

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

На правах рукописи

Степанова Анастасия Валерьевна

НАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ  
АНТИТЕЛ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КОМБИНАТОРНЫХ БИБЛИОТЕК ГЕНОВ  
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ.

Специальность 03.01.03 – «молекулярная биология»

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

**Научные руководители:** Доктор биологических наук  
**Пономаренко Наталья Александровна**

Кандидат химических наук  
**Смирнов Иван Витальевич**

**Официальные оппоненты:** Доктор физико-математических наук  
**Шайтан Константин Вольдемарович**,  
профессор кафедры биоинженерии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Доктор биологических наук  
**Тиллиб Сергей Владимирович**,  
заведующий лабораторией молекулярных биотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Защита состоится «15» марта 2017 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан \_\_ 2017 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук

 Олейников В. А.

## I. ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

### Актуальность проблемы.

Появление современных способов создания и отбора комбинаторных библиотек позволило осуществить прорыв в современном дизайне белковых структур, в том числе лекарственных соединений. Нередко обычный размер библиотеки на много порядков больше, чем количество вариантов, которые могут быть подвергнуты скринингу. В этой связи разработка новых методов высокоэффективного отбора препаратов с интересующей функциональной активностью представляется актуальной задачей. Помимо методов *in vitro* и *in vivo* селекции весьма активно развиваются и подходы для проведения отбора *in silico*. Появление современных методов компьютерного анализа с применением вычислений на суперкомпьютерах сделало возможным моделирование детальных молекулярных механизмов взаимодействия белок-лиганд. Более того, с помощью гибридных молекулярно-механических/квантово-механических исследований можно не только изучать структуры исходных соединений и продуктов реакции, но и следить за динамикой происходящих взаимодействий. Детальное понимание механизма реакции позволяет определить наиболее выгодные позиции для проведения мутагенеза, а также тип аминокислотного остатка, который необходимо ввести в активный центр для улучшения эффективности катализа. Вычислительные методы дают принципиально новые возможности для создания широкого спектра белков с новыми функциональными активностями. Прорывом в создании биокатализаторов *de novo* является дизайн белков, катализирующих реакции, для которых не существует природных ферментов.

Востребованность антидотов к фосфорорганическим токсинам (ФОТ) обусловлена все возрастающим бесконтрольным применением пестицидов, опасностью техногенных катастроф и достаточно высокой вероятностью террористических атак. До 10% всех случаев бытовых отравлений приходится на долю отравлений инсектицидами, противомоскитными препаратами, которые так же относятся в ФОТ. За последние 60 лет исследований методы медикаментозного лечения отравлений фосфорорганическими токсинами активно развивались. Тем не

менее, они все еще несовершенны, так как позволяют избежать смерти, но не потери трудоспособности и необратимых поражений головного мозга. Альтернативным подходом в терапии и профилактике отравлений ФОТ является создание биологических антидотов, в частности на основе суперсемейства иммуноглобулинов.

Таким образом, дальнейшее совершенствование существующих подходов или же разработка новых перспективных методов поиска белков с улучшенными свойствами, в частности разработка эффективных биокатализаторов фосфорорганических токсинов, является задачей первостепенной важности.

### **Цель работы и основные задачи исследования.**

Цель данной работы заключалась в разработке алгоритма направленной эволюции антитела A17 с доказанной каталитической активностью по отношению к фосфорорганическому пестициду параоксону, включающей в себя квантово-механический/молекулярно-механический анализ реакции взаимодействия антитела с субстратом, создание виртуальной библиотеки мутантов биокатализатора, ее скрининг *in silico*, а также экспериментальное подтверждение расчётных данных.

Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Изучение механизма реакции каталитического антитела A17 с фосфорорганическим пестицидом параоксон с помощью квантово-механического/молекулярно-механического анализа
2. Создание виртуальной библиотеки мутантов, обладающих лучшими характеристиками взаимодействия с параоксоном. Скрининг библиотеки с последующим предсказанием наиболее эффективных биокатализаторов.
3. Создание панели предсказанных мутантов методами генетической инженерии. Сравнительный анализ функциональной активности созданных мутантов и выбор наилучшего.
4. Детализация особенностей каталитического механизма лучшего мутанта с помощью кинетических методов и методов рентгеноструктурного анализа.

### **Научная новизна и практическая значимость работы.**

В настоящей работе был предложен алгоритм, в котором вместо традиционного скрининга применяется виртуальный, при этом используются методы квантово-

механических расчетов. позволяющие заметно сократить временные затраты экспериментатора. С помощью квантово-механических/молекулярно-механических методов был выяснен детальный механизм реакции каталитического антитела A17 с пестицидом параоксон, что позволило определить позицию и тип аминокислотного остатка для проведения мутагенеза. С помощью предложенного алгоритма было предсказано 9 мутантов, обладающих лучшими характеристиками взаимодействия с параоксоном. Для одного из мутантов – L-S35R – были предсказаны максимальное увеличение вероятности формирования водородной связи между каталитическим остатком и параоксоном по сравнению с диким типом, а также наименьшее значение коэффициента диффузии, что отражает лучшее позиционирование параоксона в активном центре мутанта. Предсказанные мутанты были проэкспрессированы, очищены и охарактеризованы. Было показано, что мутант L-S35R проявляет 170-кратное увеличение эффективности взаимодействия по сравнению с антителом дикого типа. С помощью рентгеноструктурного анализа мутанта L-S35R и его ковалентного аддукта с остатком параоксона было подтверждено, что введение остатка L-R35 улучшает позиционирование за счет образования водородной связи с фосфорильным атомом кислорода параоксона. Также было продемонстрировано, что полученная кристаллическая структура активного центра модифицированного антитела L-S35R совпадает с теоретически предсказанной, несмотря на то, что все расчеты базировались на структуре антитела дикого типа.

Таким образом, в работе был разработан новый КМ/ММ алгоритм и впервые был использован для направленного улучшения свойств каталитических антител. Полученные результаты могут быть использованы для создания новых биокатализаторов и биологических антидотов на основе антител.

### **Публикация и апробация работы.**

По теме работы опубликовано три статьи в журналах, входящих в список ВАК. Результаты работы были представлены на трех международных и трех всероссийских конференциях.

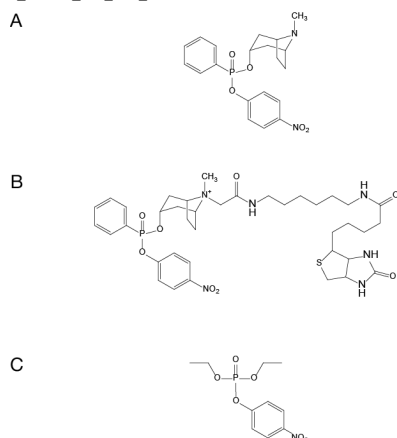
### **Структура и объем работы.**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 111 страницах и содержит 37 рисунков и 7 таблиц.

## II. СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

### Детализация механизма реакции антитела A17 с параоксоном.

Ранее в лаборатории биокатализа ИБХ РАН в результате скрининга полусинтетической библиотеки варьируемых фрагментов генов иммуноглобулинов человека с использованием *p*-нитрофенил 8-метил-8-азабицикло[3.2.1]октан-9-ил фосфоната (рис. 1 А, В), было отобрано рекомбинантное одноцепочечное антитело A17, ковалентно взаимодействующее с необратимыми ингибиторами сериновых гидролаз. Поскольку данные ингибиторы по механизму действия являются аналогами фосфорорганических токсинов (ФОТ), было сделано предположение, что антитело A17 будет способно с ними взаимодействовать. Изучение функциональной активности антитела A17 позволило выявить его способность ускорять гидролиз фосфорорганического пестицида параоксон (рис. 1, С).



**Рис. 1. Химические структуры фосфорорганических соединений. (А) *p*-нитрофенил 8-метил-8-азабицикло[3.2.1]октил-9-ил фосфонат (фосфонат X) и его биотинилированное производное (В); (С) О,О-диэтил О-4-нитрофенил фосфат (параоксон).**

Показано, что гидролиз пестицида параоксон антителом A17 проходит через стадию образования ковалентного интермедиата с нуклеофильным остатком тирозина активного центра антитела. Для определения особенностей механизма реакции и структурных характеристик антитело A17 было получено в виде полноразмерного антитела с использованием системы экспрессии в клетках CHO. Антитело A17 катализировало реакцию гидролиза параоксона в соответствии со следующей кинетической схемой:



**Схема 1. Схема взаимодействия антитела A17 с пестицидом параоксон. OP-X – лиганд, X – уходящая группа, Tyr37 – нуклеофильный остаток.**

В данной работе нами была поставлена задача «улучшения» эффективности катализа первой стадии реакции (стадии ковалентного связывания), иными словами мы предприняли попытку «ускорить реакцию захвата» остатка молекулы параоксона остатком L-Y37 антитела-акцептора.

Для решения этой задачи мы прибегли к использованию набора расчетных методов для определения наиболее вероятного механизма реакции гидролиза параоксона и выяснения возможных позиций для введения мутаций молекулы A17 для последующего «перепрограммирования» реакции. Таким образом, в данной работе мы рассматриваем антитело A17 в качестве исходной матрицы для последующей направленной модификации структуры с целью получения потенциального антидота к ФОТ. На начальном этапе нам было необходимо описать детальный механизм полной реакции (см. схему 1) и задать «вектор эволюции» выбранной исходной матрицы.

На первой стадии была изучена ориентация параоксона внутри активного центра антитела A17 в предреакционном комплексе. Для этого был использован метод молекулярного докинга – метод, который позволяет предсказать положение одной молекулы по отношению к другой для определения наиболее выгодной ориентации, приводящей к образованию устойчивого комплекса. В следствии того, что стартовое состояние реагирующих молекул не задано, могут наблюдаться девиации в результатах независимых раундов расчетов. Что бы этого избежать, методом молекулярного докинга был проведен кластерный анализ 2000 связывающих состояний и была получена кривая насыщения популяции лучших из них. Положения параоксона, в котором возможна атака атома фосфора тирозином, наблюдались примерно в 5% случаев.

Методом докинга были найдены кластеры возможных положений параоксона, обладающие наименьшей энергией взаимодействия с антителом A17. Кластеры с энергией -6.3 до -5,8 ккал/моль показали устойчивое расположение фосфатной группы, в то время как кластеры с энергией  $\geq -5,7$  ккал/моль показали неупорядоченную ориентацию фосфата. Наши расчеты были направлены на выяснение структуры предреакционного комплекса и базировались на известных нам данных рентгеноструктурного анализа. Ни в одном из кластеров не наблюдалось нахождение нуклеофильного кислорода остатка L-Y37, расположенного в позиции, необходимой для in-line атаки атома фосфора параоксона. Мы провели дополнительный расчет возможных конформаций параоксона и нашли один кластер, в котором возможно позиционирование субстрата в предреакционной ориентации

позволяет осуществлять in-line атаку нуклеофильным тирозином. Проведенные расчеты показывают, что в данном состоянии происходит вращение одной Р-О и одной С-О связей относительно неподвижного нитробензольного кольца.

После того, как было определено положение субстрата в предреакционном комплексе, мы изучили механизм реакции взаимодействия антитела A17 с пестицидом параоксон. Поскольку изучаемая реакция – крайне редкое событие, для ускорения расчетов вместо классической квантово-механической/молекулярно-механической (КМ/ММ) динамики была использована метадинамика. При использовании метадинамики был выбран набор коллективных переменных, который приводил примерно к 50% вероятности образования переходного состояния. Использование метадинамики при гибридном КМ/ММ описании комплекса антитела с субстратом показало, что реакция протекает по классическому  $S_N2$  механизму (рис. 2). На первом этапе наблюдается предреакционный комплекс, определенный с помощью молекулярного докинга. Далее происходит сближение атома фосфора и L-Y37, и на расстоянии 2,2Å между кислородом тирозина и атомом фосфора параоксона (О-Р), протон с кислорода тирозина переносится на фосфорильный атом кислорода, что приводит к образованию раннего переходного состояния. За этим незамедлительно (в течение 5-20 фсек) следует атака кислорода тирозина на атом фосфора, что приводит к образованию связи (расстояние О-Р 1,9Å), в результате чего происходит образование классического переходного состояния - тригональной бипирамиды – «позднее переходное состояние». Реакция переноса протона протекает по 1w механизму: через четырехчленное кольцо напрямую с тирозина на фосфорильный кислород. Далее происходит перенос электронной плотности на уходящую группу, приводящий к образованию нитрофенолят-аниона. Перенос электронной плотности на протон фосфорильного кислорода приводит к образованию ковалентного производного и уходящей группы – *p*-нитрофенола.



**Рис. 2. Определенный с помощью КМ механизм реакции (описание в тексте).**

С помощью данных КМ метадинамики был построен четырехмерный график поверхности



свободной энергии образования ковалентного комплекса (рис. 3). График был построен как зависимость энергии реакции взаимодействия антитела A17 с параоксоном от трех коллективных переменных.

Исходя из метадинамики, каждая конформация обладала набором значений коллективных переменных. Были выбраны три интервала значений переменных, соответствующих стадиям реакции перехода от предреакционного комплекса к переходному состоянию. Для различных этапов реакции были определены и посчитаны конформации на основе коллективных значений переменных. За ходом реакции следили по изменению трех координат реакции – расстояний от протона до кислорода L-Tyr37 (Tyr-O...H), от протона до фосфорильного кислорода (P=O...H) и от кислорода уходящей группы до атома фосфора параоксона (P...O-PNP). Чтобы предотвратить диффузию параоксона от активного остатка L-Tyr37, расстояние между ними было ограничено 2,5Å, что приводило к образованию переходного состояния примерно в 50% случаев. На рисунке 3 представлены ключевые стадии реакции образования ковалентного комплекса для антитела дикого типа. Согласно предложенному выше механизму реакции, одной из ключевых стадий инициации процесса является перенос протона с L-Tyr37 на фосфорильный атом кислорода параоксона. На первом этапе (1) – стадии нековалентного связывания – наблюдаются незначительные колебания длины связей Tyr-O...H и P=O...H.

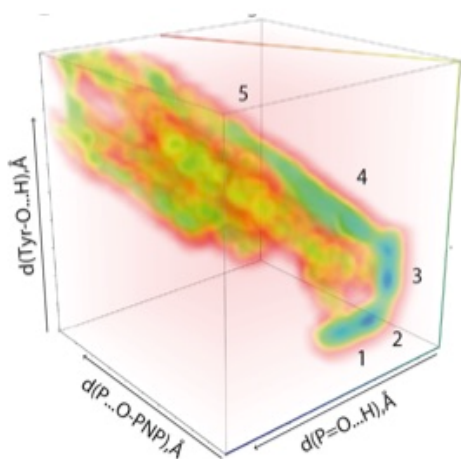


Рис. 3. 4D график, построенный исходя из данных изменения трех коллективных переменных – расстояний от протона до кислорода L-Tyr37 (Tyr-O...H), от протона до фосфорильного кислорода (P=O...H) и между кислородом уходящей группы и атомом фосфора параоксона (P...O-PNP) и изменения энергии (синий цвет соответствует низкой потенциальной энергии, красный – высокой). Цифрами отмечены стадии: (1) – стадия нековалентного связывания. (2) – стадия сближения фосфорильного атома кислорода субстрата с протоном L-Tyr37, перенос протона на фосфорильный атом кислорода и его удаление от L-Tyr37. (3) – атака кислорода L-Tyr37 на атом фосфора с образованием позднего переходного состояния –

тригональной бипирамиды. (4) – разрыв связи P...O-PNP с образованием метастабильного нитрофенолят-аниона, который получая протон превращается в п-нитрофенольную уходящую группу.

На следующей стадии происходит сближение фосфорильного атома кислорода субстрата с протоном L-Tyr37 и происходит перенос протона на фосфорильный атом кислорода и его удаление от L-Tyr37 (2) и почти одновременная атака кислорода L-

Tyr37 на атом фосфора с образованием позднего переходного состояния (3) – тригональной бипирамиды. Далее происходит разрыв связи P...O-PNP с образованием метастабильного нитрофенолят-аниона, который получая протон, превращается в *n*-нитрофенольную уходящую группу (4).

### Создание виртуальной библиотеки для *in silico* скрининга.

Для выполнения задачи по «перепрограммированию реакционного механизма» мы исходили из необходимости создания максимально широкой библиотеки потенциальных мутантов исходной белковой матрицы, а далее путем ряда логичных предположений попытались осуществить «сужение» репертуара. Для этих целей нами были использованы данные КМ/ММ расчетов. Для проведения данных расчетов, направленных на поиск лучших мутантов необходимо было создать и проскринировать виртуальную библиотеку мутантов, которая должна удовлетворять следующим условиям:

1. Механизм реакции должен остаться без изменений.
2. Позиционирование параоксона в предреакционном комплексе должно быть лучше, чем в случае антитела дикого типа.
3. Перенос протона от L-Tyr37 на фосфорильный кислород должен происходить эффективнее, чем в случае дикого типа.

Для определения аминокислот, входящих в виртуальную библиотеку, был произведен поиск остатков, находящихся в сфере с радиусом не более 3,2 Å, в центре которой находится параоксон (рис. 4, розовые, голубые и желтые сферы). Радиус сферы (3,2 Å) равен сумме длин бокового радикала аргинина и водородной связи. Аргинин был выбран в следствии того, что он является аминокислотой с самой длинной боковой цепью, что дает шанс максимальному количеству аминокислот войти в библиотеку. Поиск аминокислот, попадающих в сферу, дал 23 аминокислоты.

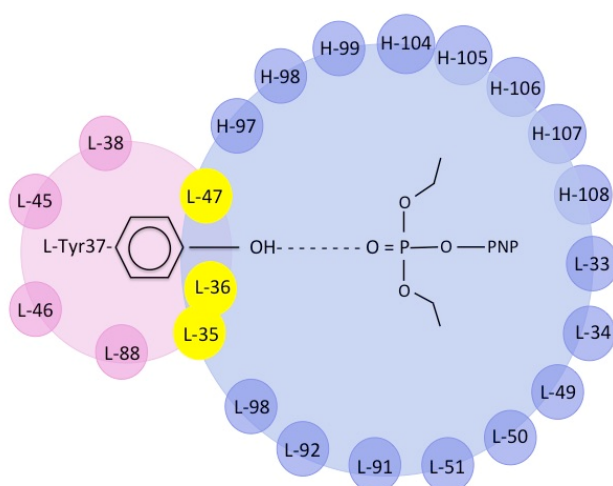


Рис. 4. Схематическое изображение активного центра антитела A17. Синими сферами отмечены аминокислотные остатки, которые теоретически могут образовывать водородные связи с параоксоном. Аминокислотные остатки, которые могут влиять на нуклеофильность тирозина отмечены розовыми сферами. Остатки, которые могут участвовать в обоих процессах отмечены желтыми сферами.

Общее число мутантов при замене 23 позиций на 20 аминокислот составляет  $20^{23}$ . По понятным причинам создание такой реальной библиотеки невозможно. Что бы уменьшить размер библиотеки, были наложены следующие условия: выбор мутантных аминокислот был ограничен до 11 полярных остатков, а число одновременных замен было снижено до четырех. Однако представительность библиотеки составила  $1,7 \cdot 10^9$ , что все еще велико для *in silico* скрининга.

Для уменьшения представительности были наложены следующие ограничения:

1. в качестве аминокислот-доноров водородной связи были выбраны Arg, His, Lys, Ser, Thr, Trp, Tyr. На данные аминокислоты были заменены те остатки, которые расположены вблизи параоксона и боковые группы которых ориентированы к нему – остатки 33, 34, 35, 36, 47, 49, 50, 51, 91, 92, 98 легкой цепи и остатки 97, 98, 99, 104, 105, 106, 107, 108 тяжелой цепи (рис. 4, синие и желтые сферы). Эти позиции при замене на указанные аминокислоты, выступающие донорами водородной связи, могут влиять на позиционирование параоксона внутри активного центра.
2. в качестве аминокислот, влияющих на нуклеофильность L-Tyr37 были выбраны Ser, Glu, Asp. На данные аминокислоты были заменены аминокислоты, которые расположены вблизи L-Tyr37 и боковые группы которых ориентированы к нему – остатки 35, 36, 38, 45, 46, 47, 88 легкой цепи (рис. 4, розовые и желтые сферы).

Эти ограничения привели к уменьшению библиотеки до 167538 мутантов. Для каждого из 167538 мутантов с помощью ММ Монте-Карло алгоритма был произведен поиск конформаций боковой цепи. Лучшие 50 конформаций были проанализированы на возможность образовывать водородную связь между мутантным остатком и параоксоном, то есть расстояние между ними должно быть не больше 3 Å. При этом необходимо учитывать, что вследствие сильного отталкивания на малых расстояниях (из-за перекрытия электронных облаков), атомы не могут подходить близко друг к другу. Зависимость энергии взаимодействия двух частиц от расстояния между ними описывается потенциалом Леннарда-Джонса.

Что бы выбрать лучшие мутанты для дальнейших КМ/ММ расчетов, была введена оценочная функция F:

$$F = 100 \times \frac{N(\text{контактов})}{E(\text{отталкивания})}$$

Наложение граничного условия, при котором  $F > 1,25$ , привело к сокращению размера библиотеки до 375 мутантов. Эти мутанты были способны образовывать водородную связь с параоксоном. Далее необходимо было выяснить, в случае каких аминокислотных замен возможно протекание реакции взаимодействия с параоксоном. Для этого все мутанты были подвергнуты моделированию КМ/ММ метадинамики так же, как это было сделано в случае антитела дикого типа. Были выбраны такие параметры метадинамики, которые приводили к 50% вероятности образования переходного состояния. Предварительные КМ/ММ расчеты показали, что:

1. в случае мутантов с заменами на анионные аминокислоты не происходит образование ковалентного комплекса.
2. большее число успешных запусков системы случалось в случае замен на основные аминокислоты Arg, Lys и His в позициях 35, 92, 98 легкой цепи и 99, 107 тяжелой цепи.

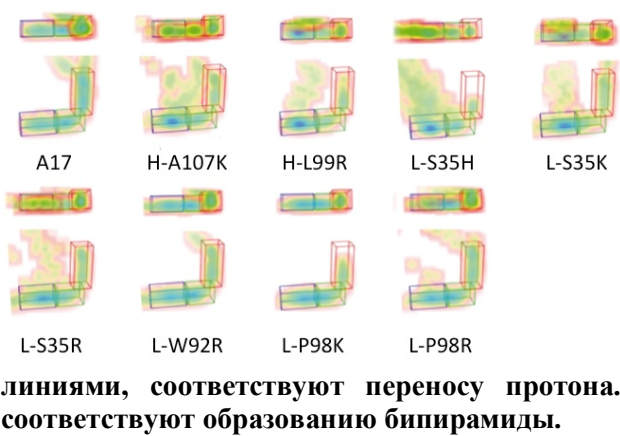
В результате виртуального скрининга было отобрано 9 мутантов, в которых наблюдалось протекание реакции лучше, чем в антителе дикого типа. Критерием отбора являлось время начала процесса переноса протона, меньшее значение времени соответствовало меньшей энергии, использованной в моделировании КМ метадинамики.

Для достижения сходимости результатов для всех отобранных мутантов было по 100 раз проведено моделирование протекания реакции. В качестве стартового было выбрано состояние, в котором параоксон находится в предреакционном комплексе в антителе дикого типа. Был выбран набор коллективных переменных, который приводил к 20% вероятности образования переходного состояния (расстояние между фосфором и L-Tyr37 было ограничено  $2,75\text{\AA}$ ). В таблице 1 представлены данные по количеству состояний, соответствующих различным стадиям реакции взаимодействия с параоксоном. На основе этих данных был построен четырехмерный график (рис. 5), по которому можно судить об эффективности образования переходного состояния. Большинство мутантов показывают относительно хорошую эффективность образования переходного

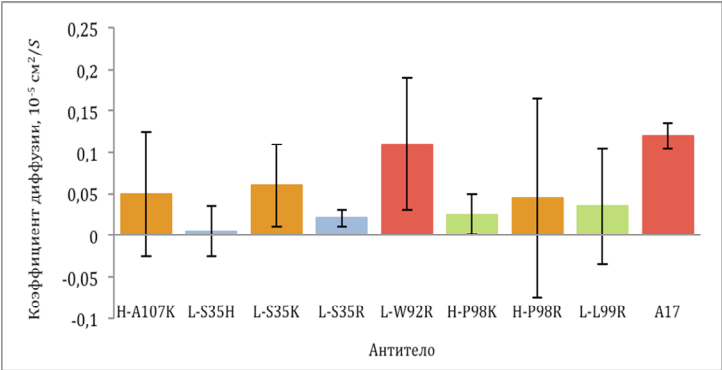
состояния, тем не менее есть несколько мутантов, для которых эффективность ниже – L-W92R, L-P98K, L-P98R. Для оценки эффективности позиционирования параоксона в реакционном центре, был проведен анализ коэффициентов диффузии параоксона при моделировании молекулярной динамики (рис. 6). Меньшее значение коэффициента диффузии отражает лучшее позиционирование параоксона в активном центре. В результате сравнения коэффициентов диффузии можно заключить, что L-S35R является наиболее привлекательным кандидатом для экспериментальной проверки.

**Таблица 1. Таблица количества состояний, соответствующих различным стадиям реакции.**

Антитело	Количество состояний, соответствующих не ковалентному связыванию.	Количество состояний, соответствующих переносу протона.	Количество состояний, соответствующих образованию тригональной бипирамиды.
H-A107K	100267	9919	3042
L-S35H	100387	12211	6065
L-S35K	110380	3102	6471
L-S35R	90632	19140	7801
L-W92R	54683	54770	9996
H-P98K	76117	41541	2297
H-P98R	64107	45779	9575
L-L99R	105537	2822	3334
A17	3293	3581	58674



**Рис. 5. 4D графики плотности конформаций. По трём осям отложены координаты реакции – расстояние от протона до кислорода L-Tyr37 (Tyr-O...H), от протона до фосфорильного кислорода (P=O...H) и между кислородом уходящей группы и атомом фосфора параоксона (P...O-PNP), которые описывают перенос протона и образование переходного состояния. Состояния, обведенные синими линиями, соответствуют нековалентному связыванию. Состояния, обведенные зелеными линиями, соответствуют переносу протона. Состояния, обведенные красными линиями, соответствуют образованию бипирамиды.**



**Рис. 6. Коэффициенты диффузии для параоксона в различных мутантах при классическом моделировании молекулярной динамики.**

На стадии переноса протона может быть образована водородная

связь между гидроксильной группой L-Tyr37 и фосфорильным кислородом. Эта водородная связь будет являться ингибирующей, поскольку ее ориентация не позволяет кислороду L-Tyr37 подойти на необходимое для атаки расстояние к атому фосфора. Детальное изучение механизма реакции лучшего расчетного мутанта L-S35R с помощью КМ/ММ анализа показало значительное снижение плотности конформаций на этапе переноса протона с L-Tyr37 на фосфорильный кислород параоксона (58102 в случае дикого типа против 9991 в случае мутанта), что отражает снижение вероятности формирования ингибирующей водородной связи между L-Tyr37 и фосфорильным кислородом для мутанта L-S35R (рис. 7).

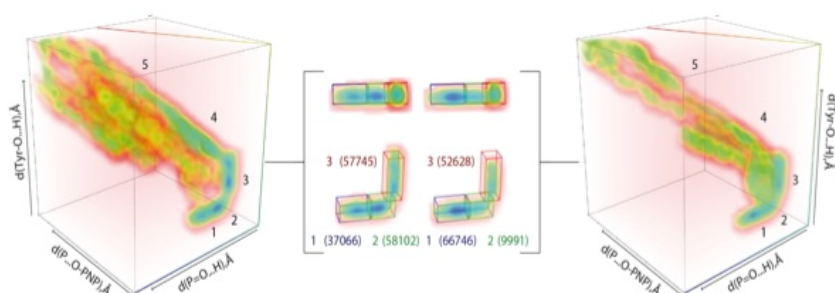


Рис. 7. 4D графики плотности конформаций, построенные исходя из данных изменения трех коллективных переменных – расстояний от протона до кислорода L-Tyr37 (Tyr-O...H), от протона до фосфорильного кислорода (P=O...H) и между кислородом уходящей группы и атомом фосфора

параоксона (P...O-PNP) и изменения энергии (синий цвет соответствует низкой потенциальной энергии, красный – высокой). Цифрами отмечены стадии: (1) – стадия нековалентного связывания. (2) – стадия сближения фосфорильного атома кислорода субстрата с протоном L-Tyr37, перенос протона на фосфорильный атом кислорода и его удаление от L-Tyr37. (3) – атака кислорода L-Tyr37 на атом фосфора с образованием позднего переходного состояния – тригональной бипирамиды. (4) – разрыв связи P...O-PNP с образованием метастабильного нитрофенолят-аниона, который получая протон превращается в п-нитрофенольную уходящую группу. На врезке показаны 4D графики плотности конформаций для ключевых стадий. Состояния, обведенные синими линиями, соответствуют не ковалентному связыванию. Состояния, обведенные зелеными линиями, соответствуют переносу протона. Состояния, обведенные красными линиями, соответствуют образованию тригональной бипирамиды. Цифрами в скобках отмечены конформационные популяции для стадий 1, 2, 3.

Описанные этапы виртуального уменьшения репертуара мутантов схематически приведены на рис. 8.



Рис. 8. “Пирамида” изменения количества мутантов во время *in silico* вычислений. Знание механизма реакции привело к значительному сокращению представительности виртуальной библиотеки. В ходе ММ вычислений было показано, что только в случае 375 мутантов наблюдается образование водородной связи между параоксоном и мутированным остатком. Данные мутанты были проанализированы методом КМ на возможность прохождения реакции, в случае мутанта L-S35R наблюдалось наиболее эффективное позиционирование параоксона, а также эффективность образования переходного

состояния была выше, чем в случае других мутантов.

## Сайт-направленный мутагенез антитела A17. Функциональный анализ мутантов.

Таким образом, на основании приведенных расчетов нами были отобраны ряда мутантов, потенциально обеспечивающих «перепрограммирование» выбранного нами пути реакции.

Для экспериментального подтверждения расчетных данных все предсказанные мутанты были получены в виде рекомбинантных Fab-фрагментов. Конструкции, предназначенные для получения тяжелых и легких цепей Fab-фрагментов антител, были созданы на основе плазмиды pPicZ $\alpha$  (“Invitrogen”).

Дрожжевые клетки *Pichia Pastoris*, трансформированные смесью линейаризованных плазмид pPicZ $\alpha$ , кодирующие тяжелые и легкие цепи Fab-фрагмента антитела A17 дикого типа или мутантов, продуцировали набор секреторных белков с молекулярной массой около 55 и 27 кДа, связывающихся с антителами к константному домену каппа цепи иммуноглобулинов человека и с антителами к FLAG эпитопу. Эти данные согласуется с теоретически рассчитанными молекулярными массами фрагмента легкой цепи антитела A17, равной 26606.3 Да, фрагмента тяжелой цепи, равной 27398.3 Да. и Fab-фрагмента, равной 54004.6 Да. Антитело A17 и его мутанты были наработаны и хроматографически очищены для проведения дальнейших экспериментов.

С целью подтверждения гипотезы о «перепрограммировании реакционного пути» и характеристики полученных на предыдущем этапе мутантных форм антитела A17, очищенные белки были проанализированы на эффективность связывания пестицида параоксон. Данные кинетики взаимодействия мутантных форм антитела A17 с параоксоном и фосфонатом X приведены в таблице 2. Из приведенных данных следует, что мутант L-S35R проявляет 170-кратное увеличение эффективности взаимодействия ( $k_2/K_d$ ) по сравнению с антителом дикого типа ( $229 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$  и  $1,35 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ , соответственно (таблица 2)), что согласно компьютерным расчетам и, по всей видимости, связано с правильной ориентацией субстрата в активном центре и увеличением скорости переноса протона с L-Y37 на фосфорильный атом параоксона.

Введение других потенциальных аминокислот-доноров протонов в 35 положение легкой цепи – гистидина и лизина – также привело к увеличению эффективности связывания с параоксоном. Однако значения эффективности взаимодействия ниже,



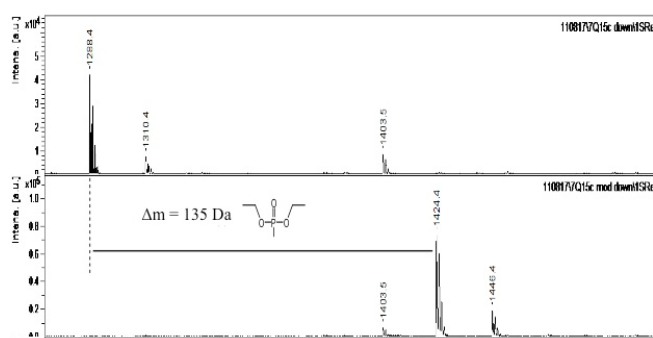
чем для L-S35R, что проявляется в худших значениях  $K_d$ , т.е. образование нековалентного комплекса происходит не так же эффективно, как в случае мутанта L-S35R. Эти экспериментальные данные также согласуются с расчетными, в которых было показано, что L-S35H и L-S35K обладают относительно высоким значением коэффициента диффузии и следовательно не достаточно корректной ориентацией субстрата в активном центре (рис. 6). Введение нейтральной аминокислоты в 35 положение – аланина – привело к исчезновению активности. По-видимому, серин в 35 положении легкой цепи в антителе дикого типа способствует увеличению нуклеофильности тирозина за счет возможного образования водородной связи с гидроксил-ионом нуклеофильного тирозина. Так же был проанализировали мутант, который исходя из компьютерных расчетов был неактивным – мутант с заменой серина в положении 35 на глутаминовую кислоту. Согласно экспериментальным данным, этот мутант был не активен по отношению к параоксону и фосфонату X. По-видимому, перенос протона с тирозина на параоксон затруднен вблизи отрицательно-заряженной аминокислоты. Мы показали, что мутанты L-S35R и L-S35K не обладают способностью гидролизовать параоксон. Для осуществления гидролиза фосфотирозинового производного необходимо наличие гидроксил-иона. Однако существование этого иона в случае мутантов L-S35R и L-S35K невозможно в виду положительного заряда этих аминокислот. Единственный мутант, который сохранил способность гидролизовать параоксон – L-S35H. Это можно объяснить тем, что в следствии того, что  $pK_a$  боковой цепи гистидина равен 6,1, присутствие гидроксил-иона вблизи активного центра вероятно, поэтому гидролиз возможен.

Для доказательства образования фосфотирозинового производного в случае мутанта L-S35R, триптический гидролизат данного мутанта до и после взаимодействия с параоксоном был проанализирован с помощью метода масс-спектрометрии MALDI. Было установлено, что разница молекулярных масс соответствующих пиков пептидов, содержащих аминокислотный остаток L-Y37 в немодифицированном и модифицированном антителе соответствует весу остатка параоксона (136 Да) (рис. 9).



**Таблица 2. Кинетические параметры реакции взаимодействия мутантов антитела A17 с параоксоном и фосфонатом X. Измерения проводили при 25°C, концентрация активных центров мутантов A17 – 10 мкМ, концентрацию параоксона и фосфоната X варьировали от 20 до 1000 мкМ. Н. Д. – не детектируется.**

Параоксон					Фосфонат X
	$k_2$ (min <sup>-1</sup> )	$K_d$ (M)	$k_3$ (min <sup>-1</sup> )	$k_2/K_d$ (M <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	$k_2/K_d$ (M <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
<b>L-S35R</b>	$7.8 \times 10^{-2}$	$3.40 \times 10^{-4}$	Н.Д	229	Н.Д
<b>L-S35K</b>	$8 \times 10^{-2}$	$6.00 \times 10^{-4}$	Н.Д	133	Н.Д
<b>L-S35H</b>	$1.2 \times 10^{-2}$	$6.00 \times 10^{-4}$	$1.2 \times 10^{-4}$	20	Н.Д
<b>L-S35E</b>	Н.Д	Н.Д	Н.Д	-	Н.Д
<b>L-S35A</b>	Н.Д	Н.Д	Н.Д	-	Н.Д
<b>L-L99R</b>	$0.6 \times 10^{-2}$	$5.10 \times 10^{-4}$	Н.Д	11.7	78
<b>H-P98R</b>	Н.Д	Н.Д	Н.Д	-	Н.Д
<b>A17</b>	Н.Д	Н.Д	$1.6 \times 10^{-4}$	1.35	2000±500



**Рис. 9. MALDI масс-спектр триптического гидролизата Fab-фрагмента антитела L-S35R (верхний спектр) и его производного, модифицированного параоксоном (нижний спектр). Разница молекулярных масс соответствующих пиков пептидов (WYQQLPGTAPK), содержащих аминокислотный остаток L-Tyr37 в немодифицированном и модифицированном антителе соответствует весу остатка параоксона (136 Да).**

**Таблица 3. Данные предстационарной кинетики для Fab-фрагмента антитела дикого типа и мутантов L-S35R и L-S35H. Концентрация антитела составляла 10 мкМ, концентрацию субстрата варьировали от 5 до 1000 мкМ.**

	$K_I$ , □M <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup>	$k_I$ sec <sup>-1</sup>	$K_{D1}$ (□M)	$k_2$ , sec <sup>-1</sup>	$k_{-1}$ sec <sup>-1</sup>	$K_{D2}$	$K_{Dpss}$ , (□M)
<b>A17</b>	3.3±0.1	460±13	142±7	42±1	117±2	2.8±0.1	380±32
<b>L-S35R</b>	1.77±0.03	260±10	130±7	73±4	105±4	1.4±0.1	180±23
<b>L-S35H</b>	1.58±0.2	150±5	95±4	50±3	60±2	1.2±0.1	114±14

Ранее в лаборатории биокатализа было показано использование каталитическим антителом A17 принципа индуцированного соответствия при взаимодействии с фосфонатом X. Для детализации каталитического механизма мутантов L-S35R и L-S35H и антитела дикого типа, наряду со стационарной, была

изучена пред-стационарная кинетика взаимодействия с параоксоном, анализ которой показал, что все три белка реализуют механизм индуцированного соответствия при взаимодействии с параоксоном (таблица 3). Действительно, как следует из таблицы, схема взаимодействия антител с параоксоном включает стадии связывания субстрата и перестройку комплекса абзим/субстрат.

### Структурный анализ мутанта L-S35R.

Для детализации механизма действия мутантного антитела и обоснования гипотезы о «перепрограммировании» реакции взаимодействия с параоксоном нами был проведен рентгеноструктурный анализ мутантного антитела L-S35R. Для кристаллизации был использован Fab-фрагмент мутанта L-S35R. Модифицированный параоксоном белок получали путем инкубации 20 мкМ антитела с 500 мкМ параоксона. Эффективность модификации оценивали по выделившемуся *p*-нитрофенолу при 405 нм. Далее осуществляли гель-фильтрацию Fab-фрагментов (модифицированного и немодифицированного параоксоном) на колонке Superdex 75 (Amersham) в буфере 50 мМ Трис-HCl pH 7,5. Затем препараты Fab-фрагментов концентрировали с помощью Centrifugal Filter Units Amicon ®Millipore Ultracel 10кДа до конечной концентрации 8-10 мг/мл. Отсутствие видимых белковых примесей в очищенных препаратах Fab-фрагмента контролировали электрофорезом в 10% ДСН-ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси синим.

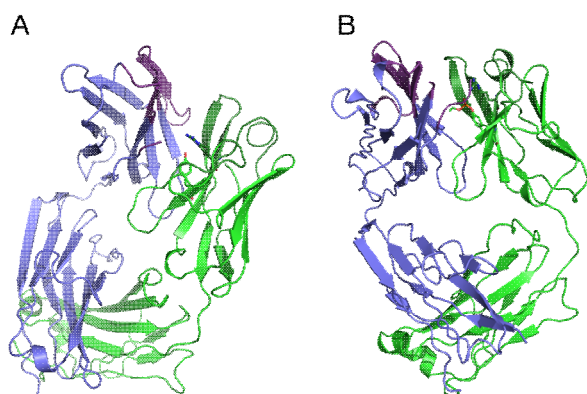


Рис. 10. (А) Общая структура антитела L-S35R и (В) его ковалентного аддукта с остатком параоксона (PDB: 5ADP и PDB: 5ADO, соответственно). Тяжелая цепь показана синим, легкая цепь показана зеленым.

Кристаллизация и анализ рентгеноструктурных данных осуществлялись в Европейской молекулярно-биологической лаборатории

(EMBL) при непосредственном участии автора данной диссертации. Структуры Fab-фрагмента мутанта L-S35R антитела A17 и его аддукта с остатком параоксона были установлены с разрешением 2.1 Å и 1.6 Å соответственно (рис. 10). Координаты атомов и экспериментальные структурные факторы были размещены в Банке

белковых структур (Protein Data Bank) с идентификационными кодами **5ADP** и **5ADO** для немодифицированного и модифицированного параоксоном антитела, соответственно.

Как и ожидалось, общая структура мутанта L-S35R показала высокое сходство со структурой нативного A17 (среднее квадратичное отклонение 0.4 Å при использовании алгоритма LSQKAB. Легкая цепь практически идентична в обеих структурах (среднее квадратичное отклонение 0.2 Å и 0.3 Å для немодифицированного и модифицированного параоксоном L-S35R, соответственно). Существенно большие отклонения наблюдались в случае тяжелой цепи (среднее квадратичное отклонение 0.5 Å), эта разница обуславливается в основном тем, что в структуре L-S35R петля CDR тяжелой цепи, а в особенности H-CDR1 и H-CDR3, весьма неупорядоченна, в отличие от структуры тяжелой цепи нативного антитела. Петли CDR легкой цепи мутанта и исходного антитела, напротив, имеют аналогичные значения нормализованных ADP (atomic displacement parameter, параметр смещения атома, характеризует разупорядоченность системы).

Анализ структуры мутанта L-S35R и его ковалентного аддукта с остатком параоксона показал, что остаток L-Arg35 хорошо определяется, в особенности в структуре ковалентного комплекса. L-Arg35 в структуре ковалентного комплекса образует разветвленную сеть водородных связей с участием параоксона, остатка H-Asn105 тяжелой цепи и молекул воды (рис. 11, А). Похожая ситуация наблюдалась в случае комплекса нативного антитела A17 с фосфонатом X: атом азота тропинольного кольца фосфоната формирует сильную водородную связь (2.79 Å) с атомом кислорода основной цепи аминокислотного остатка H-Asn105 (PDB: 2XZC, рис. 11, В). Эти взаимодействия, очевидно, стабилизируют фосфорилированный белок. Кроме того, наложение апо- и ковалентно-модифицированной параоксоном структур показывает, что остаток L-Arg35 смещается для обеспечения места для параоксона: Cε сдвигается на 5.2 Å (рис. 11, С), наглядно демонстрируя механизм индуцированного соответствия для этого антитела, показанный ранее на основании данных пред-стационарной кинетики.

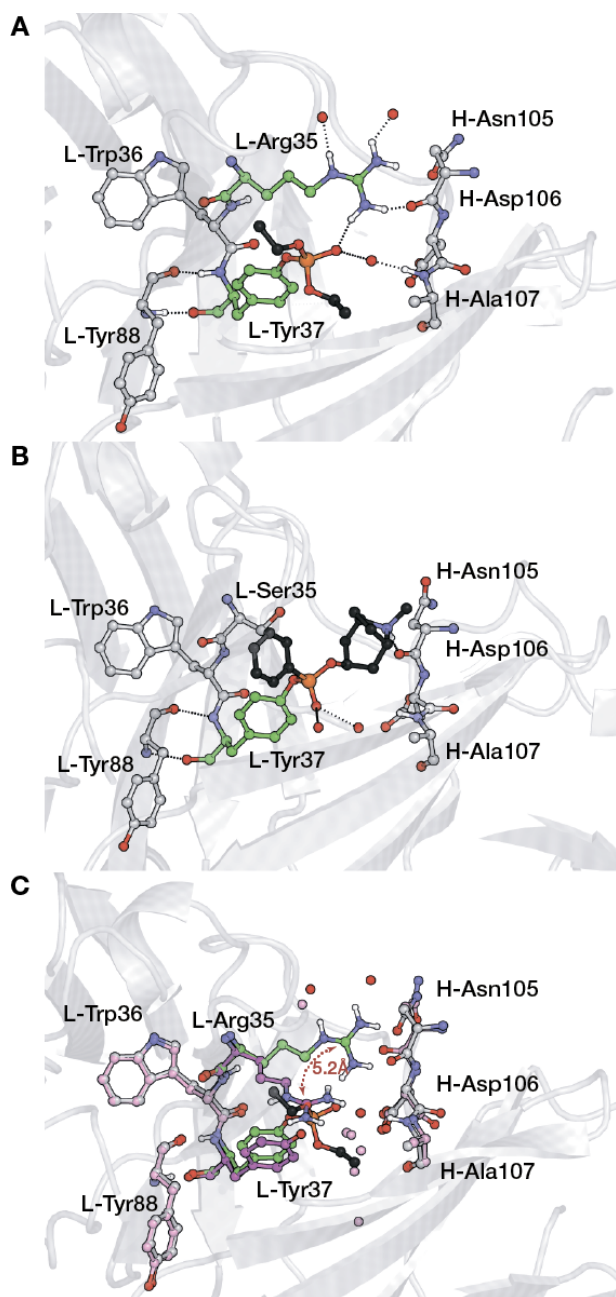


Рис. 11. Структурный анализ ковалентных комплексов мутанта L-S35R и нативного антитела A17 с параоксоном и фосфонатом X, соответственно. (A) Активный сайт и водородные связи в активном центре L-S35R, связанного с остатком параоксона (PDB: 5ADO); каталитический остаток L-Tyr37 показан зеленым, “пассивные” аминокислотные остатки – серым, диэтил фосфат – черным, водородные связи – черными пунктирными линиями. (B) активный сайт и водородные связи в активном центре антитела A17, связанного с остатком фосфоната X (PDB: 2XZC); каталитический остаток L-Tyr37 показан зеленым, пассивные аминокислотные остатки – серым, фенилфосфонат – черным, водородные связи – черными пунктирными линиями. (C) Наложение активных центров L-S35R (розовый) и его ковалентного аддукта с остатком параоксона (зеленый).

Анализ структурных данных показал, что в ковалентном комплексе L-S35R и параоксона имеется дополнительная водородная связь между фосфорильным кислородом параоксона и NH1-группой аргинина (рис. 11, A). Как следует из данных рентгеноструктурного анализа, больше никаких других водородных связей между мутантом L-S35R и остатком параоксона нет (исключая

воду, которая также присутствует в кристалле апо-L-S35R и координирует NH1-группу аргинина и P=O группу). Следовательно, по всей видимости, 170-кратное увеличение скорости взаимодействия является результатом образования одной водородной связи между L-Arg35 и фосфорильным кислородом параоксона. Таким образом, связь P=O оказывается сильно поляризованной, следствием чего является повышенная электрофильность атома фосфора, что и вызывает предсказанное, а затем и подтвержденное экспериментально ускорение реакции акцепции параоксона мутантной формой антитела A17.

### **Заключение.**

В данной работе впервые нами был предложен алгоритм предсказания мутантных форм антител заданной специфичности, позволяющий определить позицию и тип аминокислотного остатка для проведения мутагенеза. Этот подход основан на использовании гибридного метода квантовой и молекулярной механики, что позволяет понять механизм реакции и роль аминокислотных остатков биокатализатора, входящих в состав активного центра. В качестве модели было выбрано каталитическое антитело A17, гидролизующее пестицид параоксон.

Методами квантовой и молекулярной механики нами был изучен механизм реакции взаимодействия антитела A17 с пестицидом параоксон, и было показано, что реакция протекает по классическому  $S_N2$  механизму, ключевой стадией которого является перенос протона с каталитического остатка на параоксон. С помощью предложенного алгоритма было предсказано 9 мутантов, обладающих лучшими характеристиками взаимодействия с параоксоном. Для одного из мутантов – L-S35R – были предсказаны максимальное увеличение вероятности формирования водородной связи между каталитическим остатком и параоксоном по сравнению с диким типом, а также наименьшее значение коэффициента диффузии, что отражает лучшее позиционирование параоксона в активном центре мутанта. Предсказанные мутанты были наработаны, очищены и охарактеризованы по кинетике взаимодействия с параоксоном, и было показано, что мутант L-S35R проявляет 170-кратное увеличение эффективности взаимодействия по сравнению с антителом дикого типа. С помощью рентгеноструктурного анализа мутанта L-S35R и его ковалентного аддукта с остатком параоксона было подтверждено, что введение остатка L-R35 улучшает позиционирование за счет образования водородной связи с фосфорильным атомом кислорода параоксона. Также было показано, что полученная кристаллическая структура активного центра модифицированного антитела L-S35R совпадает с теоретически предсказанной, несмотря на то, что все расчеты базировались на структуре антитела дикого типа.

### III. ВЫВОДЫ

1. Методами КМ/ММ было показано, что реакция взаимодействия антитела A17, связывающегося ковалентно с фосфорорганическими токсинами и пестицидами, в частности, с параоксоном протекает по классическому  $S_N2$  механизму. Ключевой стадией инициации процесса является перенос протона с L-Y37 на фосфорильный атом кислорода параоксона, то есть реакция происходит по  $1w$  механизму.
2. Создана платформа для получения мутантных форм антител заданной специфичности. Разработан алгоритм предсказания мутантных форм антител заданной специфичности, позволяющий определить позицию и тип аминокислотного остатка для проведения мутагенеза. Предсказано 9 мутантов, обладающих лучшими характеристиками взаимодействия с параоксоном по сравнению с исходным антителом A17. Для мутанта L-S35R, с помощью КМ/ММ анализа показаны максимальное увеличение вероятности формирования водородной связи между L-Y37 и фосфорильным атомом кислорода по сравнению с антителом A17, а также наименьшее значение коэффициента диффузии, что отражает лучшее позиционирование параоксона в активном центре биокатализатора.
3. Предсказанные мутанты экспериментально охарактеризованы по кинетике взаимодействия с параоксоном. Показано, что мутант L-S35R проявляет 170-кратное увеличение эффективности взаимодействия по сравнению с исходным антителом A17.
4. Рентгеноструктурный анализ мутантного антитела L-S35R и его ковалентного аддукта с остатком параоксона подтвердил предположение что введение остатка аргинина в 35 положение легкой цепи (L-R35) улучшает позиционирование за счет образования водородной связи с фосфорильным атомом кислорода параоксона. Показано, что полученная кристаллическая структура активного центра модифицированного антитела L-S35R совпадает с теоретически предсказанной методами КМ/ММ.

#### IV. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

##### Статьи:

- Ivan V. Smirnov\*, Andrey V. Golovin\*, Spyros D. Chatzieftimiou\*, **Anastasiya V. Stepanova\***, Yingjie Peng, Olga I. Zolotareva, Alexey A. Belogurov Jr., Inna N. Kurkova, Natalie A. Ponomarenko, Matthias Wilmanns, G. Michael Blackburn, Alexander G. Gabibov, Richard A. Lerner. Robotic QM/MM-driven maturation of antibody combining sites. \* - **равнозначный вклад**. *Science Advances*, 2016, 2(10)
- А. В. Захаров, И. В. Смирнов, М. В. Серебрякова, М. А. Дронина, **А. В. Казначеева (А. В. Степанова)**, И. Н. Куркова, А. А. Белогуров, A. Friboulet, Н. А. Пономаренко, А. Г. Габибов, Т. В. Бобик. Экспрессия каталитических антител в эукариотических системах. *Молекулярная биология*, 2011, том 45, No 1, с. 86–95.
- Ponomarenko N, Chatzieftimiou SD, Kurkova I, Mokrushina Y, **Stepanova A**, Smirnov I, Avakyan M, Bobik T, Mamedov A, Mitkevich V, Belogurov A Jr, Fedorova OS, Dubina M, Golovin A, Lamzin V, Friboulet A, Makarov AA, Wilmanns M, Gabibov A. Role of kappa - lambda light - chain constant - domain switch in the structure and functionality of A17 reactibody. *Acta Crystallographica*, 2014, D70 (Pt 3), p. 708–719.
- Ю.А. Мокрушина, **А.В. Степанова**, Т.В. Бобик, И.В. Смирнов, А.Г. Габибов. Новые генетические конструкции для получения стабильных терапевтических антител против фосфорорганических токсинов в метилотрофных дрожжах *Pichia Pastoris*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2016, том 161, №1, с. 83-7.
- С.С. Терехов, Т.В. Бобик, Ю.А. Мокрушина, **А.В. Степанова**, Н.М. Александрова, И.В. Смирнов, А.А. Белогуров, Н.А. Пономаренко, А.Г. Габибов. Экспрессия ДНК-кодируемого антидота к фосфорорганическим токсинам в метилотрофных дрожжах *Pichia Pastoris*. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2016, том 52, № 2, с. 1–9.

##### Опубликованные тезисы конференций и доклады:

- Stepanova A.**, Smirnov I., Chatzieftimiou S., Golovin A., Ponomarenko N., Gabibov A. QM prediction for creating a mutated antibody with desired catalytic specificity towards organophosphorus toxins. 40th Congress of The Federation of European Biochemical Societies (FEBS) "The Biochemical Basis of Life". 2015 г. Берлин, Германия.

**А.В.Степанова**, И.В.Смирнов, А.В.Головин, Н.А.Пономаренко, А.Г.Габибов. Разработка высокоэффективного метода создания мутантных форм каталитического антитела с заданной специфичностью по отношению к фосфорорганическим токсинам. XXVII Зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико - химической биологии и биотехнологии". 2015 г. Москва, Россия.

**Stepanova A.**, Smirnov I., Chatziefthimiou S., Golovin A., Kurkova I., Bobik T., Ponomarenko N., Gabibov A. QM prediction of immunoglobulin repertoire to generate highly functional antibodies. 38th Congress of The Federation of European Biochemical Societies (FEBS) "Mechanisms in Biology". 2013 г. Санкт-Петербург, Россия.

**Казначеева А.В. (Степанова А.В.)**, Куркова И.Н., Бобик Т.В., Смирнов И.В., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г. Структурно-функциональное исследование каталитического антитела а.17, гидролизующего фосфоорганические соединения. V Российский симпозиум «Белки и пептиды». 2011 г. Петрозаводск, Россия.

Smirnov I., **Stepanova A.**, Golovin A., Ponomarenko N., Gabibov A. Evolution of a reactibody by combined natural and computational methods. 38th Congress of The Federation of European Biochemical Societies (FEBS) "Mechanisms in Biology". 2013 г. Санкт-Петербург, Россия.

Smirnov I., **Stepanova A.**, Terekhov S., Golovin A., Mokrushina Y., Belogurov A., Ponomarenko N., Gabibov A. Combined in vitro and in silico evolution of the organophosphorus metabolizing reactibody A17. The 39th Congress of The Federation of European Biochemical Societies (FEBS). 2014 г. Париж, Франция.