агента, що приводить до утворення Р-гліцеролу.

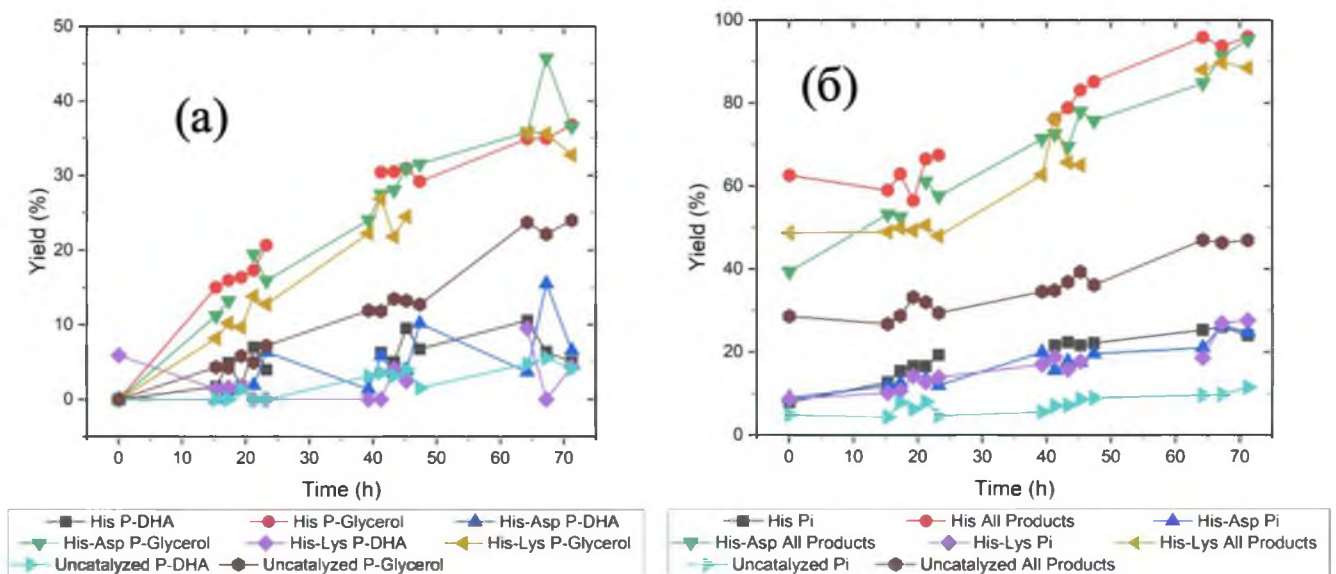


**Рис.3.25** Порівняння кількісного виходу: (а) – фосфорильованих Р-гліцеролу та уридиндифосфату, (б) – ортофосфату та усіх фосфорильованих продуктів у присутності різних гістидил-пептидних каталізаторів

Цікаво, що при використанні нуклеофілів гліцеролу і дигідроксиацетону (DHA), селективність по відношенню до відносно DHA не спостерігається (рис.3.26). Ця подібність до реакцій з нуклеотидами (CMP та UMP) передбачає інший характер реакційної здатності цукрів, таких як глюкоза (або рибоза).

Фосфорилування дигідроксиацетону (DHA) у присутності гістидильних каталізаторів відрізняється від фосфорилування гліцеролу. Результати показують, що гістидильні каталізатори не виявляють каталітичну активність у фосфорилуванні дигідроксиацетону.

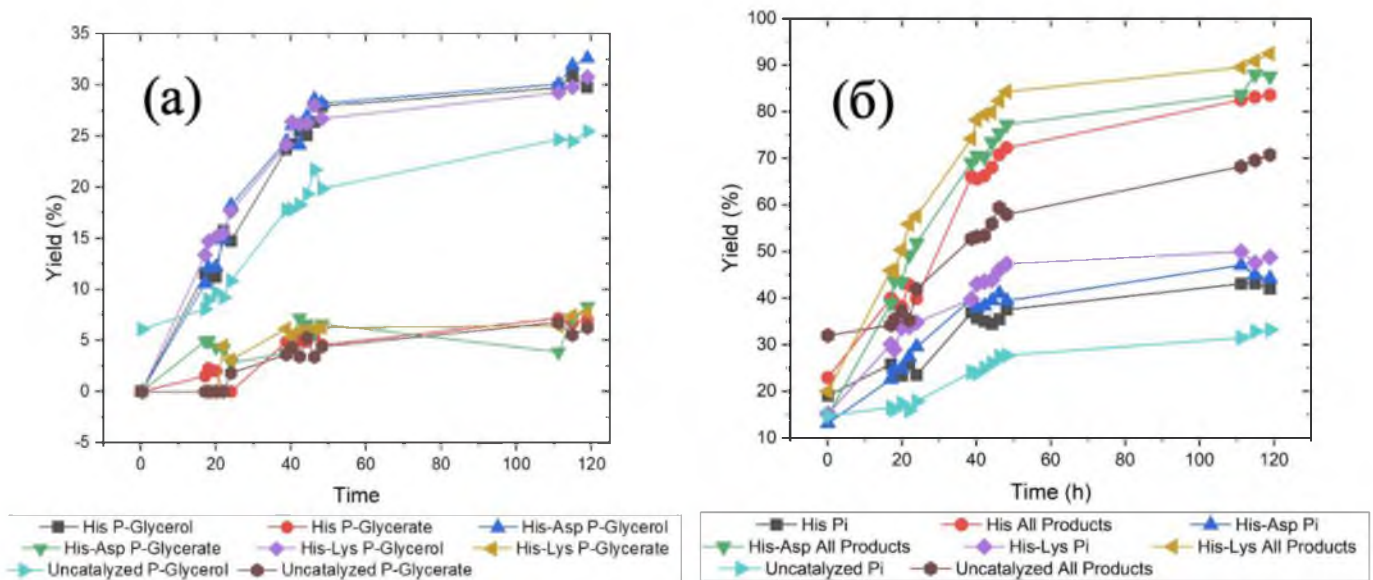
Ця відсутність каталітичного ефекту на фосфорилування DHA заслуговує на увагу: у той час як гліцерол селективно фосфорилується у кожній системі, незалежно від використовуваного гістидильного каталізатора, вибіркового трансферу фосфатних груп до дигідроксиацетону не спостерігається. Це говорить про те, що структурні відмінності, а також відмінності в електронній будові між гліцеролом та дигідроксиацетоном відіграють вирішальну роль у відповідних реакціях фосфорилування. Для подальшого вивчення фосфорилування DHA важливо розглянути механізми, що є основою цього процесу. Такі дослідження можуть дати уявлення про фактори, що впливають на здатність дигідроксиацетону приєднувати фосфатну групу за присутності гістидильних каталізаторів.



**Рис.3.26.** Порівняння кількісного виходу: (а) – фосфорильованих P-гліцеролу та P-дигідроксиацетону, (б) – ортофосфату та усіх фосфорильованих продуктів у присутності різних гістидил-пептидних каталізаторів

Хоча каталітичне фосфорилування дигідроксиацетону у присутності гістидильних каталізаторів не спостерігається, це не виключає можливості альтернативних каталізаторів чи умов реакції, які можуть сприяти фосфорилуванню моносахаридів у аналогічних системах. Необхідні подальші дослідження для вивчення альтернативних каталізаторів або модифікованих умов реакції, які можуть потенційно сприяти фосфорилуванню дигідроксиацетону. Таким чином, процес фосфорилування ДНА не каталізується гістидильними каталізаторами, що відрізняє його від фосфорилування іншого нуклеофіла – гліцеролу.

Фосфорилування гліцерату та утворення гліцератфосфату демонструє, що немає істотної різниці у виході Р-гліцерату між реакціями, що каталізуються і некаталізованим процесом (рис.3.27).



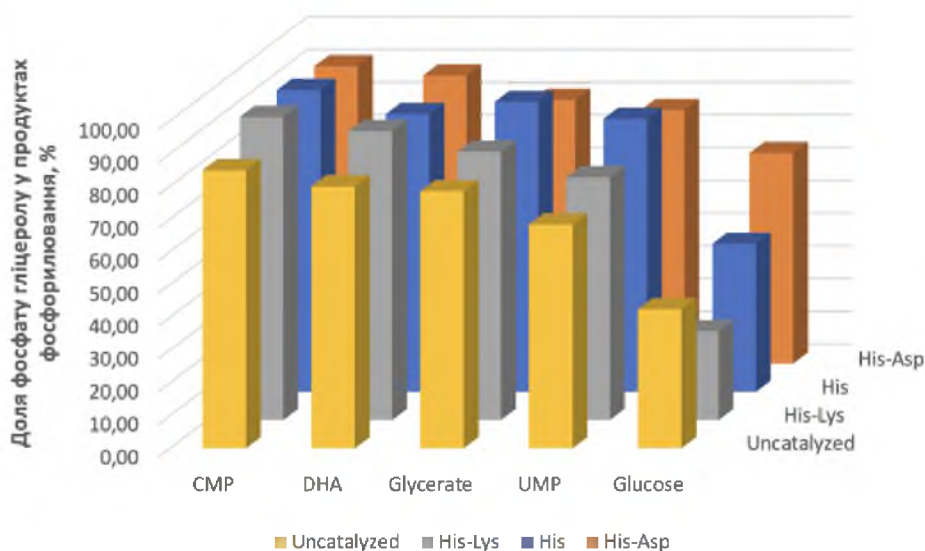
**Рис.3.27.** Порівняння кількісного виходу: (а) – фосфорильованих Р-гліцеролу та Р-гліцерату, (б) – ортофосфату та усіх фосфорильованих продуктів у присутності різних гістидил-пептидних каталізаторів

Одним з можливих пояснень відсутності каталізу при фосфорилуванні гліцерату може бути відсутність специфічності гістидилових каталізаторів по відношенню до деяких алкоголятів. Ферменти, що беруть участь у реакціях

фосфорилування, часто мають специфічні активні центри і структурні особливості, що дозволяють їм зв'язуватися з субстратом і полегшувати перенесення фосфатної групи. У випадку гліцерату, можливо, що гістидинові каталізатори недостатньо ефективні для прискорення переносу фосфатної групи.

Ще одним фактором, який слід враховувати, є структурні характеристики гліцерату. Наявність функціональних груп та загальна будова молекули гліцерату можуть впливати на його реакційну здатність та сприйнятливність до процесу фосфорилування. Вочевидь, електронна будова гліцерату не сприяє його ролі нуклеофіла-субстрата для фосфорилування в даних умовах.

Загалом, умови реакції та експериментальна установка також можуть відігравати роль у відсутності каталізу. Такі фактори, як рН, температура та наявність кофакторів або косубстратів, можуть суттєво впливати на ефективність та селективність реакцій фосфорилування. Важливо оптимізувати ці параметри задля підвищення каталітичної активності і збільшення виходу фосфорильованого гліцерату. На рис.3.28 зображено тривимірну діаграму, яка демонструє селективність утворення фосфату гліцеролу за присутності другого нуклеофіла та каталізаторів у системі, а також за умови некаталізованого процесу.



**Рис.3.28.** Селективність утворення фосфату гліцеролу у присутності другого нуклеофіла та гістидилового каталізатора і без нього

Аналіз одержаних результатів дозволяє зробити ряд висновків. Найбільша селективність фосфорилування гліцеролу досягалася за присутності другого нуклеофіла СМР та каталізатора His-Lys – 93 %. Найменша – за присутності того ж каталізатора і глюкози у ролі другого нуклеофіла – 27 %. У цьому випадку каталізатор інгібує фосфорилування глюкози, оскільки за відсутності каталізатора кількість продуктів фосфорилування гліцеролу збільшується до 42 %. За виключенням описаного випадка, усі каталізатори збільшують селективність фосфорилування гліцеролу. Найменш здатний до фосфорилування у присутності гліцеролу виявся СМР, тоді як селективність фосфорилування глюкози в усіх досліджених випадках більша, а за присутності His-Lys продукти фосфорилування глюкози превалюють.

Подальші дослідження селективного фосфорилування важливих органічних молекул, як експериментальні, так і теоретичні, необхідні для глибшого розуміння основних механізмів і потенційних обмежень цих процесів. Вивчаючи умови реакції, хімічні властивості потенційних нуклеофілів та досліджуючи участь конкретних ферментів або каталізаторів, можна з'ясувати причини відсутності каталізу у трансфері фосфатних груп для систем, які містять гліцерол у ролі конкурентного нуклеофіла.

## ВИСНОВКИ

1. За допомогою адаптованої методики Розенберга одержано дифосфоїмідазол кальцію, в результаті гідролізу якого, за адаптованою методикою Купермана, синтезовано імідазолфосфат кальцію – основний агент фосфорилування досліджуваних систем двох нуклеофілів.
2. Методом  $^{31}\text{P}$  ЯМР спектроскопії підтверджено автентичність синтезованої сполуки: пік у вигляді синглета при хімічному зсуві  $-4,41$  м.ч. вказує на присутність двох атомів фосфору з ідентичним оточенням у структурі дифосфоїмідазолу кальцію; синглет при хімічному зсуві  $-4,51$  м.ч. відповідає фосфору у структурі молекули імідазолфосфату кальцію.
3. Оптимізовано методику якісної ідентифікації та кількісного визначення продуктів фосфорилування у реакційній суміші за даними аналізу ЯМР-спектрів.
4. Методом  $^{31}\text{P}$  ЯМР спектроскопії досліджено кінетику фосфорилування гліцерину у подвійних системах із моносахаридом, нуклеотидами, алкоголями (глюкоза, цитидинмонофосфат, уридинмонофосфат, гліцерат, дигідроксиацетон) за присутності гістидил-пептидних каталізаторів (His, His-Asp, His-Lys) за пребіотичних умов.
5. Для всіх систем спостерігався процес фосфорилування обох нуклеофілів, однак у всіх випадках за даних умов гістидили виявляли селективність у процесах трансферу ортофосфатної групи відносно молекули гліцеролу.
6. Встановлено, що для системи гліцерол - глюкоза утворення фосфорильованого гліцеролу залежить від наявності гістидил-пептидних каталізаторів у системі, зокрема гістидину та гістидин-лізину. У свою чергу, гістидин-аспартат не має каталітичної дії на формування фосфорильованого гліцеролу. Передача ортофосфату до гліцеролу відбувається лише за присутності гістидину та гістидин-лізину. Таким чином, існує селективність між різними каталізаторами у присутності глюкози в системі. Натомість, гістидил-пептиди не каталізують фосфорилування глюкози.

7. Показано, що за наявності в системі гліцеролу та цитидинмонофосфату, селективний трансфер ортофосфатної групи до молекули гліцеролу є характерним за присутності у системі будь-якого з протестованих гістидинових каталізаторів.
8. Підтверджено селективність у реакціях пребіотичного фосфорилування для системи з гліцеролом та цитидинмонофосфатом, а також гліцеролом та уридинмонофосфатом за наявності у реакційній суміші гістидину, гістидинлізину та гістидин-аспартату – усі каталізатори виявили селективність щодо трансферу ортофосфатної групи до нуклеофільної молекули гліцеролу.
9. Не було виявлено селективності у реакціях фосфорилування гліцеролу та дигідроксиацетону.
10. Для системи гліцерол - гліцерат селективність фосфатного трансферу не спостерігається за обраних умов проведення процесу.
11. Найбільша селективність фосфорилування гліцеролу досягалася за присутності другого нуклеофіла СМР та каталізатора His-Lys – 93 %. Найменша – за присутності того ж каталізатора і глюкози у ролі другого нуклеофіла – 27 %.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Krishnamurthy R. Life's Biological Chemistry: A Destiny or Destination Starting from Prebiotic Chemistry? / Ramanarayanan Krishnamurthy. // *Chemistry A European Journal*. – 2018. – Vol. 24. – P. 16708–16715.
2. Islam S. Prebiotic Systems Chemistry: Complexity Overcoming Clutter / S. Islam, M. Powner. // *Chem*. – 2017. – Vol. 2. – P. 470–501.
3. Lehman N. Reaction: Systematic Hope for Life's Origins / Niles Lehman. // *Chem*. – 2017. – Vol. 2. – P. 604–605.
4. Cleaves J. Prebiotic Chemistry: What We Know, What We Don't / James Cleaves. // *Evolution: Education and Outreach* volume. – 2012. – Vol. 5. – P. 342–360.
5. Biava H. Prebiotic Earth and the origin of life / Hernan Biava // CHE 301: BIOCHEMISTRY / Hernan Biava. – USA: LibreTexts Chemistry, 2023. – (Brevard College). – (1246120; Vol. 4). – P. 29–32.
6. Bruylants G. Prebiotic chemistry: A fuzzy field / G. Bruylants, K. Jacques, J. Reisse. // *Comptes Rendus Chimie*. – 2011. – Vol. 14. – P. 388–391.
7. *Frontiers in Prebiotic Chemistry and Early Earth Environments* / [U. Müller, J. Elsila, D. Trail *et al.*]. // *Origins of Life and Evolution of Biospheres* volume. – 2022. – Vol. 52. – P. 165–181.
8. Deep magma ocean formation set the oxidation state of Earth's mantle / [K. Armstrong, D. Frost, C. McCammon *et al.*]. // *Science*. – 2019. – Vol. 30. – P. 903–906.
9. Jeancolas C. Thresholds in Origin of Life Scenarios / C. Jeancolas, C. Malaterre, P. Nghe. // *iScience*. – 2020. – Vol. 23. – P. 101–116.
10. Investigating Magma Ocean Solidification on Earth Through Laser-Heated Diamond Anvil Cell Experiments / [F. Nabiei, J. Badro, C. Boukaré *et al.*]. // *Geophys Res Lett*. – 2021. – Vol. 28. – P. 48–61.
11. Fiore M. The Origin and Early Evolution of Life: Prebiotic Chemistry / Michele Fiore. // *Life (Basel)*. – 2019. – Vol. 9. – P. 73–85.

12. Lazcano A. Prebiotic chemistry, artificial life, and complexity theory: What do they tell us about the origin of biological systems? / Antonio Lazcano. // European Conference on Artificial Life. – 1995. – Vol. 929. – P. 103–115.
13. Maheen G. Prebiotic Phosphorylation Reactions on the Early Earth / Gull Maheen. // Challenges in Astrobiology. – 2014. – Vol. 6. – P. 193–212.
14. Fernández-García C. A Chemist's Perspective on the Role of Phosphorus at the Origins of Life / C. Fernández-García, A. Coggins, M. Powner. // Life. Phosphorus and the Origins of Life. – 2017. – Vol. 7. – P. 31–51.
15. Liu Z. How Prebiotic Chemistry and Early Life Chose Phosphate / Z. Liu, J. Rossi, R. Pascal. // Life (Basel). – 2019. – Vol. 9. – P. 26–42.
16. Krishnamurthy R. Regioselective alpha-Phosphorylation of Aldoses in Aqueous Solution / R. Krishnamurthy, S. Guntha, A. Eschenmoser. // Angew Chem Int Ed Engl. – 2000. – Vol. 39. – P. 2281–2285.
17. Nitrogenous Derivatives of Phosphorus and the Origins of Life: Plausible Prebiotic Phosphorylating Agents in Water / [M. Karki, C. Gibard, S. Bhowmik *et al.*]. // Life (Basel). – 2017. – Vol. 7. – P. 32–60.
18. Reimann R. Nucleoside phosphorylation: a feasible step in the prebiotic pathway to RNA / R. Reimann, G. Zubay. // Orig Life Evol Biosph. – 1999. – Vol. 29. – P. 229–276.
19. Lohrmann R. Urea-inorganic phosphate mixtures as prebiotic phosphorylating agents / R. Lohrmann, L. Orgel. // Science. – 1971. – Vol. 171. – P. 490–494.
20. Nucleoside phosphorylation by phosphate minerals / [G. Costanzo, R. Saladino, C. Crestini *et al.*]. // J Biol Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 729–735.
21. Phosphorylation, oligomerization and self-assembly in water under potential prebiotic conditions / [C. Gibard, S. Bhowmik, M. Karki *et al.*]. // Nat Chem. – 2018. – Vol. 10. – P. 212–217.
22. Schwartz A. Phosphorus in prebiotic chemistry / Alan Schwartz. // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. – 2006. – Vol. 361. – P. 1743–1749.

23. Production of Potentially Prebiotic Condensed Phosphates by Phosphorus Redox Chemistry / [A. Matthew, D. Pasek, P. Terence *et al.*]. // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2008. – Vol. 47. – P. 7918–7920.
24. Dingwei G. Prebiotic Chemistry: The Role of Trimetaphosphate in Prebiotic Chemical Evolution / G. Dingwei, Y. Jianxi, Z. Yufen. // *Frontiers in Chemistry*. – 2022. – Vol. 10. – P. 2646–2656.
25. Evidence for Reactive Reduced Phosphorus Species in the Early Archean Ocean / [M. Pasek, M. A., , J. P., J. Harnmeijer, R. Buick *et al.*]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – Vol. 110. – P. 10089–10094.
26. Macia E. Primary Sources of Phosphorus and Phosphates in Chemical Evolution / E. Macia, M. Hernandez, J. Oro. // *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. – 1997. – Vol. 27. – P. 459–480.
27. Darwin's Warm Little Pond: A One-Pot Reaction for Prebiotic Phosphorylation and the Mobilization of Phosphate from Minerals in a Urea-Based Solvent / [B. Burcar, M. Pasek, M. Gull *et al.*]. // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2016. – Vol. 55. – P. 13249–13253.
28. Organophosphorus Compound Formation Through the Oxidation of Reduced Oxidation State Phosphorus Compounds on the Hadean Earth / [M. Gull, F. Tian, J. Bracegirdle *et al.*]. // *Journal of Molecular Evolution*. – 2022. – Vol. 91. – P. 60–75.
29. Serpentinization as a route to liberating phosphorus on habitable worlds / [M. Pasek, A. Omran, T. Feng *et al.*]. // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 2022. – Vol. 336. – P. 332–340.
30. Blackburn G.M. Why did Nature select phosphate for its dominant roles in biology? / [M. Bowler, M. Cliff, J. Waltho *et al.*]. // *New Journal of Chemistry*. – 2010. – Vol. 34. – P. 784–794.
31. Pasek M. On the Origin of Phosphorylated Biomolecules / M. Pasek, T. Kee. // *Origins of Life: The Primal Self-Organization*. – 2011. – Vol. 3. – P. 57–84.

32. Srinivasan V. Analysis of the intermediary metabolism of a reductive chemoautotroph / V. Srinivasan, H. Morowitz. // *Biology Bulletin*. – 2009. – Vol. 217. – P. 222–255.
33. Peretó J. Charles Darwin and the Origin of Life / J. Peretó, J. Bada, A. Lazcano. // *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. – 2009. – Vol. 39. – P. 395–406.
34. Pohorille A. Is Water the Universal Solvent for Life? / A. Pohorille, L. Pratt. // *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. – 2012. – Vol. 42. – P. 5–12.
35. Westheimer F. Why nature chose phosphates / Frank Westheimer. // *Science*. – 1987. – Vol. 235. – P. 1173–1181.
36. Why nature really chose phosphate / [S. Kamerlin, P. Sharma, R. Prasad *et al.*]. // *Quarterly Reviews of Biophysics*. – 2013. – Vol. 46. – P. 1–132.
37. Mineral evolution / [R. Hazen, D. Papineau, W. Bleeker *et al.*]. // *American Mineralogist*. – 2008. – Vol. 93. – P. 1693–1720.
38. Maguire O. A physicochemical orthophosphate cycle via a kinetically stable thermodynamically activated intermediate enables mild prebiotic phosphorylations / O. Maguire, I. Smokers, W. Huck. // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12. – P. 5517 – 5526.
39. A Stark Contrast to Modern Earth: Phosphate Mineral Transformation and Nucleoside Phosphorylation in an Iron- and Cyanide-Rich Early Earth Scenario / [B. Burcar, A. Castañeda, J. Lago *et al.*]. // *Angewandte Chemie International Edition in English*. – 2019. – Vol. 58. – P. 16981–16987.
40. Pasek M. Phosphorus: a case for mineral-organic reactions in prebiotic chemistry / M. Pasek, B. Herschy, P. Kee. // *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. – 2015. – Vol. 45. – P. 207–225.
41. Evaporite Borate-Containing Mineral Ensembles Make Phosphate Available and Regiospecifically Phosphorylate Ribonucleosides: Borate as a Multifaceted Problem Solver in Prebiotic Chemistry / [H. Kim, Y. Furukawa, T. Kakegawa *et al.*]. // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2016. – Vol. 55. – P. 15816–15820.

42. Benner S. Mineral-Organic Interactions in Prebiotic Synthesis / S. Benner, H. Kim, E. Biondi. // *Prebiotic Chemistry and Chemical Evolution of Nucleic Acids*. – 2018. – Vol. 35. – P. 31–83.
43. Montmorillonite protection of an UV-irradiated hairpin ribozyme: evolution of the RNA world in a mineral environment / [E. Biondi, S. Branciamore, M. Maurel *et al.*]. // *BMC Evolutionary Biology*. – 2007. – Vol. 7. – P. 1–7.
44. Cairns-Smith A. Genetic takeover and the mineral origins of life / Alexander Graham Cairns-Smith. – London: Cambridge University Press, 1982. – 478 p. – (Genetics Research). – (3; book. 2147483647).
45. Adsorption of RNA on mineral surfaces and mineral precipitates / [E. Biondi, Y. Furukawa, J. Kawai *et al.*]. // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. – 2017. – Vol. 13. – P. 393–404.
46. Nucleoside phosphorylation by the mineral schreibersite / [M. Gull, M. Mojica, F. Fernández *et al.*]. // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 17198–17202.
47. Investigation of schreibersite and intrinsic oxidation products from Sikhote-Alin, Seymchan and Odessa meteorites and Fe<sub>3</sub>P and Fe<sub>2</sub>NiP synthetic surrogates / [C. Pirim, M. Pasek, D. Sokolov *et al.*]. // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 2014. – Vol. 140. – P. 259–274.
48. Pasek M. Schreibersite on the early Earth: Scenarios for prebiotic phosphorylation / Matthew Pasek. // *Geoscience Frontiers*. – 2017. – Vol. 8. – P. 329–335.
49. Cycling Phosphorus on the Archean Earth: Part II. Phosphorus Limitation on Primary Production in Archean Ecosystems / [H. Jihua, A. Knoll, F. Fang *et al.*]. // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 2020. – Vol. 280. – P. 360 – 377.
50. Phosphorus mineral evolution and prebiotic chemistry: from minerals to microbes / [C. Walton, O. Shorttle, E. Jenner *et al.*]. // *Earth Science Reviews*. – 2021. – Vol. 23. – P. 31–69.
51. The dissolution kinetics and apparent solubility of natural apatite in closed reactors at temperatures from 5 to 50 °C and pH from 1 to 6 / [N. Harouiya, C. Chairat, S. Köhler *et al.*]. // *Chemical Geology*. – 2007. – Vol. 244. – P. 554–568.

52. Darwin's Warm Little Pond: A One-Pot Reaction for Prebiotic Phosphorylation and the Mobilization of Phosphate from Minerals in a Urea-Based Solvent / [B. Burcar, M. Pasek, M. Gull *et al.*]. // *Angewandte Chemie International Edition in English*. – 2016. – Vol. 55. – P. 13249–1325.
53. Pearce E. On the dissolution of hydroxyapatite in acid solutions / Pearce. // *Journal of Dental Research*. – 1988. – Vol. 67. – P. 1056–1066.
54. Insight into Biological Apatite: Physiochemical Properties and Preparation Approaches / [Q. Liu, S. Huang, J. Matinlinna *et al.*]. // *BioMed Research International*. – 2013. – Vol. 13. – P. 1–13.
55. Inorganic phosphate and nucleotides on silica surface: condensation, dismutation, and phosphorylation / [T. Georgelin, M. Jaber, T. Onfroy *et al.*]. // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2013. – Vol. 117. – P. 12579–12590.
56. Pan H. Effect of Carbonate on Hydroxyapatite Solubility / H. Pan, B. Darvell. // *Crystal Growth & Design*. – 2010. – Vol. 10. – P. 845–850.
57. Imidazole-phosphate polymers: Acid-base properties, association with oligonucleotides and oligosilicates / [V. Annenkov, V. Aseyev, N. Zelinskiy *et al.*]. // *Journal of Molecular Liquids*. – 2021. – Vol. 329. – P. 98–115.
58. Weber A. Formation of pyrophosphate, tripolyphosphate, and phosphorylimidazole with the thioester, N, S-diacetylcysteamine, as the condensing agent / Weber. // *Journal of Molecular Evolution*. – 1981. – Vol. 18. – P. 24–33.
59. Conover T. Effect of imidazole on adenosine triphosphatase, adenosine triphosphate-inorganic phosphate exchange reaction and oxidative phosphorylation / T. Conover, J. Gonze, R. Estabrook. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects*. – 1964. – Vol. 81. – P. 587–590.
60. Zhao Z. A plausible prebiotic selection of ribose for RNA - formation, dynamic isolation, and nucleotide synthesis based on metal-doped-clays / Z. Zhao, X. Wang. // *Chem*. – 2021. – Vol. 7. – P. 3292–3308.

61. Cafferty B. Abiotic synthesis of RNA in water: a common goal of prebiotic chemistry and bottom-up synthetic biology / B. Cafferty, N. Hud. // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2014. – Vol. 22. – P. 146–157.
62. Zhang S. Potentially Prebiotic Activation Chemistry Compatible with Nonenzymatic RNA Copying / S. Zhang, D. Duzdevich, J. Szostak. // *Journal of the American Chemical Society*. – 202. – Vol. 142. – P. 14810–14813.
63. Anderson E. Imidazole- and imidazolium-containing polymers for biology and material science applications / E. Anderson, T. Long. // *Polymer*. – 2010. – Vol. 51. – P. 2447–2454.
64. Cavitation as a plausible driving force for the prebiotic formation of N9 purine nucleosides / [Y. Patehebieke, Z. Zhao, S. Wang *et al.*]. // *Cell Reports Physical Science*. – 2021. – Vol. 2. – P. 375–388.
65. Patel R. Calcium Imidazolephosphate: A Highly Efficient Phosphorylating Reagent for Amines, Alcohols, and Thiols / R. Patel, A. Pal. // *Synthetic Communications*. – 2005. – Vol. 35. – P. 1381–1389.
66. Landon J. Calcium Imidazolephosphate as a Selective Phosphorylating Reagent for Hydroxyl Groups / J. Landon, D. Cogan, V. Buckin. // *Tetrahedron Letters*. – 2012. – Vol. 53. – P. 2189–2191.
67. Calcium Imidazolephosphate as a New Phosphorylating Agent for Nucleosides and Nucleotides / [L. Sancineto, T. Mosciatti, M. Artico *et al.*]. // *European Journal of Organic Chemistry*. – 2013. – Vol. 19. – P. 3973–3979.
68. Debele T. Calcium Imidazolephosphate: An Efficient Reagent for Phosphorylation of Alcohols and Amines under Solvent-Free Conditions / T. Debele, G. Adugna. // *Journal of Heterocyclic Chemistry*. – 2016. – Vol. 53. – P. 301–307.
69. Majid M. Calcium Imidazolephosphate as a Highly Efficient Reagent for the Phosphorylation of Alcohols and Amines / M. Majid, M. Asif, S. Rauf. // *Organic Preparations and Procedures International*. – 2019. – Vol. 51. – P. 63–76.
70. Origin of Life: The Role of Prebiotic Chemistry / [R. Saladino, C. Crestini, G. Costanzo *et al.*]. // *Journal of Physics: Conference Series*. – 2009. – Vol. 166. – P. 12–24.

71. A Reassessment of Prebiotic Organic Synthesis in Neutral Planetary Atmospheres. / [H. Cleaves, J. Chalmers, A. Lazcano *et al.*]. // *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. – 2008. – Vol. 38. – P. 105–115.
72. Powner M. Synthesis of Activated Pyrimidine Ribonucleotides in Prebiotically Plausible Conditions / M. Powner, B. Gerland, J. Sutherland. // *Nature*. – 2009. – Vol. 459. – P. 239–242.
73. Origins of Life Research: A Bibliometric Approach / [R. Saladino, E. Carota, G. Botta *et al.*]. // *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. – 2015. – Vol. 45. – P. 111–130.
74. Ruiz-Mirazo K. Prebiotic Systems Chemistry: New Perspectives for the Origins of Life / K. Ruiz-Mirazo, C. Briones, A. Escosura. // *Chemical Reviews*. – 2014. – Vol. 114. – P. 285–366.
75. Patel A. Prebiotic synthesis of sugars by glycolaldehyde dimerization in water / A. Patel, M. Siegler, S. Stairs. // *Nature Chemistry*. – 2019. – Vol. 11. – P. 1038–1047.
76. Understanding prebiotic chemistry through the analysis of extraterrestrial amino acids and nucleobases in meteorites / [A. Burton, J. Stern, J. Elsila *et al.*]. // *Chemical Society Reviews*. – 2021. – Vol. 41. – P. 5459–5472.
77. Heterocyclic compounds in carbonaceous meteorites: The case of Murchison. / [R. Saladino, C. Crestini, V. Neri *et al.*]. // *Meteoritics & Planetary Science*. – 2008. – Vol. 43. – P. 1665–1675.
78. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase / [D. Knighton, J. Zheng, L. Ten-Eyck *et al.*]. // *Science*. – 1991. – Vol. 253. – P. 407–414.
79. Johnson L. Structural basis for control by phosphorylation / L. Johnson, R. Lewis. // *Chemical Reviews*. – 2001. – Vol. 101. – P. 2209–2242.
80. The protein kinase complement of the human genome / [G. Manning, D. Whyte, R. Martinez *et al.*]. // *Science*. – 2002. – Vol. 298. – P. 1912–1934.
81. Krebs E. Protein phosphorylation and cellular regulation I. The Nobel Prize in Physiology or Medicine - 1992 / Edwin Krebs. // *The EMBO Journal*. – 1993. – Vol. 12. – P. 1781–1793.

82. Hanks S. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: Kinase (catalytic) domain structure and classification / S. Hanks, T. Hunter. // *The FASEB Journal*. – 1995. – Vol. 9. – P. 576–596.
83. Rosenberg T. A simple preparation method for diphosphoimidazole / Thomas Rosenberg. // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1964. – Vol. 105. – P. 315–318.
84. Cooperman B. Nucleophilic attack by zinc (II)-pyridine-2-carbaldoxime anion on phosphorylimidazole. A model for enzymatic phosphate transfer / B. Cooperman, G. Lloyd. // *Journal of the American Chemical Society*. – 1971. – Vol. 93. – P. 4883–4892.