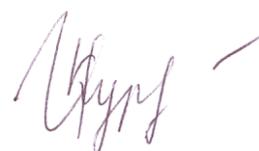


Учреждение Российской Академии Наук
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

на правах рукописи



Куркова Инна Николаевна

Структурно-функциональный анализ каталитического антитела **A.17.**
Каталитический механизм деградации фосфорорганического
пестицида параоксон.

Специальность: 03.01.03 - Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в Учреждении РАН Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Научные руководители:

доктор биологических наук **Пономаренко Наталья Александровна**

кандидат химических наук **Смирнов Иван Витальевич**

Официальные оппоненты:

Деев Сергей Михайлович

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (ИБХ РАН)

Демидкина Татьяна Викторовна

доктор химических наук, профессор, заведующая лабораторией химических основ биокатализа Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта (ИМБ РАН).

Ведущая организация: Учреждение Российской Академии Наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита состоится « » 2011 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Учреждении РАН Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова по адресу: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН

Автореферат разослан «___» _____ 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников



Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Поиск эффективного антидота, способного нейтрализовать фосфорорганические токсины (ФОТ), остается актуальной проблемой молекулярной биологии и биотехнологии. Самыми многообещающими среди прочих в этой области являются разработки препаратов на основе ферментов. Ферменты, участвующие в метаболизме ацетилхолина, являются основными мишенями ФОТ в организме человека. На сегодняшний день бутирилхолинэстераза (BChE) считается перспективным средством антидотной профилактики и лечения отравлений ФОТ. Существующие в данный момент промышленные системы экспрессии BChE дороги, недостаточно эффективны и требуют существенного улучшения. В настоящее время рекомбинантные антитела широко применяются как терапевтические агенты и имеют ряд преимуществ перед ферментами в качестве лекарственных средств. Потенциальный антидот на основе каталитического антитела (абзима) будет сочетать в себе свойство фермента – способность эффективно осуществлять катализ – с низкой иммуногенностью, продолжительным периодом циркуляции в кровотоке и действенными механизмами выведения из организма в составе комплекса антиген-антитело, характерными для молекул иммуноглобулинов. В связи с этим создание «каталитической» вакцины – каталитического антитела, способного нейтрализовать ФОТ, – актуально. Кроме того, изучение механизма катализа подобных искусственных ферментов представляет собой самостоятельную, весьма интересную с точки зрения фундаментальной науки проблему.

Цель работы. Цель настоящего исследования состояла в проведении структурно-функционального анализа каталитического антитела **A.17**, полученного ранее в лаборатории биокатализа методом фагового дисплея. Варибельные домены данного антитела были отобраны из полусинтетической библиотеки генов одноцепочечных антител по принципу «механизм-зависимого» связывания с *n*-нитрофенил 8-метил-8-азабицикло[3.2.1]октан фенилфосфонатом (фосфонатом X), аналогом ФОТ по механизму действия на сериновые гидролазы. Кроме того, самостоятельной задачей представленной работы стало изучение каталитического механизма деградации ФОТ на примере фосфорорганического пестицида параоксон.

Научная новизна и практическая значимость работы. Полученные в результате работы данные позволили существенно продвинуться в понимании структурной организации активного центра искусственно полученного биокатализатора иммуноглобулиновой природы. Впервые разрешена структура как Fab фрагмента каталитического антитела **A.17** и его ковалентного аддукта с остатком фосфоната X. Комплекс-

ное физико-химическое исследование позволило предположить осуществление механизма индуцированного соответствия при взаимодействии **A.17** с фосфонатом X. Изучение функциональной активности абзима позволило выявить его способность ускорять гидролиз фосфорорганического пестицида параоксон. Было показано, что данное превращение осуществляется по пути ковалентного катализа. Полученные результаты могут быть использованы как основа для рационального дизайна с целью улучшения каталитической эффективности имеющейся активности **A.17** или при получении новых биокатализаторов. Полученные данные могут иметь биотехнологическое значение.

Апробация работы. Результаты данной работы были представлены на 3-ей международной конференции «Ранние события при патологиях человека» (Барбизон, Франция, 2010), 35-м конгрессе FEBS (Гетеборг, Швеция, 2010), 36-м конгрессе FEBS (Турин, Италия, 2011), 21-м IUBMB и 12-м FAOБMB Международном конгрессе Биохимии и Молекулярной биологии (Шанхай, Китай, 2009). По материалам работы вышли 3 статьи в рецензируемых журналах.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на ___ страницах машинописного текста и состоит из разделов введение, обзор литературы, экспериментальная часть, включающая разделы «результаты и их обсуждение» и «материалы и методы», выводы, дополнительные материалы и список цитируемой литературы, содержащий 149 ссылок. В работе содержится ___ рисунка и ___ таблиц.

Содержание работы

Одноцепочечное антитело **A.17 взаимодействует с фосфорорганическим пестицидом параоксон**

Каталитическое антитело **A.17** было отобрано из фаг-дисплейной библиотеки генов одноцепочечных антител по способности связывать механизм-зависимый ингибитор сериновых гидролаз и ацетилхолинэстеразы – фосфонат X (Рис.1). Методом масс-спектрометрии MALDI было показано, что модификации подвергается аминокислотный остаток Tyr37 легкой цепи (Reshetnyak et al, J Am Chem Soc, 2007). Представлялось значимым и интересным проверить связывание и каталитические функции данного антитела по отношению к ряду ФОТ. На первом этапе настоящей работы было показано, что реакция одноцепочечного антитела **A.17** с биотинилированным производным фосфоната X (Bt-X) ингибируется диизопропилфтор фосфатом (ДФФ), 4-(2-аминоэтил) бензилсульфонил фторидом (АЭБСФ) и

инсектицидом параоксон (Рис. 1). Детекцию взаимодействия проводили с помощью Вестерн блот анализа, результаты приведены на рисунке 2.

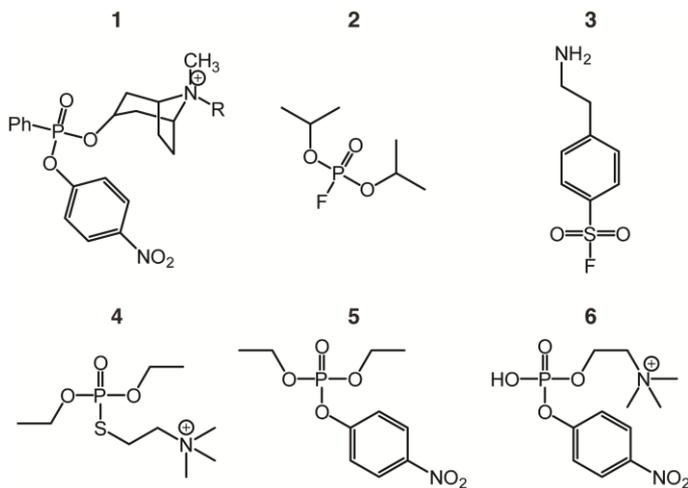


Рис. 1. Химические структуры фосфорорганических соединений, использованных в работе: **1** *l*-нитрофенил 8-метил-8-азабicyclo[3.2.1]октил фенилфосфонат (R=H фосфонат X, R= биотин Bt-X), **2** диизопропил фторфосфат (ДФФ), **3** 4-(2-аминоэтил) бензилсульфонил фторид (АЭБСФ), **4** 2-диэтоксифосфорилтиоэтил-триметиламмоний (эктоиофат), **5** 0,0-диэтил 0-(4-нитрофенил) фосфонат (параоксон), **6** 0-(4-нитрофенилфосфорил)холин.

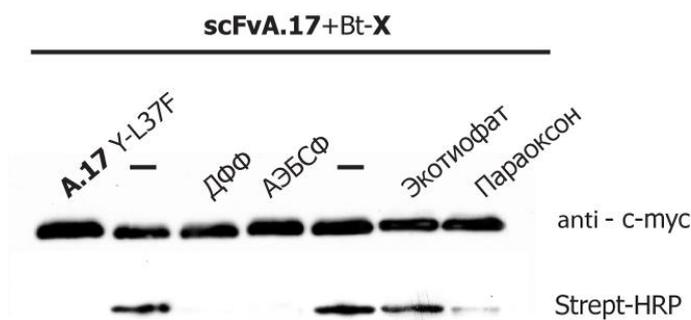


Рис. 2. Вестерн блот анализ ингибирования связывания одноцепочечного антитела scFv **A.17** с биотинилированным фосфонатом X необратимыми ингибиторами. Во всех случаях концентрация активных центров антител составляла 1 мкМ, концентрация Bt-X 100 мкМ, концентрация ингибиторов 1 мМ, реакция проходила в течение часа при 37°C, объем реакционной смеси 20 мкл. Прединкубация осуществлялась при 37°C. Время прединкубации составляло 1 час для всех ингибиторов, кроме эктоиофата и параоксона. Для последних время прединкубации составляло 12 часов. Визуализацию ковалентного аддукта с Bt-X осуществляли окрашиванием стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (Strept-HRP). Концентрация антител нормирована по сравнительной окраске антителами, специфичными к с-мус эпителию на аналогичной мембране.

A.17Y-L37F –отрицательный контроль – мутантное одноцепочечное антитело.

Создание эукариотической системы экспрессии полноразмерного антитела A.17

Для одноцепочечных антител известны проблемы экспрессии, протеолитической лабильности и фолдинга (в том числе склонность к агрегации). Полноразмерное антитело предпочтительнее использовать в качестве терапевтического агента в связи с большим периодом его циркуляции в кровотоке и его способностью запускать гуморальные и клеточные эффекторные механизмы выведения комплексов с антигеном. При перестановке конструкций одноцепочечных антител в полноразмерные иммуноглобулины класса G специфичность антиген связывающего центра обычно сохраняется, а аффинность может возрастает благодаря бивалентной природе IgG.

В продолжение работы варибельные фрагменты легкой и тяжелой цепей **A.17** были переклонированы в вектора для экспрессии в виде полноразмерных легкой и тяжелой цепей в эукариотической системе.

При этом переменный фрагмент легкой цепи **A.17** был переклонирован для экспрессии в виде полноразмерной каппа 1 цепи иммуноглобулина человека под контролем иммуноглобулинового промотера.

Экспрессионный вектор с сайтами клонирования переменного фрагмента легкой цепи антитела (pSV40/Zeo2 Lch) был получен модификацией вектора pSV40/Zeo2 (Invitrogen). Фрагмент ДНК, кодирующий последовательность лидерного пептида для легких цепей антитела (L prom leader – MVSTPQFLVFLFWIPASRG), был синтезирован методом ПЦР с использованием трех олигонуклеотидов с перекрывающимися последовательностями. Фрагмент ДНК, кодирующий последовательность константного региона каппа 1 легкой цепи иммуноглобулина человека (kappa chain), был получен амплификацией с помощью ПЦР, используя геномную ДНК человека в качестве матрицы и пару специфических праймеров. Участок ДНК, кодирующий переменный фрагмент легкой цепи антитела **A.17** (Vl **A.17**), амплифицировали с помощью ПЦР с использованием плазмиды pHEN2, несущей нуклеотидную последовательность, кодирующую scFv**A.17** (pHEN2**A.17**), в качестве матрицы и пары специфических праймеров.

В свою очередь, переменный фрагмент тяжелой цепи **A.17** был переклонирован для экспрессии в виде полноразмерной гамма 1 цепи иммуноглобулина человека также под контролем иммуноглобулинового промотера.

Экспрессионный вектор с сайтами клонирования переменного фрагмента легкой цепи антитела (pcDNA.1.3.NygroHch) был получен модификацией вектора pcDNA.1.3.Nygro (Invitrogen). Фрагмент ДНК, кодирующий последовательность лидерного пептида для тяжелых цепей антитела (H prom leader – MERHWIFLSLLSVIAGVHS), был синтезирован методом ПЦР с использованием трех олигонуклеотидов с перекрывающимися последовательностями. Фрагмент ДНК, кодирующий последовательность константного региона гамма 1 тяжелой цепи иммуноглобулина человека (gamma chain), был амплифицирован с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы геномную ДНК человека и две пары специфических праймеров. ПЦР-амплификацию фрагмента ДНК, кодирующего переменный фрагмент тяжелой цепи антитела **A.17** (Vh **A.17**), осуществляли с использованием в качестве матрицы pHEN2**A.17** и специфических праймеров.

Схема полученных генетических конструкций pSV40/Zeo2 Lch **A.17** и pcDNA.1.3Nygro Hch **A.17** представлена на рис.3.

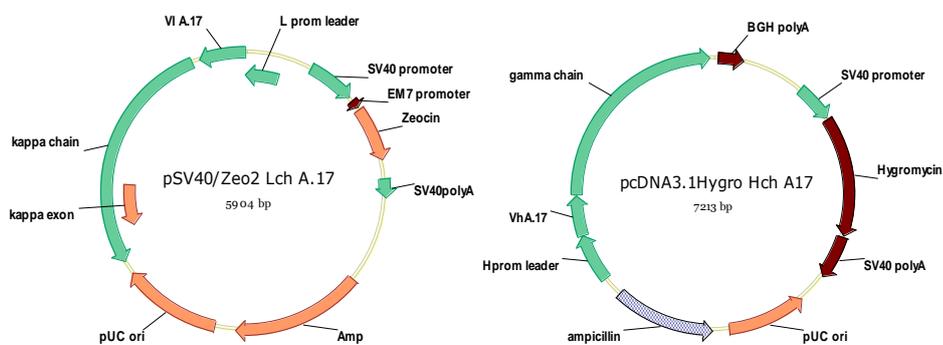


Рис. 3. Схема генетических конструкций для экспрессии полноразмерных легкой и тяжелой цепей антитела **A.17** в эукариотической системе.

Полученными генетическими конструкциями была проведена ко-трансфекция клеточных линий CHO-K1 и миеломы NSObcl2. В результате селекции с использованием антибиотиков зеоцин и гигромицин были получены 5 стабильно продуцирующих клонов трансфектом. Уровень продукции рекомбинантных антител оценивали методом ИФА по схеме sandwich ELISA. Для каждого клона были подобраны оптимальные условия экспрессии. Для лучшего клона 2B5 из трансфектом клеток линии CHO-K1 среда DMEM, содержащая 2% фетальной сыворотки, и среда Pro-CHO4 (Lonza) являются оптимальными, концентрация человеческих антител в культуральной среде достигает максимума на 8 день и составляет 10 мг/мл. Для лучшего клона 2G3 из трансфектом клеток линии NSO-bcl2 оптимальной является среда DMEM-RPMI (Gibco) 50% на 50%, содержащая 2% фетальной сыворотки. Концентрация человеческих антител в этой культуральной среде достигает 18 мг/мл на 8 день.

Затем была разработана система экспрессии антитела **A.17** в препаративных количествах. Для этого были использованы культуральные флаконы большой площади (175 и 225 см²), роллеры (1700 см²) и спиннеры с микроносителями. Оптимальной по соотношению «выход целевого белка – затраты» и чистоте финального продукта была признана экспрессия в культуральных флаконах площадью 225 см² на бессывороточной среде Pro-CHO4, в процессе культивирования удалось добиться уровня экспрессии 10 мг антитела с литра для клона 2B5 клеточной линии CHO.

Культуральную среду собирали, центрифугировали, супернатант фильтровали через бумажные фильтры. Осветленную культуральную среду подвергали ультрафильтрации на приборе Pellicon (Millipore) на мембранах 300 кДа. При этом отделяли остатки клеточного дебриса и высокомолекулярные соединения. Далее фильтрат концентрировали на мембранах 30 кДа в 10 – 20 раз по объему и переводили под буферный раствор PBS. Полученный концентрат был последовательно очищен методом аффинной хроматографии на колонках с иммобилизованным белком А и иммобилизованными антите-

лами козы, специфичными к иммуноглобулинам человека, после чего осуществляли гель-фильтрацию на колонке Superdex 200 (Amersham). Выход целевого белка оценивался методом ИФА и составил 70%. Чистоту полученного продукта оценивали с использованием денатурирующего электрофореза в 12% ПААГ в восстанавливающих условиях с последующей окраской Кумассии синим R250, чистота достигала 95% (Рис. 4).

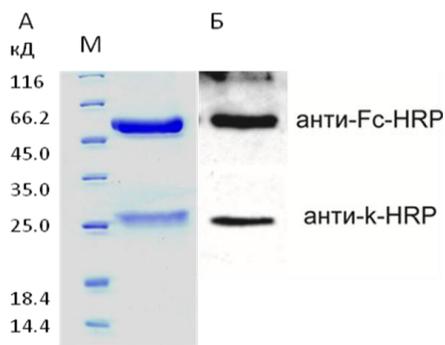


Рис. 4. Электрофореграмма денатурирующего 12% ПААГ в восстанавливающих условиях с последующей окраской Кумассии синим R250 (А) и Вестерн-блот анализ (Б) очищенного препарата полноразмерного рекомбинантного антитела **A.17** из среды культивирования трансфектомы 2В5 точной линии СНО. Визуализацию осуществляли с использованием антител козы, специфичных к Fc фрагменту (верхняя панель) и каппа цепи (нижняя панель) антител человека, конъюгированных с пероксидазой хрена. М – маркер молекулярных весов.

Сравнение функциональной активности одноцепочечного и полноразмерного антитела **A.17**

Анализ реакционной способности показал, что варибельные фрагменты легких и тяжелых цепей **A.17**, экспрессированные в составе полноразмерного антитела человека, сохранили способность взаимодействовать с небитинилированным фосфонатом X. Оценка кинетических параметров этого взаимодействия с использованием схемы Китца-Вилсона показала, что реакционная способность полноразмерного антитела значительно выше по сравнению с опубликованными ранее данными для одноцепочечного антитела (таблица 1).

Таблица 1. Кинетические параметры реакции одноцепочечного и полноразмерного антитела **A.17** с фосфонатом X (по схеме Китца-Вилсона). Измерение проводили при 37°C, концентрация активных центров **A.17** 1 мкМ, концентрацию фосфоната X варьировали от 10 до 100 мкМ.

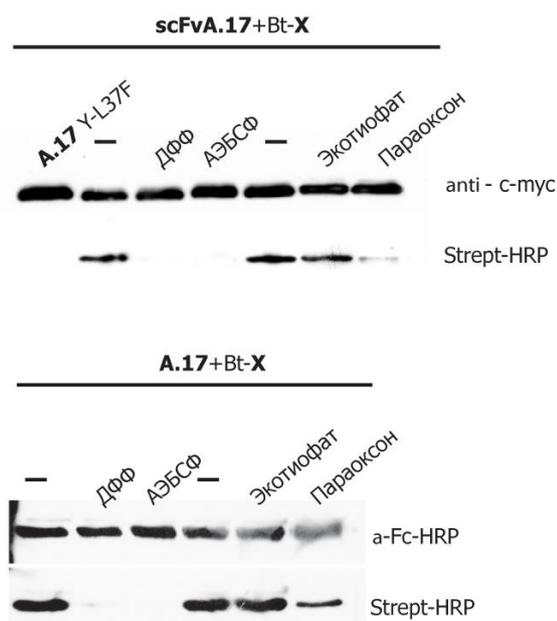
Абзим	k_2 , мин ⁻¹	$K_{дис}$, мкМ	$k_2/K_{дис}$, мин ⁻¹ М ⁻¹ $\times 10^{-4}$
scFv A.17	0.32 ± 0.05	151 ± 21	0.21 ± 0.03
A.17 IgG	0.25 ± 0.02	6.2 ± 0.4	4.0 ± 0.6

При этом эффективность модификации полноразмерного антитела увеличилась более чем в 10 раз по сравнению с одноцепочечным **A.17**. Такое увеличение эффективности модификации достигается за счет образования более прочного нековалентного комплекса антитела с фосфонатом X, что, по всей видимости, связано с лучшей стабилизацией антиген-связывающего участка полноразмерного антитела. Незначительное

снижение k_2 , т.е. скорости перехода обратимого комплекса с ингибитором в ковалентный, возможно связано с тем, что константные участки легких и тяжелых цепей ограничивают подвижность переменных участков молекулы в активном центре.

Методом масс-спектрометрии MALDI было установлено, что ковалентная модификация полноразмерного антитела **A.17** фосфонатом X происходит по тому же пептидному участку легкой цепи иммуноглобулина, что и в случае одноцепочечного антитела.

Было показано, что полноразмерное антитело сохранило способность взаимодействия с биотинилированным производным фосфоната X и субстратную специфичность по отношению к аналогам ФОТ, сравнимую с одноцепочечным **A.17**. В обоих случаях модификация фосфонатом Bt-X ингибируется ДФФ, АЭБСФ и параоксоном, тогда как ингибирование отсутствует в случае экотиофата (Рис.5). Интересно, что химические структуры экотиофата и параоксона довольно схожи. Отсутствие взаимодействия с экотиофатом может быть объяснено различными свойствами химических связей Р-S и Р-О. По-видимому, нуклеофильная атака со стороны гидроксильной группы боковой группы Туг37 легкой цепи антитела оказывается более эффективной в случае более поляризованной связи Р-О. Возможно также, что продуктивному позиционированию молекулы экотиофата в активном центре **A.17** мешает его заряженная боковая группа. Полученные данные демонстрируют субстратную селективность активного центра изучаемого искусственного биокатализатора.



венного биокатализатора.

Рис. 5. Вестерн блот анализ ингибирования связывания одноцепочечного (scFv**A.17**) и полноразмерного антитела **A.17** с биотинилированным фосфонатом X необратимыми ингибиторами. Во всех случаях концентрация активных центров антител составляла 1 мкМ, концентрация Bt-X 100 мкМ, концентрация ингибиторов 1 мМ, реакцию проводили в течение часа при 37°C, объем реакционной смеси 20 мкл. Прединкубация осуществлялась при 37°C. Время прединкубации составляло 1 час для всех ингибиторов, кроме экотиофата и параоксона. Для последних время прединкубации составляло 12 часов. **A.17**Y-L37F – отрицательный контроль – мутантное одноцепочечное антитело. Визуализацию ковалентного аддукта с Bt-X осуществляли окраской стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена. Концентрацию антител нормировали по сравнительной окраске антителами, специфичными к с-мус эпиту, на аналогичной мембране в случае scFv и антителами, специфическими к Fc фрагменту тяжелой цепи антитела человека, на той же мембране в случае полноразмерного антитела.

Для изучения молекулярных основ механизма катализа абзима перспективным представлялось проведение рентгеноструктурного анализа Fab фрагмента этого антитела.

Структурный анализ антитела A.17

Кристаллизация осуществлялась в лаборатории П. Массона в Гренобле, Франция. Детальный анализ структуры был произведен в сотрудничестве с профессором А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния), профессором А. Фрибуле (Компьень, Франция) и лабораторией профессора А.Г. Габибова в рамках проекта НАТО «Наука для мира». Структуры Fab фрагмента антитела **A.17** и его аддукта с остатком фосфоната X были установлены с разрешением 1.5 Å и 1.36 Å соответственно. Координаты атомов и экспериментальные структурные факторы депонированы в Банк белковых структур (Protein Data Bank) с идентификационным кодом **2XZA** и **2XZC**.

Пространственная структура Fab фрагмента антитела A.17

Антигенсвязывающий центр антитела образован тремя β-тяжами варибельного фрагмента легкой и четырьмя β-тяжами варибельного фрагмента тяжелой цепи. Совместно они образуют глубокую полость, в формировании стенки которой так же участвует петля Leu99-Gly110 тяжелой цепи. Полость пространственно разделена на две «камеры» (Рис.6А-В). В составе верхней камеры выделяется группа ароматических аминокислотных остатков, в том числе пять тирозинов (Tyr-H33, 53, 59; Tyr-L33, 50) и триптофан Trp-L92. Подобные кластеры тирозиновых аминокислотных остатков являются характерной чертой антител, специфичных к ДНК и другим фосфорным эфирам. Нижняя камера содержит ароматические аминокислотные остатки Phe-L100, Trp-H48 и Trp-H109, формирующие гидрофобный карман, и Tyr-L37, находящийся на дне полости (Рис.6Г). Боковая цепь Tyr-L37 ориентирована в сторону CDR3 тяжелой цепи. Такое глубинное, скрытое от растворителя, расположение реакционного тирозина согласуется с его повышенной нуклеофильностью. Суммарная глубина антигенсвязывающего кармана составляет 15 Å. Столь глубокий активный центр нетипичен для каталитических антител и более характерен для каталитических центров холинэстераз, в частности бутирилхолинэстеразы (Рис. 7).

Петля Leu99 – Gly110 тяжелой цепи, содержащая остатки His-H104, Asn-H105 и Trp-H109, представляет собой неупорядоченную структуру с B-фактором 40 – 50 Å², в сравнении со средним B-фактором 19 Å². Низкий уровень упорядоченности, по видимому, связан со слабым взаимодействием аминокислотных остатков этой петли с коровыми структурами.

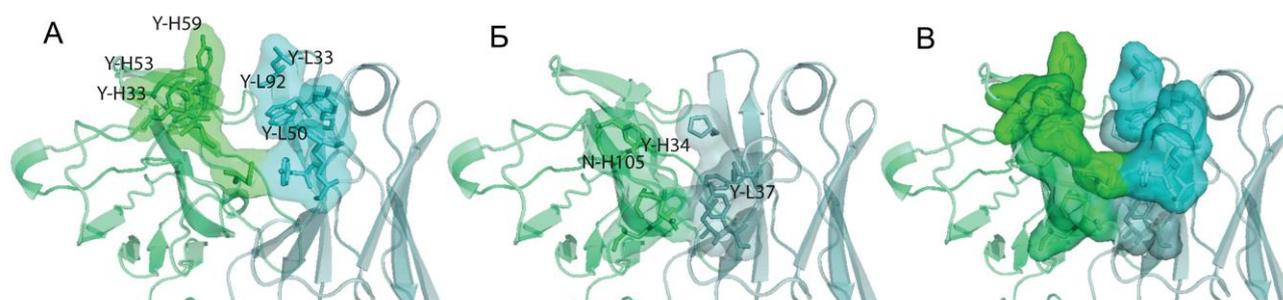


Рис. 6. Структурный анализ Fab **A.17**. Активный центр антитела состоит из двух камер. Изображение α-цепи, на фоне которой выделены верхняя (А) и нижняя (Б) камеры и образованный ими совместно сигмовидный карман (В). Легкая цепь показана голубым, тяжелая – зеленым цветом (А-В). Вид сверху с отображением ароматических аминокислотных остатков, формирующих стены верхней и нижней камер, а так же тирозина 37 легкой цепи в Fab-фрагменте **A.17** (Г). Легкая цепь показана серым, тяжелая цепь – сиреневым, петля 3СDР тяжелой цепи – малиновым.

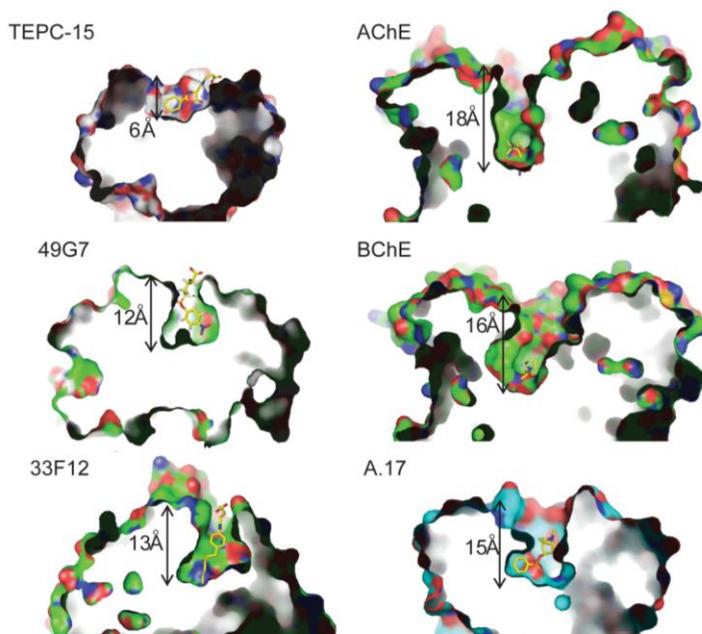
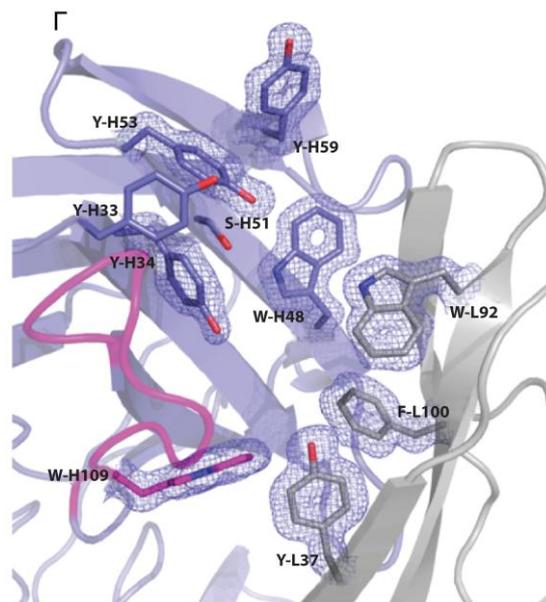


Рис.7. Сравнение глубин полостей активных центров биокатализаторов различной природы. TEPC-15 и 49G7 – эстеролитических антител, 33F12 – альдолазное антитело, AChE и BChE – ацетил- и бутерил- холин эстеразы. В каждом случае глубина активного центра соответствует высоте пирамиды, вписанной в полость активного центра таким образом, что ее вершина совпадает с реакционным остатком, а основание лежит в плоскости, проведенной через три аминокислотных остатка ближайших ко входу в активный центр биокатализатора.

Пространственная структура Fab фрагмента антитела A.17, модифицированного фосфонатом X

При анализе структуры ковалентного аддукта Fab фрагмента антитела **A.17** с остатком фосфоната X было установлено, что длина связи P-O составляет 1.6 Å. Фенильная группа фосфоната направлена к поверхности вариабельного участка легкой цепи, в то время как его тропиольная группа обращена к поверхности вариабельного участка тя-

желой цепи. Абсолютная конфигурация аддукта P(S). Учитывая, что фосфонилирование может осуществляться только в одном направлении (подход фосфоната X к реакционному тирозину возможен только в единственной пространственной ориентации из-за конфигурации активного центра), каталитическое антитело обладает стереоспецифичностью по отношению к его P(R) энантиомеру. Таким образом, вероятнее всего при взаимодействии **A.17** с фосфонатом X реализуется S_N2 механизм реакции. Фенольное кольцо фосфоната в составе ковалентного аддукта погружено в карман, образованный основной цепью Gly-L90 – Thr-L91 и боковыми цепями Ser-L35, Trp-L92, Pro-L98, Phe-L100, и при этом осуществляет T-стэкинг взаимодействие с Trp-L92 и Phe-L100 (Рис. 8А). Одновременно с модификацией тирозина индуцируется вращение фенильной группы фосфоната на угол χ^2 равный 20° , сдвиг Trp-L92 на 0.4 \AA и вращение вокруг Phe-L100Ca на 10° . Благодаря этим изменениям угол, образованный Ca-C β -C γ боковой цепи Tyr-L37, уменьшается на 5° по сравнению с исходной позицией. Высвобождение этого напряжения может являться движущей силой при дефосфорилировании Tyr-L37.

Атом азота тропинольного кольца фосфоната формирует сильную водородную связь (2.79 \AA) с атомом кислорода основной цепи аминокислотного остатка Asn-H105 (Рис. 8А). За счет этого сильного взаимодействия петля CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи стабилизируется в уникальной конформации, В-фактор становится равным $15 - 25 \text{ \AA}^2$. Атом кислорода связи P-O прочно соединен водородной связью с молекулой воды w614 (2.55 \AA). Таким образом, связь P-O оказывается сильно поляризованной, следствием чего является повышенная электрофильность атома фосфора. Сгусток электронной плотности непосредственно за фосфонилированным тирозином смоделирован как кластер молекул воды. Этот кластер располагается на расстоянии меньшем, чем 5 \AA от атома фосфора, и представляется потенциальным участником возможной гидролитической атаки аддукта тирозина. Tyr-H34 так же может играть значительную роль при фосфорилировании за счет стекинг-взаимодействия между его ароматическим кольцом и *n*-нитрофенольной уходящей группой.

Сайт-направленный мутагенез антитела **A.17. Функциональный анализ антитела **A.17** и его мутантов**

Основываясь на данных, полученных в результате структурного анализа, был проведен рациональный дизайн вариантов мутагенеза абзима с целью детализации особенностей его каталитического механизма.

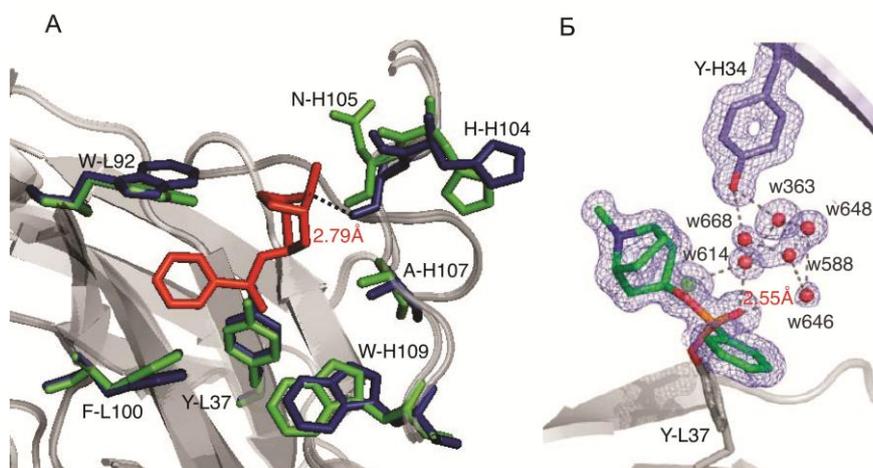


Рис.8. (А) Наложение активных центров Fab **A.17** (зеленый цвет) и его ковалентного аддукта с остатком фосфоната X (синий), иллюстрирующее изменения в положении аминокислотных остатков Tyr-L37, Trp-L92, Phe-L100 и петли CDR3 тяжелой цепи (His-H104, Asn-H105, Ala-H107 и Trp-H109). Остаток фосфоната показан красным. (Б) Кластер молекул воды в активном центре фосфонированного Fab **A.17**. Молекула воды w614 образует прочную Н-связь с кислородом Р=О фосфоната. В свою очередь Tyr-H34 стабилизирует группу из 6 молекул воды, формирующую сеть Н-связей. Легкая цепь антитела показана серым цветом, тяжелая – голубым, остаток фосфоната – зеленым. Водородные связи обозначены пунктирными линиями.

Было предложено провести замену на аланин аминокислотных остатков петли CDR3 тяжелой цепи His-H104 и Asn-H105, участвующего в формировании Н-связи с азотом тропинольного кольца в структуре модифицированного фосфонатом Fab-фрагмента. В данном случае стабилизация обеспечивается формированием водородной связи между основной цепью 105-го остатка и азотом тропинольного кольца, тем не менее, замена боковой цепи этого и соседнего аминокислотных остатков может опосредованно повлиять на стабилизации за счет вторичных взаимодействий. Мутагенез 33 и 37 тирозинов легкой цепи антитела с заменой на фенилаланин для одноцепочечного антитела был осуществлен ранее (Reshetnyak et al., J Am Chem Soc, 2007). Позиции для замены были определены аминокислотными остатками, модифицирующимися фосфонатом X в реакционных клонах (Y-L33 – во всех клонах, кроме **A.17**, Y-L37 в клоне **A.17**), отобранных из библиотеки scFv. В настоящей работе эти мутантные варианты легких цепей **A.17** были переклонированы в виде полноразмерных легких и тяжелых цепей для экспрессии в эукариотической системе.

Мутагенез аминокислотных остатков петли CDR3 тяжелой цепи осуществляли, используя в качестве матрицы последовательность одноцепочечного антитела **A.17** в фагемиде рНЕН2. Фрагменты ДНК, содержащие замены аминокислотных остатков, получали методом удлинения перекрывающихся ПЦР-продуктов. Далее переменные фрагменты мутантных легких и тяжелых цепей были переклонированы в виде полноразмерных легких и тяжелых цепей для экспрессии в эукариотической системе анало-

гично цепям дикого типа антитела **A.17**. Полученными генетическими конструкциями была проведена ко-трансфекция клеточной линии СНО-К1. Селекцию и отбор стабильно продуцирующих клонов трансфектом осуществляли аналогично описанной выше процедуре для трансфектом, продуцирующих антитело **A.17** дикого типа. Для каждого клона были подобраны оптимальные условия экспрессии. Уровень продукции рекомбинантных антител в культуральных флаконах площадью 225 см² для лучших клонов, экспрессирующих **A.17N-H104A**, составил 6 мг с литра бессывороточной среды Pro-СНО4 на 8 день экспрессии, для **A.17N-H105A** – 2 мг/литра, для **A.17D-H106A** – 0,6 мг/литра, для **A.17Y-L33F** и **A.17Y-L37F** – 6 и 8 мг/литра соответственно. Для очистки целевых белков использовали протокол, разработанный ранее для полноразмерного антитела **A.17** дикого типа. Выход целевого белка варьировался в пределах 60-70%, чистота препаратов мутантных полноразмерных антител составляла 95% (оценивали с использованием денатурирующего электрофореза в 12% ПААГ в восстанавливающих условиях с последующей окраской Кумассии синим R250).

Результаты Вестерн блот анализа взаимодействия мутантных антител с VtX и ингибирования ковалентного мечения в присутствии ингибиторов демонстрируют сходный характер модификации с абзимом дикого типа (Рис.9). Замена тирозина 37 легкой цепи на фенилаланин приводит к полной потере способности каталитического антитела ковалентно модифицироваться фосфонатом X и его биотинилированным аналогом (Рис.9, таблица 2). Анализ кинетики взаимодействия мутантных антител с фосфонатом по схеме Китца-Вилсона (таблица 2) показал, что в случае мутанта **A.17N-H104A**, эффективность модификации снизилась в два раза. При этом константа $K_{Дис}$ практически не изменилась, т.е. замена боковой цепи 104 остатка практически не сказывается на стадии формирования обратимого комплекса антитела с субстратом. В то же время k_2 снизилась почти в два раза. Следует отметить, что в немодифицированном активном центре боковая цепь His-H104 электростатически взаимодействует с боковой группой Asp-H106 (расстояние 3.2 Å, мостик через молекулу воды). Из анализа структурных данных известно, что в нативном Fab петля H-CDR3 находится в разупорядоченном состоянии, т.е. указанное взаимодействие не фиксирует положение петли в целом. После модификации индольное кольцо гистидина разворачивается, разрывая контакт со 106 остатком. В то же время возникает новое взаимодействие с Thr-H100, которое, наряду с закоренением тропинольного кольца фосфоната основной цепью 105 остатка и стабилизацией фенильной группы за счет стэкинг-взаимодействий в гидрофобном кармане активного центра, вносит вклад в стабилизацию петли CDR3. Вероятно, невозможность формиро-

ваний этой связи в случае замены боковой цепи His на короткую алифатическую группу затрудняет переход обратимого комплекса в ковалентный по сравнению с диким типом.

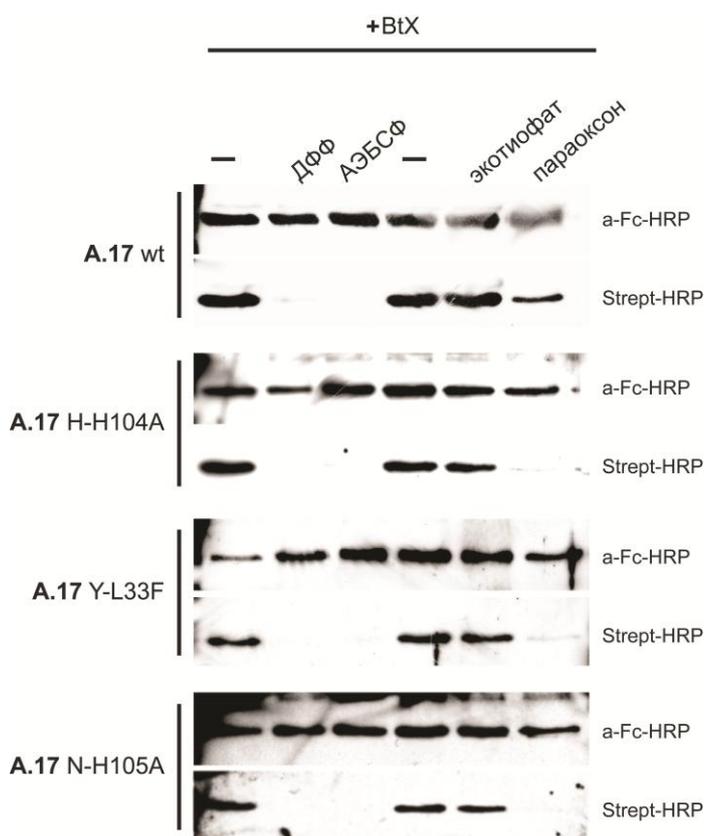


Рис.9. Вестерн блот анализ ингибирования связывания полноразмерного антитела **A.17** и его мутантов с биотинилированным фосфонатом X необратимыми ингибиторами. Во всех случаях концентрация активных центров антител составляла 1 мкМ, концентрация Bt-X 100 мкМ, концентрация ингибиторов 1 мМ, реакцию проводили в течение часа при 37°C, объем реакционной смеси 20 мкл. Прединкубация осуществлялась при 37°C. Время прединкубации составляло 1 час для всех ингибиторов, кроме экотиофата и параоксона. Для последних время прединкубации составляло 12 часов. Визуализацию ковалентного аддукта с Bt-X осуществляли окраской стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена. Концентрацию антител нормировали по сравнительной окраске антителами, специфичными к Fc фрагменту тяжелой цепи антитела человека, на той же мембране.

Таблица 2. Кинетические параметры реакции **A.17**, его мутантов и BChE с фосфонатом X (по схеме Китца-Вилсона).

Абзим/фермент	k_2 , мин ⁻¹	$K_{дис}$, мкМ	$k_2/K_{дис}$, мин М ⁻¹ × 10 ⁻⁴
A.17 wt	0.25 ± 0.02	6.2 ± 0.4	4.0 ± 0.6
A.17 Y-L37F	Полностью неактивен		
A.17 H-H104A	0.14 ± 0.01	8.5 ± 2.5	1.6 ± 0.6
A.17 N-H105A	0.32 ± 0.01	7.7 ± 1.8	4.2 ± 1.1
BChE*	0.066 ± 0.006	24 ± 6	0.3 ± 0.1

*Данные, полученные для BChE согласуются с ранее опубликованными (Tramontano A et al. Appl Biochem Biotechnol. 2000).

Как отмечалось ранее, в стабилизации остатка фосфоната участвует основная цепь 105 аминокислотного остатка тяжелой цепи. При замене его боковой цепи на Ala $K_{дис}$ практически не изменилась, в то время как константа k_2 возросла по сравнению с диким типом. Анализ структуры показал, что в немодифицированном активном центре боковая цепь Asp-H105 сетью водородных связей взаимодействует с реакционным Тур-

L37. Разрыв этого взаимодействия должен облегчить перестановки, необходимые для позиционирования субстрата в активном центре абзима и формирования ковалентного комплекса. В активном центре мутантного **A.17N-H105A** такая сеть контактов отсутствует. Кроме того, замена боковой цепи на метильную должна стерически облегчить перестройки, необходимые для формирования контакта основной цепи с тропиольным кольцом фосфоната.

Эффективность модификации **A.17** фосфонатом X на порядок выше таковой для VChE и сравнима с тем же параметром для других сериновых гидролаз. Этот факт весьма примечателен, учитывая примитивность устройства активного центра искусственного фермента в сравнении с каталитическим аппаратом сериновых гидролаз.

Анализируя данные структуры Fab **A.17**, можно предположить, что активный центр этого каталитического антитела должен обладать значительной степенью подвижности. Одним из подходов к изучению конформационных изменений при взаимодействии белковых молекул с лигандами различной природы является измерение термодинамических характеристик исследуемого взаимодействия методом изотермальной микрокалориметрии (метод ИТС – Isothermal Titration Calorimetry). Измерения производились В.Миткевичем в институте молекулярной биологии им. Энгельгарта РАН, Москва на приборе MicroCal iTC₂₀₀ (MicroCal, Northampton, MA) как описано (Mitkevich et al. Nucleic Acids Res. 2006).

Нами была изучена термодинамика взаимодействия антитела **A.17**, двух его мутантов и VChE с фосфонатом X. Реальная (для **A.17 Y-L37F**) и наблюдаемые (для всех прочих белков) $K_{Дис}$, а также стехиометрия взаимодействия и изменение энтальпии системы были установлены методом нелинейной регрессии. Экспериментальные данные наилучшим образом описываются моделью «один лиганд – один лиганд-связывающий центр». Расчеты производились с учетом того, что за время проведения эксперимента фосфонилирование проходит количественно. Термодинамические параметры взаимодействия **A.17** фосфонатом X представлены в таблице 3.

Из приведенных данных видно, что реакция модификации антитела **A.17** фосфонатом X является термодинамически выгодной. Полученные значения термодинамических параметров сопоставимы с соответствующими значениями, полученными методом ИТС для связывания других антител с гаптенами. Кроме того, порядок величин совпадает с кинетически рассчитанными значениями.

Таблица 3. Термодинамические параметры взаимодействия антитела **A.17**, его мутантов и VChE с фосфонатом X, установленные методом ИТС.

Абзим/фермент	T, °C	$K_{\text{дис}}^{\text{D}}$, мкМ	ΔH^{E} , ккал/моль	$T\Delta S^{\text{D}}$, ккал/моль	ΔG^{E} , ккал/моль
A.17 wt	10	2.9	-0.91	6.26	-7.17
	15	3.5	-1.18	6.02	-7.20
	20	2.8	-1.45	6.00	-7.45
	25	2.3	-1.89	5.78	-7.67
	37	1.7	-2.78	5.43	-8.21
A.17 Y-L37F	10	1.4	-1.49	6.08	-7.57
	15	3.2	-1.37	5.88	-7.25
	25	1.0	-1.50	6.65	-8.15
	37	0.72	-1.35	7.28	-8.63
A.17 H-H104A	25	3.8	-3.6	3.72	-7.32
VChE	15	7.9	-2.40	4.29	-6.69
	37	6.1	-4.35	2.93	-7.28

^a Все измерения производились три-четыре раза в буфере PBS, pH 7.4; ^b $K_{\text{дис}}$ – константа диссоциации для комплекса **A.17**Y-L37F с фосфонатом X и кажущаяся $K_{\text{дис}}$ для комплекса других белков с фосфонатом; ^c ΔH – изменение энтальпии; стандартное отклонение не превышало $\pm 15\%$; ^d $T\Delta S$ – изменение энтропии; рассчитано из уравнения $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$; ^e ΔG – изменение свободной энергии; рассчитано из уравнения $\Delta G = -RT \ln K_a$.

Сравнение данных, полученных для полностью неактивного мутанта **A.17**Y-L37F, с результатами для антитела дикого типа и VChE, обнаруживает сходство термодинамических параметров взаимодействия названных белков с фосфонатом X. В связи с этим можно предположить, что вклад ковалентной стадии взаимодействия, отсутствующей в случае **A.17**Y-L37F, в интегральную величину изменения энтальпии невелик. Очень малое изменение энтальпии системы при фосфонилировании может объясняться тем, что энергия, необходимая для разрушения связи P-OAr, компенсируется энергией, высвобождающейся при образовании сходной по природе связи с остатком тирозина (серина 198 в случае VChE). При реакции модификации антитела **A.17** фосфонатом вклад в изменение энергии системы так же вносят нековалентная стабилизация субстрата и энергия отхода уходящей группы. Последней составляющей можно пренебречь как незначительной, что было установлено в контрольных экспериментах измерения термодинамики связывания **A.17** и его фосфонилированного фосфонатом X производного с *n*-нитрофенолом. Таким образом, можно заключить, что наблюдаемые изменения термодинамических параметров системы относятся в основном к нековалентной стадии взаимодействия абзим-фосфонат и отражают конформационные изменения абзима при

первичном связывании с молекулой фосфоната, поддерживая гипотезу использования антителом **A.17** механизма индуцированного соответствия.

Снижение температуры измерения от 37 до 10°C приводит к уменьшению величины изменения энтальпии реакции модификации **A.17** фосфонатом X в три раза. На основании анализа температурной зависимости ΔH было рассчитано изменение теплоемкости ΔC_p , равное $-70 \text{ кал} \cdot \text{моль}^{-1} \text{ K}^{-1}$. По изменению теплоемкости можно рассчитать изменение площади белковой поверхности, доступной растворителю, используя эмпирическую формулу:

$$\Delta C_p = 0.27\Delta A_{\text{ар}} + 0.4\Delta A_{\text{неар}},$$

где $\Delta A_{\text{ар}}$ и $\Delta A_{\text{неар}}$ – площади закрытых от растворителя гидрофобных и гидрофильных участков белковой молекулы, измеренные в Å^2 .

Полученное по формуле значение находится в пределах (175 – 260) Å^2 и совпадает с величиной, рассчитанной по кристаллической структуре (240 Å^2).

В отличие от абзима дикого типа, изменение энтальпии при взаимодействии полностью неактивного мутанта **A.17Y-L37F** с фосфонатом X не зависит от температуры. Близкое к нулю значение ΔC_p для реакции модификации мутантного абзима свидетельствует о несущественных изменениях площади поверхности антитела, доступной растворителю, что полностью согласуется с данными об отсутствии ковалентного взаимодействия **A.17Y-L37F** с фосфонатом X.

Для мутанта **A.17H-N104A** наблюдаемая методом ИТС $K_{\text{дис}}$ при взаимодействии с фосфонатом X оказалась близкой по значению к той же величине для белка дикого типа (кинетические $K_{\text{дис}}$ также совпадают), однако, вклад ΔH отличается. В случае мутантного антитела реакция модификации более энтальпийно выгодная. Как отмечалось ранее, боковая цепь H-N104 стабилизирована связью с D-N106 в немодифицированном активном центре и с T-N100 в фосфонилированном **A.17** посредством H-связей. При замене гистидина на аланин энергетический вклад этих связей отсутствует, что приводит к наблюдаемому эффекту.

Взаимодействие антитела A.17 с пестицидом параоксон

Как отмечалось ранее, модификация антитела **A.17** фосфонатом X ингибируется в присутствии параоксона. Изучение взаимодействия с параоксоном представляется интересным, поскольку он является распространенным пестицидом и существует проблема профилактики отравлений этим соединением.

Наличие *n*-нитрофенольной уходящей группы в молекуле субстрата позволяет оценить кинетику взаимодействия антитела с параоксоном спектрофотометрически. Было показано, что скорость реакции линейно зависит от количества добавленного аб-

зима (Рис. 10). Скорость реакция значительно ниже, чем в случае фосфоната X. За время наблюдения (трое суток) не происходит выхода экспериментальной кривой на плато, и продукт образуется в количестве, превышающем число активных центров антитела, оттитрованных в реакции с фосфонатом X. Кроме того, скорость реакции антитела **A.17** с параоксоном линейно возрастает с увеличением концентрации добавленного гидроксилamina (Рис. 11). Гидроксиламин, обладая большей нуклеофильностью, конкурирует с водой на стадии дефосфорилирования. Приведенные факты свидетельствуют о том, что реакция **A.17** с параоксоном является каталитической и проходит через стадию образования ковалентного интермедиата.

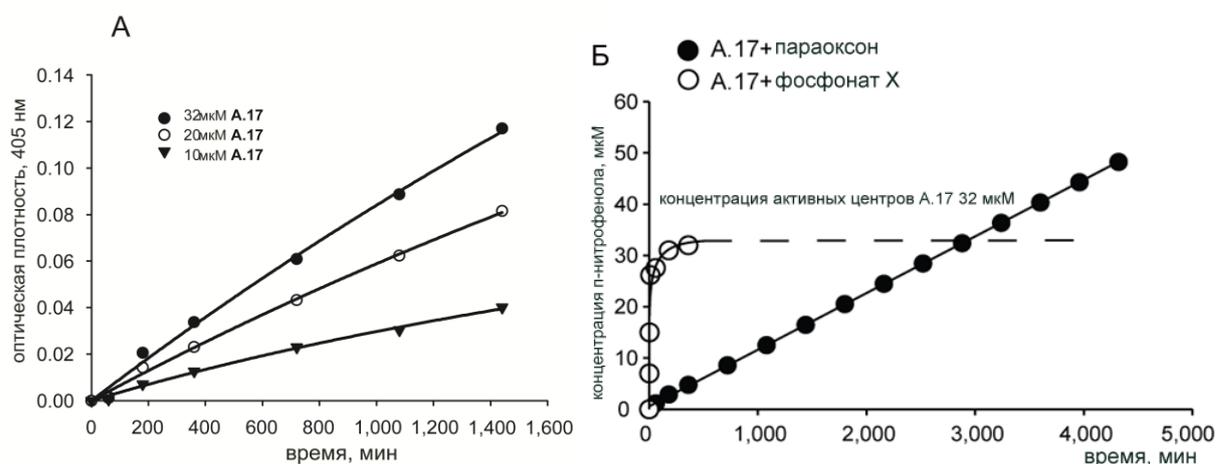


Рис.10. Кинетические кривые взаимодействия параоксона и фосфоната X антителом **A.17**. (А) Различные концентрации антитела инкубировали с 200 мкМ параоксона. (Б) Одинаковая концентрация антитела инкубировалась с 200 мкМ параоксона или фосфоната X. Все реакции проводили в 0.1 М фосфатном буфере, рН 7.4, содержащем 0,02% азид натрия, при 37°С. За ходом реакций следили спектрофотометрически по высвобождению *л*-нитрофенола. Каждая кривая построена за вычетом фонового распада субстрата в растворе того же состава, но без добавления антитела. Количество *л*-нитрофенола, образующегося при инкубации антитела **A.17** с параоксоном, превышает число активных центров антитела, оттитрованных в реакции с фосфонатом X.

Общую схему катализа для абзима можно представить следующим образом

1. $K_{\text{Дис}}$
2. k_2
3. k_3 (Nu)



где Ат - антитело, ОРХ - фосфорорганическая молекула, X - уходящая группа, Nu – нуклеофил.

Элементарные константы взаимодействия антитела **A.17** с параоксоном приведены на Рис. 11. Таким образом, стадия дефосфорилирования является скоростью-лимитирующей для всего процесса. Следовательно, ковалентный интермедиат должен накапливаться в процессе реакции. Присутствие ковалентного интермедиата, доказы-

вающее, что гидролиз параоксона антителом **A.17** проходит по механизму ковалентного катализа, было подтверждено методом масс-спектрометрии (Рис.12). После инкубации антитела с параоксоном в течение 16 часов на масс-спектре полноразмерного антитела появлялся пик, разница массы которого с массой пика немодифицированного абзима составляет 135Да, что соответствует весу остатка параоксона. Интересно отметить, что дефосфонирование антитела, модифицированного фосфонатом X, при инкубации с гидроксиламином в тех же условиях не происходит.

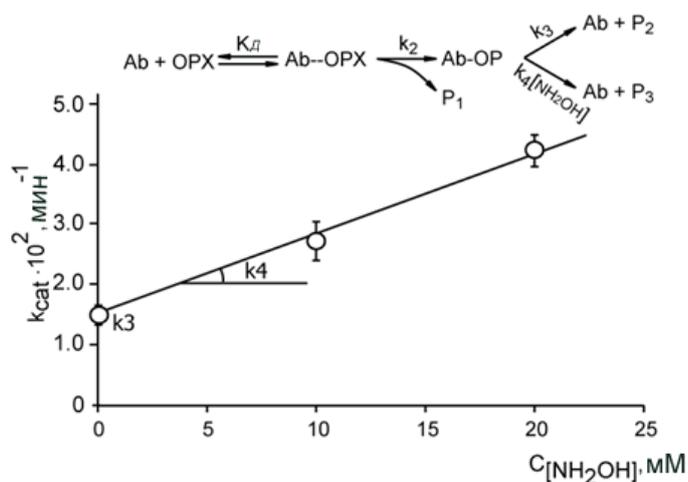


Рис.11. Определение кинетических констант гидролиза пестицида параоксон антителом **A.17** в присутствии гидроксиламина.

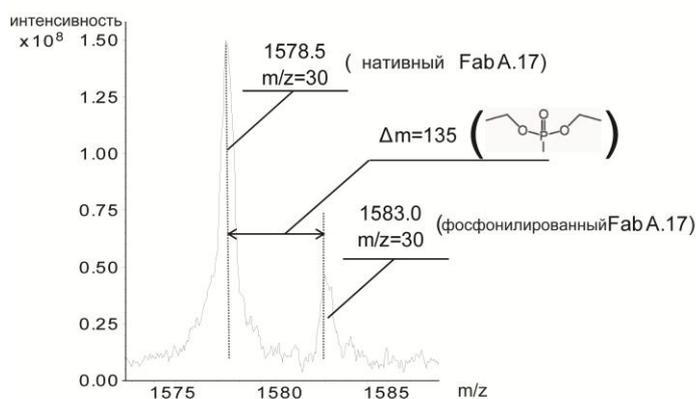


Рис. 12. ESI-FTICR-MS масс-спектр полноразмерного антитела **A.17**, модифицированного параоксоном. Молекулярная масса первого пика соответствуют нативному полноразмерному антителу. Второй пик появляется после инкубации антитела с параоксоном в течение 16 часов, разница его массы с массой пика нативного антитела составляет 135 Да, что соответствует весу остатка параоксона.

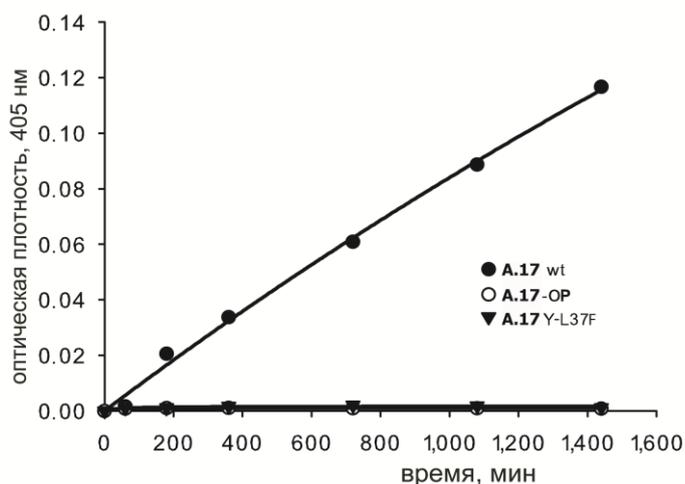


Рис.13. Кинетические кривые гидролиза параоксона антителом **A.17**wt, его ковалентным аддуктом с остатком фосфоната X и неактивным мутантом **A.17**Y-L37F. 30 мкМ антитела инкубировали с 200 мкМ параоксона в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 0,02% азид натрия, при 37°C. За ходом реакции во всех случаях следили спектрофотометрически по высвобождению п-нитрофенола. Каждая кривая построена за вычетом фонового распада субстрата в растворе того же состава, но без добавления антитела.

Так же не удалось реактивировать фосфонилированное фосфонатом антитело в присутствии классического реактиватора холин эстераз моноизонитрозоацетона (MINA).

Несмотря на свою химическую схожесть, эти два фосфоэфира обладают различной стабильностью Р-О связи, причем активный центр **A.17** способствует гидролизу только Тур-ОР производного параоксона. Антитело, нацело модифицированное фосфонатом X, и неактивный по отношению к фосфонату мутант **A.17Y-L37F** не взаимодействуют с параоксонам (Рис.13), указывая на участие в катализе гидролиза параоксона того же реакционного остатка, что и в случае фосфонилирования фосфонатом.

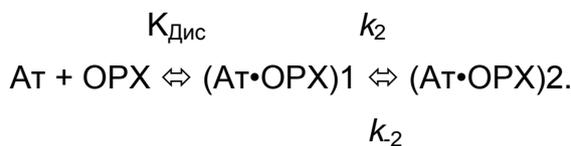
Таким образом, каталитическое антитело, полученное отбором по способности ковалентно связываться с одним фосфорорганическим веществом, фосфонатом X, демонстрирует способность к каталитическому гидролизу другого, близкого к нему соединения, параоксона.

Детализация механизма катализа абзима A.17

Основываясь на данных структурного анализа и изучении термодинамики реакции, можно предположить, что каталитическое антитело **A.17** преимущественно использует принцип индуцированного соответствия при взаимодействии с фосфонатом X и другими фосфорорганическими веществами. В качестве альтернативной модели взаимодействия для большинства изученных каталитических антител доказан механизм выбора одного из предсуществующих конформеров. Современный взгляд на проблему описания механизма взаимодействия белок-лиганд сводится к тому, что для подавляющего большинства белков одновременно осуществляются обе модели, но с различными вкладами.

Для детализации каталитического механизма антитела **A.17**, наряду со стационарной, была изучена предстационарная кинетика его взаимодействия с фосфонатом X. Измерения проводились Н. Кузнецовым в Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирской отделения РАН, Новосибирск на приборе SX.18MV (Applied Photophysics, Великобритания). Для детекции элементарных стадий взаимодействия абзима с субстратами использовали метод «остановленного потока». За реакцией следили по изменению внутренней флуоресценции триптофана в молекуле абзима при длинах волн $\lambda_{ex}280$ нм и $\lambda_{em}330$ нм. Количественную обработку результатов кинетических экспериментов осуществляли с помощью пакета программ DynaFit software (BioKin, США). Полученные данные представлены на рисунке 14. Во всех расчетах фосфонат X рассматривался как полностью P(R) энантиомер.

Из представленных экспериментальных данных видно, что при взаимодействии антитело – фосфонат X наблюдались значительные изменения внутренней флуоресценции абзима, которые могут быть оценены количественно как функция от времени (Рис. 14Б, В). Каждая экспериментальная кривая была независимо аппроксимирована к виду кривой с одной экспонентой для получения значения наблюдаемой константы скорости $k_{\text{набл}}$. Зависимость наблюдаемой константы скорости $k_{\text{набл}}$ имела гиперболический вид и описывалась уравнением (1) соответствующим механизму индуцированного соответствия:



$$k_{\text{набл}} = k_{-2} + K_{\text{дис}} * [\text{OPX}] * k_2 / (K_{\text{дис}} * [\text{OPX}] + 1), \quad \text{уравнение 1}$$

где OPX-лиганд.

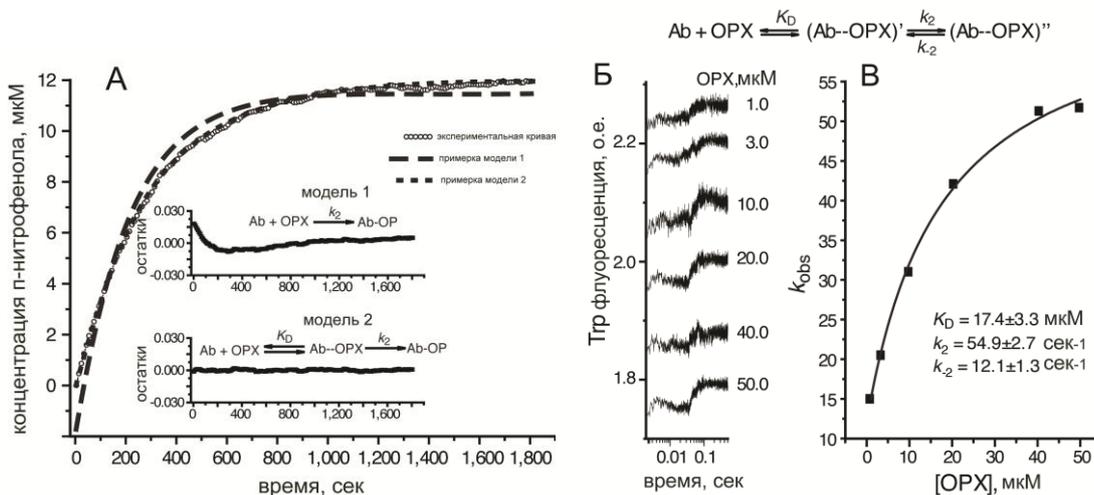


Рис.14. Описание механизма модификации антитела **A.17** фосфонатом X. А - экспериментальные и расчетные кривые взаимодействия **A.17** и фосфоната X. Качество выбранной модели оценивалось статистически (врезки). Б – экспериментальная кривая изменения триптофановой флуоресценции антитела **A.17** в зависимости от концентрации добавленного фосфоната X, полученная в условиях предстационарной кинетики. В – зависимость наблюдаемой константы взаимодействия **A.17** с фосфонатом X k_{obs} от концентрации субстрата и элементарные константы взаимодействия.

Представленная схема включает стадии связывания субстрата и перестройку комплекса абзим/субстрат. Стадии образования ковалентного комплекса и отхода *p*-нитрофенола по изменению флуоресценции триптофана разрешить не удалось. Для подтверждения правомерности выбранного механизма модель взаимодействия абзима с

субстратом, представленная на схеме, была подвергнута статистической проверке, выявившей, что представленная модель действительно содержит минимально возможное число стадий, и представленные кинетические данные не могут быть описаны более простой схемой.

Таким образом, анализ предстационарной кинетики взаимодействия **A.17** с фосфонатом X наряду с данными структурного анализа и изучением термодинамики процесса указывает на реализацию антителом механизма индуцированного соответствия. Тем не менее, полученные результаты не исключают возможности осуществления модификации абзима по альтернативному пути взаимодействия.

Пример каталитического антитела **A.17** раскрывает альтернативный способ решения проблемы реорганизации белковой структуры для выполнения каталитической функции. В его структуре повышенная нуклеофильность остатка Y-L37 обеспечивается скрытым от растворителя положением в глубоком активном центре. Наличие длинной подвижной петли HCDR3 **A.17** обеспечивает эффективные перестройки в полости активного центра в непосредственной близости от боковой цепи реакционного тирозина. Неупорядоченная структура этой петли, образуя своего рода гибкую стену кармана активного центра, облегчает миграцию лиганда в нижнюю камеру.

Уникальные свойства примитивного активного центра антитела **A.17**, способного к катализу, являются моделью сочетания белковой динамики и реактивности. Сама по себе иммуноглобулиновая структура абзима накладывает строгие границы подвижности его структуры. Однако принцип получения искусственного фермента может быть применен сходным образом к любой другой белковой матрице.

Полученные результаты могут быть использованы как основа для рационального дизайна с целью улучшения каталитической эффективности имеющейся активности **A.17** или при получении новых биокатализаторов. Полученные данные могут иметь биотехнологическое значение.

Выводы

1. На основе последовательностей переменных доменов одноцепочечного антитела **A.17** создано и проэкспрессировано в клетках линии CHO-K1 полноразмерное антитело. Показано, что полученное полноразмерное антитело способно ковалентно связываться с *n*-нитрофенил 8-метил-8-азабицикло[3.2.1]октан фенилфосфонатом (X) и гидролизовать пестицид параоксон.
2. Произведен структурный анализ Fab фрагмента каталитического антитела **A.17** и его ковалентного аддукта с остатком фосфоната X. Основываясь на структурных данных, был осуществлен мутагенез ряда аминокислотных остатков антитела с целью выявления их роли в каталитической активности абзима. Показано, что замены аминокислотных остатков, участвующих в стабилизации CDR-H3, влияют на скорость реакции фосфонирования антитела фосфонатом X и слабо сказываются на стадии связывания субстрата.
3. По совокупности данных структурного анализа, изучения термодинамики и быстрой кинетики показано, что взаимодействие **A.17** с фосфонатом X осуществляется по механизму индуцированного соответствия.
4. Установлено, что гидролиз пестицида параоксон антителом **A.17** проходит через стадию образования фосфотирозинового ковалентного интермедиата с аминокислотным остатком Y-L37. Показано, что стадия дефосфорилирования является скоростью-лимитирующей.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. Smirnov I* , Carletti E*, **Kurkova I***, Nachon F, Nicolet Y, Mitkevich V , Débat H, A Valle B, Belogurov A, Kuznetsov N, Reshetnyak A, Masson P, Tonevitsky A, Ponomarenko N, Makarov A, Friboulet A, Tramontano A, Gabibov A. Reactibodies generated by kinetic selection couple chemical reactivity with favorable protein dynamics. Proc Natl Acad Sci U S A. Опубликовано онлайн Сентябрь 2011.

*авторы внесли равный вклад в работу

2. Захаров А.В., Смирнов И.В., Серебрякова М.В., Дронина М.А., Казначеева А.В., **Куркова И.Н.**, Белогуров А.А., Фрибуле А., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г., Бобик Т.В. Экспрессия каталитических антител в эукариотических системах. Молекулярная биология (Моск), том 45, № 1, Январь-Февраль 2011, С. 86-95.
3. **Куркова И.Н.**, Решетняк А.В., Дурова О.М., Кнорре В.Д., Трамонтано А., Фрибуле А., Пономаренко Н.А., член-корр. РАН Габибов А.Г., Смирнов И.В.. Антитела-антидоты для нейтрализации фосфорорганических соединений. Доклады Академии Наук, том 425, № 4, Апрель 2009, С. 549-552.

Опубликованные материалы конференций и доклады

1. **Kurkova I**, Carletti E, Smirnov I, Friboulet A, Tramontano A, Gabibov A. A17 catalytic antibody converting P-O bonds. III International meeting "Early events in human pathologies" 29 May-1 June 2010, Barbizone, France
2. Smirnov IV, **Kurkova IN**, Carletti E, Masson P, Belogurov AA Jr, Ponomarenko NA, Tramontano A, Friboulet A, Gabibov AG. Promiscuity of binding/catalysis of antibodies - antidotes toward chemical weapons. 35th FEBS Congress June 26–July 1, 2010, Göteborg, Sweden
3. Smirnov I.V., Ilushin D.G., Durova O.M., **Kurkova I.N.**, Masson P., Ponomarenko N.A. and Gabibov A.G. Biological scavengers of organophosphorous poisons. 21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, July 30-August 7, 2009, Shanghai, China.

Методические аспекты работы рассмотрены в статьях

1. Belogurov AA, **Kurkova IN**, Friboulet A, Thomas D, Misikov VK, Zakharova MY, Suchkov SV, Kotov SV, Alehin AI, .Avalle B, Morse HC 3d, Gabibov AG, Ponomarenko NA

Recognition and degradation of myelin basic protein peptides by serum autoantibodies: novel biomarker for multiple sclerosis. *J Immunol.* 2008 Jan 15;180(2):1258-67.

2. Белогуров АА, **Куркова ИН**, Мисиков ВК, Сучков СВ, Телегин ГБ, Алехин АИ, Гончаров НГ, Кнорре ВД, Габибов АГ, Пономаренко НА. Субстратная специфичность каталитических аутоантител при нейродегенеративных процессах. in neurodegenerative processes. Доклады Академии Наук, том 425, № 2, Март 2009, С. 251-255.
3. Ponomarenko NA, Durova OM, Vorobiev II, Belogurov AA, **Kurkova IN**, Petrenko AG, Telegin GB, Suchkov SV, Kiselev SL, Lagarkova MA, Govorun VM, Serebryakova MV, Avalle B, Tornatore P, Karavanov A, Morse HC 3d, Thomas D, Friboulet A, Gabibov AG. Autoantibodies to myelin basic protein catalyze site-specific degradation of their antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 10;103(2):281-6.