

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»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

Доктор биологических наук, профессор

Пономаренко Наталья Александровна

Кандидат химических наук

Смирнов Иван Витальевич

Москва – 2016

Оглавление.

Список сокращений.	3
Введение.	4
Литературный обзор.	7
1. Направленная эволюция ферментов.	7
1.1. Создание генетического разнообразия.	8
1.2. Высоко-эффективные методы отбора библиотек.	10
2. Рациональный дизайн, как средство улучшения каталитической эффективности.	17
2.1. Рациональный дизайн на основе экспериментальных данных.	17
2.2. Рациональный дизайн на основе компьютерных методов.	20
3. Получение антител, нейтрализующих ФОТ.	42
Материалы и методы.	47
1. Расчетные методы.	47
2. Химические реактивы и сопутствующие материалы.	49
3. Растворы.	51
4. Работа с нуклеиновыми кислотами.	51
5. Методы работы с бактериями <i>E.coli</i>	55
6. Методы работы с дрожжами <i>Pichia Pastoris</i>	57
7. Работа с белками.	60
Результаты и обсуждения.	67
1. Детализация механизма реакции антитела A17 с параоксоном.	67
2. Создание виртуальной библиотеки для <i>in silico</i> скрининга.	74
3. Сайт-направленный мутагенез антитела A17. Функциональный анализ мутантов.	82
4. Структурный анализ мутанта L-S35R.	96
Заключение.	103
Выводы.	104
Список литературы.	105

Список сокращений.

АТФ – аденозинтрифосфат

АцХЭ – ацетилхолинэстераза

БуХЭ – бутирилхолинэстераза

ГАЖК – гидролаза амидов жирных кислот

ДНКаза – дезоксирибонуклеаза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСН – додецилсульфат натрия

ДСН-ПААГ – полиакриламидный гель, содержащий додецилсульфат натрия

КМ/ММ – квантовая механика/молекулярная механика

КоА – кофермент А

МД– молекулярная динамика

ПААГ – полиакриламидный гель

ПОН1 – параоксоназа

П.о. – пары оснований

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЦС – цитратсинтаза

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ФОТ – фосфорорганические токсины

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

CDR – complementary determining region, гипервариабельные участки

Fab – fragment antigen binding, фрагмент иммуноглобулина, содержащий один вариабельный и один константный домены легкой и тяжелой цепей антитела

FACS – fluorescence-activated cell sorter, проточная цитофлуориметрия

FWR – каркасный участок вариабельного домена цепи иммуноглобулина

IVC – in vitro compartmentalization, компартментализация *in vitro*

PNP – паранитрофенол

ScFv – single-chain variable fragment (одноцепочечный вариабельный фрагмент)

Введение.

Разработка современных способов создания, направленной модификации и искусственной эволюции рекомбинантных белков является одной из важнейших задач современной белковой инженерии, биохимии и прикладной молекулярной биологии. Одним из ярких примеров природной направленной эволюции белковой молекулы для обеспечения лучших параметров взаимодействия является аффинное созревание антител. Практическая реализация аффинного созревания *in vitro* с помощью стохастических мутаций довольно затруднительна. Детальное знание структуры белковой молекулы и развитие методов генетической инженерии обеспечили возможность существенной модификации рекомбинантных антител с получением новых белков с заданными свойствами. Используемые в этой области методы условно можно разделить на две группы:

1. рациональный дизайн – подход, в котором на основе знаний о трехмерной структуре и функции рекомбинантного белка, проводится направленное изменение тех или иных фрагментов белковой молекулы методами сайт-направленного мутагенеза
2. комбинаторные методы - методы, основанные на статистической замене аминокислот. Они предполагают, в частности, создание комбинаторных библиотек с последующим отбором вариантов с необходимыми свойствами

Существующие методы и подходы к созданию и отбору комбинаторных библиотек позволили осуществить прорыв в дизайне белковых структур, в том числе лекарственных соединений. Однако, обычный размер библиотеки на много порядков больше, чем количество вариантов белка, которые могут быть подвергнуты скринингу. Это требует разработки, с одной стороны, методов высокоэффективного скрининга, и с другой стороны, способов рационального снижения представительности комбинаторных библиотек без потери функциональной активности.

Появление современных методов компьютерного анализа сделало возможным моделировать молекулярные механизмы 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, включая химические превращения. Детальное понимание механизма взаимодействия позволяет определить не только наиболее выгодные позиции для проведения мутагенеза, но и тип аминокислотного остатка, который необходимо ввести в активный центр для улучшения реакционной способности. Также вычислительные методы дают возможности для создания широкого спектра новых белков. Прорывом в создании рекомбинантных белков *de novo* является создание биокатализаторов на основе антител, катализирующих реакции, для которых не существует природных ферментов.

В частности, это касается биокатализаторов на основании антител, осуществляющих превращения фосфорорганических соединений. 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 бытовыми 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 позволяя избежать смертельных исходов, они не могут предотвратить глубокую инвалидизацию пострадавшего, что приводит к потере трудоспособности и необратимым поражениями головного мозга. Альтернативным подходом в терапии и профилактике отравлений ФОТ является использование биологических антидотов на основе антител. Преимущества этого подхода во многом обусловлены существенным заделом, накопленным мировым биотехнологическим сообществом в области создания рекомбинантных терапевтических антител. Это и обусловило наше стремление подойти к проблеме создания *de novo* биокатализаторов с потенциально улучшенными потребительскими свойствами на основе антительной матрицы.

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.

Данная диссертационная работа посвящена проблеме разработки способов направленной модификации антител к фосфорорганическим токсинам, с целью улучшения эффективности их взаимодействия с ФОТ. В качестве основы было выбрано антитело A17, способное гидролизовать фосфорорганический пестицид - параоксон.

Разработанный в работе способ аффинного созревания антител *in silico* является универсальным и может быть использован для направленной модификации рекомбинантных белков не только иммуноглобулиновой природы, а также рецепторов и ферментов.

Литературный обзор.

1. Направленная эволюция ферментов.

Направленная эволюция ферментов – это метод, используемый в белковой инженерии, который имитирует процесс естественного отбора белков. Но, в отличие от естественной эволюции, направленная эволюция является более избирательным методом, который имеет определенную цель, ограничен во времени и контролируется исследователем, то есть это по сути искусственная эволюция, хотя ее ключевые стадии (мутация, рекомбинация и скрининг) имитируют естественно протекающие в природе процессы. С помощью направленной эволюции можно улучшать активность ферментов, изменять их селективность и создавать функции *de novo*.

Эксперименты по направленной эволюции состоят из двух основных шагов: во-первых, создание генетического разнообразия в целевом гене в виде геномной библиотеки, и во-вторых, эффективная селекция из библиотеки для получения желаемой каталитической активности. Однако зачастую обычный размер библиотеки на много порядков больше, чем количество вариантов белка, которые могут быть подвергнуты скринингу. Поэтому необходимы методы высокоэффективного скрининга или селекции на интересующую активность.

Основой скрининга и селекции является связь между геном, который кодирует фермент и продуктом активности этого фермента (рис. 1).

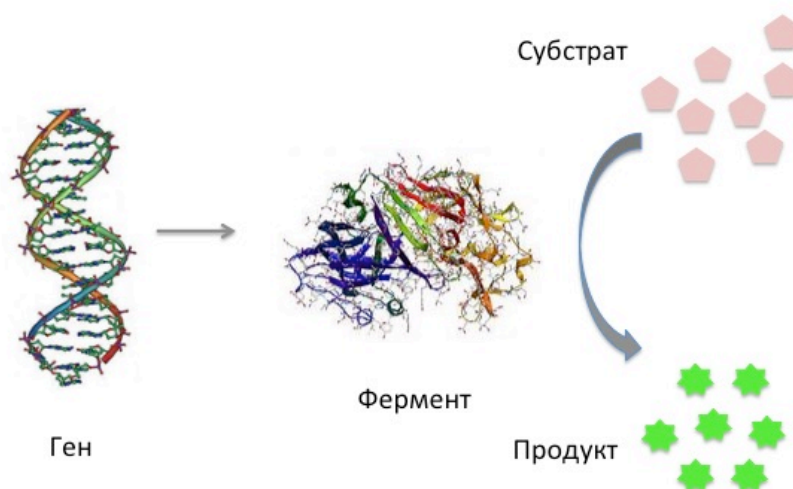


Рис. 1. Связь ген-белок играет ключевую роль при проведении раундов отбора

Как правило, под “скринингом” подразумевают поиск интересующих ферментов среди небольшого числа (несколько тысяч) индивидуальных клонов, то есть скрининг выполняется на отдельных генах или клонах и требует некоторой пространственной организации скринируемых вариантов на чашках с агаром, микротитрационных планшетах, матрицах или чипах. Термин “селекция” подразумевает под собой более эффективные методы поиска интересующей активности с использованием библиотек с высокой представительностью (более 10^7 клонов). Проведение селекции или скрининга должно соответствовать некоторым требованиям. Оно должно быть непосредственно направленно на интересующее свойство – “вы получаете то, на что вы проводите отбор”, это первое правило направленной эволюции. Таким образом, субстрат для отбора должен быть настолько идентичным, насколько это возможно, целевому субстрату. На первых раундах селекции отбираются все улучшенные варианты, включая те, которые проявляют лишь незначительное улучшение активности. На следующих раундах должны быть применены более жесткие условия для обеспечения отбора лучших вариантов.

1.1. Создание генетического разнообразия.

Библиотеки мутантов ферментов могут быть созданы с применением таких методов, как:

1. “ошибочный” ПЦР (error prone PCR) – введение ошибок в ДНК путем неточного ПЦР. Точность полимеразы регулируется за счет варьирования состава реакционного буфера, например, изменение концентрации ионов Mn^{2+} или Mg^{2+} приводит к снижению точности синтеза комплементарной нити ДНК.
2. кассетный мутагенез. Метод заключается в том, что из гена, клонированного в составе векторной плазмиды, по двум близко расположенным уникальным сайтам рестрикции вырезается фрагмент ДНК, в который необходимо внести мутации, и на его место встраивается синтетический двухцепочечный олигонуклеотид, содержащий необходимые замены нуклеотидов (кассету мутаций). Если в окрестностях мутируемого локуса гена отсутствуют подходящие природные сайты рестрикции, их вводят с помощью направленного мутагенеза. Использование на определенных

этапах синтеза вместо одного нуклеотида смеси из нескольких дезоксирибонуклеозидтрифосфатов позволяет получать за один прием сложную смесь олигонуклеотидов, которые могут содержать в определенных сайтах наборы кодонов для многих аминокислот. Это дает возможность осуществлять одновременный скрининг по искомому мутантному фенотипу из большого числа разных мутантных клонов.

3. «перетасовка» ДНК сегментов (DNA shuffling). Метод заключается в том, что гены обрабатывают ДНКазой или эндонуклеазами рестрикции, в результате чего получаются фрагменты ДНК длиной около 50-100 нуклеотидов. После этого методом ПЦР без добавления праймеров, ДНК-фрагменты с достаточной степенью перекрытия отжигаются, а затем происходит элонгация с помощью ДНК-полимеразы. Несколько раундов ПЦР приводит к тому, что некоторые молекулы ДНК достигают размера родительских генов. Эти гены могут быть амплифицированы с помощью праймеров, комплементарных концам нитей.
4. протокол ступенчатого удлинения (staggered extension protocol). Методика представляет собой модифицированный метод ПЦР с очень короткими (примерно 10 секунд) циклами. В этих циклах удлинение ДНК происходит очень быстро (всего на несколько сотен пар оснований), далее синтезированные фрагменты отжигаются на комплементарных фрагментах других нитей. Таким образом, мутации в начальном гене перемешиваются и, используя этот метод, можно получить гены с новой комбинацией мутаций.
5. метод насыщающего мутагенеза (site-saturation mutagenesis) – метод, в котором одна аминокислота заменяется на любую из оставшихся 19 аминокислот. В результате получается набор клонов, имеющий различные кодоны в нужной позиции.
6. метод повторяющегося насыщающего мутагенеза (iterative saturation mutagenesis) [1]. Метод заключается в том, что на первом этапе выбранные аминокислоты (X, Y, Z) заменяются методом насыщающего мутагенеза. В результате скрининга библиотек выявляются лучшие мутанты X1, Y1, Z1. Далее полученные мутанты используют для насыщающего мутагенеза в следующем положении (в мутанте X1 для мутагенеза будет использовано

положение Y, в результате чего будет получена библиотека X1Y и т.д.). После скрининга библиотек, полученных на втором этапе, будут получены мутанты, имеющие мутации в двух положениях.

Стратегии создания библиотек мутантов описаны более подробно в обзоре [2].

1.2. Высоко-эффективные методы отбора библиотек.

1.2.1. Высоко-эффективный скрининг ферментов, используя клеточные или фаг-дисплейные библиотеки.

Дисплей ферментов на поверхности клеток или фагов имеет несколько преимуществ: во-первых, бактерии или фаги обеспечивают связь между геном и белком, который он кодирует, во-вторых, хотя размер библиотек ограничен эффективностью трансформации, может быть получено 10^{11} - 10^{12} трансформантов. В-третьих, дисплей на поверхности обеспечивает беспрепятственный доступ субстрата и подбор условий реакции (буфер, pH, ионы металлов). Основной проблемой дисплейной системы является поддержание связи между ферментом и продуктом его активности. Ранее селекция ферментативной активности каталитических антител или ферментов в фаг-дисплейной системе выполнялась непрямыми методами, путем связывания аналогов переходного состояния или суицидных ингибиторов. Примером является работа, выполненная группой Плюктуна [3], в которой для селекции антител-фосфатаз из синтетической библиотеки генов иммуноглобулинов использовали суицидный субстрат. Отличие суицидного субстрата от необратимого ингибитора заключается в том, что в результате реакции с субстратом фермент проходит полный оборот реакции, в результате чего образуется активное вещество, ковалентно связывающее фермент. В случае ингибитора фермент останавливается на стадии образования промежуточного продукта реакции. В качестве субстрата в процессе селекции был использован «заякоренный» дифторметилфенил фосфат. В результате расщепления эфирной связи фосфорной кислоты образуется хинонметидин, который затем взаимодействует с нуклеофильной группой активного центра антитела. В результате селекции были отобраны антитела, обладающие фосфатазной активностью, причем каталитическая эффективность (k_{cat}/K_M) полученных антител превосходила эффективность антител, полученных классической иммунизацией аналогами переходных состояний, в 25 раз. Несмотря на высокую каталитическую

эффективность, отобранные антитела все же серьезно уступали щелочной фосфатазе *E.coli*. Для улучшения каталитических параметров, на основе наилучшего варианта антитела-фосфатазы была сконструирована библиотека случайных мутантов и была проведена повторная селекция на фосфатазную активность. В результате повторного отбора удалось улучшить каталитические параметры, однако они все равно оказались ниже, чем в случае щелочной фосфатазы. Аналогичный метод отбора на каталитическую активность был использован в работе [4]. Метод селекции антител с пероксидазной активностью был основан на окислении биотинилированного тирамина, который в результате окисления ковалентно взаимодействовал со связывающим центром антитела. Активные антитела отбирали по способности связываться со стрептавидином.

Другой подход для селекции с помощью фагового дисплея основан на взаимодействии субстрата с фаговой частицей, несущей целевой фермент. Активные варианты фермента преобразуют субстрат в продукт, который остается связанным с фагом, и фаг затем может быть выделен с помощью аффинной хроматографии. В работе [5] авторы описали применение такой процедуры для отбора ферментов с аденилатциклазной активностью, то есть ферментов, преобразующих АТФ в цАМФ. Используя аденилатциклазу *Bordetella pertussis* в качестве модели, авторы показали, что этот фермент может быть эффективно экспрессирован на поверхности нитевидных фагов в активной форме. В качестве субстрата был использован АТФ, модифицированный путем введения малеимидильной группы в положение С8 аденина. Авторы разработали систему отбора, в ходе которой с помощью аффинной хроматографии за счет антител, узнающих цАМФ, модифицированный по положению С8, происходит отбор фагов, несущих на своей поверхности активный фермент. Антитела были отобраны из библиотеки одноцепочечных переменных фрагментов генов иммуноглобулинов (ScFv) Griffin, с представительностью 10^8 . В результате был произведен отбор фагов, несущих ген активной аденилатциклазы, с обогащением в 70 раз в течение каждого раунда селекции.

Одна из первых успешных попыток проведения селекции каталитических антител последовательными шагами *in vivo* и *in vitro*, была опубликована группой Лернера [6]. При получении абзимов со свойствами альдолазы методом

реакционной иммунизации, реакционноспособный гаптен был использован и для иммунизации, и для последующего скрининга фаговой библиотеки, созданной из иммунизированной гаптенем мыши. Бактериофаги, с экспонированными на их поверхности антителами, отбирались по способности ковалентно связываться с иммобилизованным гаптенем. Сочетание столь эффективных подходов к дизайну гаптена и скринингу антител позволило получить высокоэффективный абзим, который ускорял реакцию более чем в 10^9 раз и обеспечивал 95% стереоселективность превращения.

Применение метода клеточно-поверхностного дисплея для направленной эволюции приобрело большую движущую силу. В частности, скрининг с помощью метода FACS (fluorescence-activated cell sorter, проточная цитофлуориметрия) дал несколько высокоэффективных связывающих антител [7, 8]. Другой метод скрининга основан на иммобилизации клеток, несущих на своей поверхности фермент, на носителе. Клетки адсорбируются на полиакриламидных гранулах таким образом, что в среднем, на одну гранулу приходится одна клетка. Гранулы иммобилизуются на твердой поверхности и клетки могут расти и образовывать микроколонии. Далее микроколонии инкубируются с хромогенным или флуорогенным субстратами и скринируются под микроскопом [9].

Однако не только фаговые частицы можно использовать для дисплея ферментов на поверхности клеток, так же для этих целей могут быть использованы клетки бактерий [10], дрожжей [11] и млекопитающих [12]. Rajpal и соавторы [13] использовали клетки дрожжей для дисплея антител на своей поверхности. Они разработали быстрый и простой метод “look-through mutagenesis”, который позволяет создать полную карту оптимизации антиген-связывающего сайта. Авторы показали работоспособность этого метода на примере антитела к фактору некроза опухоли α . Авторы применили аналог аланинового скрининга, чтобы перебрать аминокислотные остатки в CDR антитела. Основываясь на химической структуре, размере и заряде, они разделили 20 аминокислотных остатков на 9 групп и потом выбрали по одному представителю из каждой группы (рис. 2). Затем они выполнили серию одиночных мутаций в CDR, где каждый остаток дикого типа был систематически замещен одним из девяти выбранных аминокислотных остатков. После этого измененные CDR были использованы для создания

комбинаторной библиотеки одноцепочечных антител, экспрессирующей на поверхности дрожжей. Для отбора были использованы магнитные шарики, несущие на своей поверхности биотинилированный фактор некроза опухоли α . После отбора была определена нуклеотидная последовательность клонов с улучшенным связыванием. Что бы выявить взаимоусиливающие мутации, были созданы комбинаторные библиотеки, в которые входили все полезные мутации. Они были проанализированы с целью выявления панели оптимизированных кандидатов. Авторы утверждают, что аффинность лучшего из отобранных одноцепочечных антител по отношению к фактору некроза опухоли α возросла в 870 раз по сравнению с диким типом.

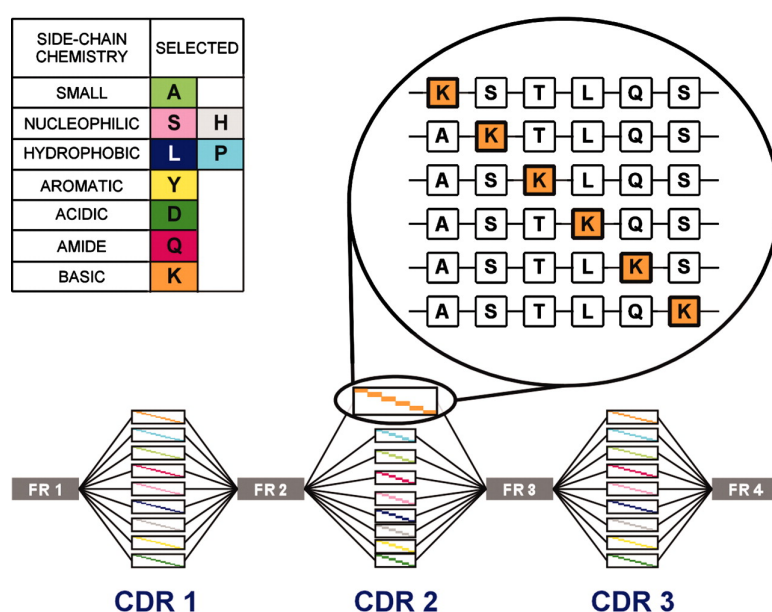


Рис. 2. Схема создания библиотеки, использованная в [13]. 20 аминокислотных остатков были разделены на 9 групп, из каждой группы был выбран один представитель. Затем была выполнена серия одиночных мутаций в CDR, где каждый остаток дикого типа был систематически замещен одним из девяти выбранных аминокислотных остатков.

1.2.2. Компартиментализация *in vitro*.

Метод компартиментализации *in vitro* (*in vitro* compartmentalization, IVC) основан на эмульсиях вода-в-масле, где водная фаза диспергирована в масляной фазе и формирует микроскопические водные компартменты. Каждая капля содержит, в среднем, один ген, и служит в качестве искусственной клетки для обеспечения транскрипции, трансляции и детекции активности полученных белков. Масляная фаза остается в значительной степени инертной и ограничивает диффузию генов и белков между каплями. Высокая емкость системы ($>10^{10}$ капель

на 1мл эмульсии), простота подготовки эмульсии и ее высокая стабильность в широком диапазоне температур, делают этот метод весьма перспективным для высоко-эффективного скрининга ферментов. Один из возможных форматов селекции состоит в том, что субстрат, а затем и продукт желаемой ферментативной активности, физически связаны с геном. Простейшее применение этой стратегии – отбор ДНК-модифицирующих ферментов, где ген и субстрат представляют собой единую молекулу. И действительно, метод IVC был впервые применен для отбора ДНК-метилтрансфераз [14]. Для этого смесь, содержащую необходимые реагенты для *in vitro* транскрипции/трансляции, а также библиотеку генов, связанных с субстратом реакции помещали в эмульсии вода-в-масле, причем условия создания эмульсии подбирались таким образом, что одна капля содержала один ген (рис. 3, шаг 1). Далее гены транскрибируются и транслируются в пределах капли (рис. 3, шаг 2). Протранслированные белки превращают субстрат в продукт реакции, который остается связанным с геном (рис. 3, шаг 3). Далее эмульсия разрушается и реакции преобразования субстрата в продукт останавливаются (рис. 3, шаг 4). Гены, соединенные с продуктом реакции селективно отбираются, амплифицируются и либо характеризуются (рис. 3, шаг 5), либо подвергаются повторным раундам селекции (рис. 3, шаг 6).

Помимо ДНК-модифицирующих ферментов, метод IVC был использован при селекции бактериальных фосфотриэстераз [15]. Селекция из библиотеки, содержащей более 10^7 вариантов привела к изоляции фермента с k_{cat} больше, чем 10^5 сек^{-1} , что в 63 раза выше, чем в случае дикого типа. Метод IVC так же был использован для селекции на связывающую активность из библиотек, экспонированных на микрогранулах [16].

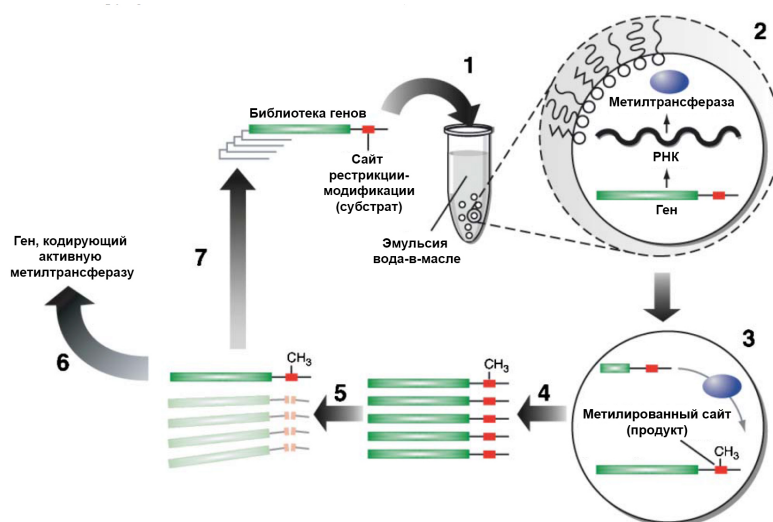


Рис. 3. Схематическое изображение метода компартментализация *in vitro* [14].

1.2.3. Компартментализация *in vitro* в двойных эмульсиях.

Технология компартментализации *in vitro* в двойных эмульсиях использует двойные (вода-в-масле-в-воде) эмульсии, которые потом сортируются с помощью метода FACS. Технология заключается в том, что библиотека генов (рис. 4, стадия 1), кодирующая разные варианты фермента, помещается в эмульсию вода-в-масле так, что в каплю попадает один ген. Гены транскрибируются и транслируются в пределах микрокапли, используя либо бесклеточную систему транскрипции/трансляции, либо компартментализацию отдельных клеток (например, клетки *E.Coli* в которые клонирована библиотека генов) (рис. 4, стадия 2). Далее эмульсия преобразуется в двойную эмульсию вода-в-масле-в-воде и белки с ферментативной активностью модифицируют нефлуоресцентный субстрат в флуоресцентный продукт (рис. 4, стадия 3). Флуоресцентные микрокапли селектируются от нефлуоресцентных микрокапель методом FACS (рис. 4, стадия 4). Затем гены, находящиеся во флуоресцирующих микрокаплях и кодирующие активные ферменты, выделяют (рис. 4, стадия 5). Эти гены могут быть повторно использованы для дальнейших раундов отбора (рис. 4, стадия 6).

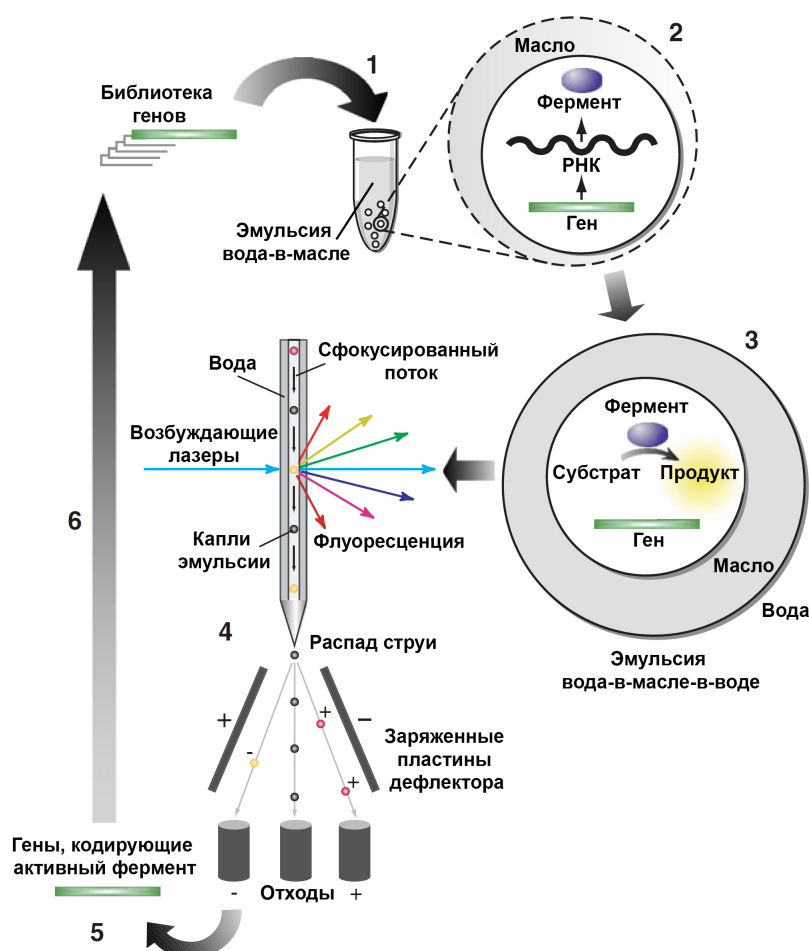


Рис. 4. Схематическое изображение компартментализации *in vitro* в двойных эмульсиях [17].

Этот метод был использован для направленной эволюции сывороточной параоксоназы [18]. Библиотека мутантов параоксоназы (ПОН1), экспрессированная в *E.Coli*, была отсортирована с использованием флуорогенного фосфотриэфира DEPCyC. Гидролитическая активность мутантов ПОН1 к DEPCyC коррелировала с их активностью по отношению к P_S изомеру кумаринового аналога циклозарина. Эффективность одного из вариантов ПОН1 по отношению к данному аналогу была в 10^5 раз выше, чем в случае дикого типа ($\leq 1.75 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$). После дополнительных раундов отбора каталитическая эффективность полученного мутанта составила $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $3.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ и $3.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ для токсических изомеров зомана, циклозарина и зарина, соответственно [19].

Похожий подход был использован для направленной эволюции фермента с β -галактозидазной активностью [17] и субтилизина Карлсберг [20].

1.2.4. Микрофлюидная компартментализация.

Основными задачами микрофлюидики являются процессы манипулирования потоками жидкости на микроуровне и сопутствующие этому эффекты. Одним из наиболее значимых практических приложений микрофлюидики является возможность создания различных типов эмульсий, обладающих уникальной гомогенностью и крайне «мягкими» условиями получения [21]. Фактически микрофлюидная компартментализация позволяет заключать как индивидуальные живые клетки, так и целые микроорганизмы в капли эмульсии одинакового размера (что является основным отличием от компартментализации *in vitro*), сохраняя при этом их уникальные свойства и обеспечивая выживаемость в течение нескольких дней [22].

В настоящее время высокопроизводительный скрининг осуществляется на базе автоматизированных роботизированных станций, однако существует тенденция к переходу молекулярно-биологических и биофармацевтических платформ в формат «лаборатории-на-чипе», что приводит к миниатюризации оборудования, уменьшению расходов на реагенты и эксплуатацию, и что самое главное, многократному увеличению производительности [23, 24].

В работе [25] была использована модельная библиотека для демонстрации преимуществ отбора с помощью микрофлюидной технологии. Авторы показали, что по сравнению со стандартными методами скрининга, высокоэффективные эмульсионные методы в 100 раз эффективнее и в 10^6 раз дешевле.

С помощью микрофлюидной технологии была проскринирована библиотека мутантов пероксидазы хрена представительностью 10^8 вариантов генов, в результате чего был отобран мутант, обладающий каталитической эффективностью в 10 раз выше, чем дикий тип, который сам по себе является очень эффективным ферментом [26].

2. Рациональный дизайн, как средство улучшения каталитической эффективности.

2.1. Рациональный дизайн на основе экспериментальных данных.

Каталитические антитела могут быть использованы в качестве матрицы для улучшения существующих свойств и/или создания новой функциональности.

Первый шаг рационального дизайна состоит в анализе структурных данных, полученных из разных источников (кристаллическая структура; структура, полученная с помощью ЯМР; кинетические данные (стационарная и предстационарная кинетики); термодинамические данные (дифференциальная сканирующая калориметрия, изотермическое калориметрическое титрование)). Все эти данные позволяют получить представление о том, как реакция развивается во времени и пространстве и что может быть рационально изменено для улучшения каких-либо свойств. Рентгеновские структуры высокого разрешения могут определить отдельные аминокислотные остатки или небольшие кластеры аминокислот в качестве претендентов для рационального мутагенеза. Этот подход был применен в ряде работ с использованием антител [27-29] и ферментов [30].

В работе [27] авторы использовали этот подход при соотнесении кинетических данных, полученных для каталитического антитела 43C9 и его структуры, что дало понимание каталитического механизма реакции. Антитело 43C9 гидролизует сложные эфиры и амиды. На основе компьютерной модели этого антитела, авторы выбрали остатки L-Tyr32, L-His91, L-Arg96, H-His35 и H-Tyr95 для сайт-направленного мутагенеза. Замена L-His91 на Gln привела к потере каталитической активности, но аффинность по отношению к лиганду осталась такой же, как и в случае дикого типа. Исходя из этого авторы предположили, что L-His91 является нуклеофилом, который образует ацильный интермедиат. L-Arg96 также оказался важен для катализа, предположительно он образует оксианионную полость для образования тетраэдрического переходного состояния. Замены H-His35 на аспарагин и фенилаланин привели к потере каталитической активности и аффинности к лиганду, что свидетельствует о важной структурной роли этого остатка.

Reymond и соавторы [29] исследовали антитело 10F11, катализирующее обратную реакцию Дильса-Алдера. Рентгено-структурный анализ показал, что между остатком 104 тяжелой цепи H-Trp104, расположенным в нижней части связывающего кармана, и ароматическим кольцом субстрата образуются π - π взаимодействия. Используя кристаллическую структуру этого антитела, авторы выделили ряд аминокислот, которые могут играть важную роль в катализе. Экспериментальные данные показали, что остатки H-Trp104 и H-Phe101 играют

важную роль в катализе. Замена обоих остатков на аланин показала, что триптофан более важен для катализа, чем фенилаланин. Катализ сохраняется, если заменить триптофан в положении 104 на ароматические аминокислоты, такие как тирозин или фенилаланин. В свою очередь, катализ пропадает с неароматическими заменами в данном положении на лейцин, изолейцин, аланин и гистидин. Для доказательства того, что H-Trp104 является каталитическим остатком, был создан мутант L-Leu101Phe, который, исходя из кристаллической структуры, должен был стерически приблизить H-Trp104 к субстрату и, таким образом, увеличить силу взаимодействия. Действительно, мутант L-Leu101Phe обладал улучшенными кинетическими показателями ($k_{cat}/K_M=258 \text{ сек}^{-1}\text{M}^{-1}$ в случае мутанта и $96 \text{ сек}^{-1}\text{M}^{-1}$ в случае дикого типа).

Первые попытки создания мутантов БуХЭ, способных гидролизовать органофосфатные соединения, были основаны на гипотезе, предложенной [31], согласно которой первый этап реакции взаимодействия БуХЭ с ФОТ, то есть стадия фосфорилирования, проходит аналогично стадии ацилирования при гидролизе ацетилхолина, а второй этап существенно отличается от стадии деацилирования при гидролизе ацетилхолина. На стадии деацилирования ацетилхолина, молекула воды, связанная с гистидином, вытесняет ацильную группу от каталитического серина, что приводит к гидролизу. В случае же органофосфатов этого не происходит, так как стерически не возможна атака этой молекулы воды на тетраэдрический атом фосфора в соответствующем этапе органофосфатного гидролиза и, таким образом, не происходит процесса реактивации фосфорилированного фермента с помощью воды. Таким образом, введение нуклеофильного остатка с другой стороны от связи фосфор-серин в активный центр фермента может либо активировать молекулу воды, либо напрямую атаковать аддукт, что будет приводить к реактивации фермента. Учитывая эту схему, остатки G115, G117, G121, E119, L286 и V288 человеческой БуХЭ были заменены на гистидин и только мутант G117H обладал способностью катализировать гидролиз ФОТ. Брумфилд и соавторы [32, 33], заменив глицин на гистидин вблизи оксианионовой полости человеческой бутирилхолинэстеразы, получили эстеразу G117H, которая сохранила эстеразную активность, а так же приобрела способность катализировать гидролиз нескольких органофосфатных

соединений, таких как зарин и VX, однако зоман необратимо ингибировал фермент. Предположительно, этот мутант не способен гидролизовать зоман потому, что скорость дефосфонилирования осталась намного ниже скорости деалкилирования (так называемое «старение» фермента, то есть необратимое ингибирование фермента, которое не поддается всем известным формам химической реактивации). В связи с этой гипотезой авторы предположили вторую модификацию бутерилхолинэстеразы – E197Q [30]. Полученный мутант G117H/E197Q уже обладал способностью гидролизовать зоман.

Однако поиски единичных замен являются сложной задачей, потому что антитела, как и ферменты, объединяют несколько функций для достижения связывания и катализа. Взятые в отдельности, эти эффекты могут быть слишком малы, что бы их можно было идентифицировать. В природе эта проблема решена путем созревания аффинности в ходе эволюции. Практическая реализация созревания аффинности *in vitro* с помощью стохастических мутаций довольно затруднительна.

2.2. Рациональный дизайн на основе компьютерных методов.

Применение современных компьютерных технологий оказывает огромную поддержку экспериментальным работам, позволяя существенно снизить временные и материальные затраты. В биохимии это стало возможным благодаря достижениям лауреатов Нобелевской премии по химии 2013 года. Ее получили Мартин Карплус (Martin Karplus), Майкл Левитт (Michael Levitt) и Ари Варшель (Arieh Warshel) за то, что с помощью классических и квантово-механических методов заложили фундамент для моделирования сложных химических систем, в том числе биомолекул. Сейчас сочетание классического и квантового подходов считают стандартом, но нынешние нобелевские лауреаты впервые совместили их, используя оба метода для расчета одной системы. Сложность одновременного использования классического и квантового подходов состоит в том, что модели, описывающие молекулы с помощью классической механики, рассматривают атомы и группы атомов как целое — у них гораздо меньше степеней свободы, и их проще проанализировать с помощью компьютера. Квантово-химические модели описывают отдельно электроны и ядра, что дает такое количество вариантов,

которое не возможно рассчитать даже с использованием суперкомпьютеров. В настоящее время квантово-химическими методами возможно провести расчеты лишь для относительно простых молекулярных систем. Нобелевские лауреаты разработали комбинированный подход [34, 35]. Он сочетает квантово-химический подход, опирающийся на принципы квантовой механики (КМ), в котором система представляет собой совокупность электронов и ядер атомов, который применяется к активному центру, и метод молекулярной механики (ММ), в котором атом рассматривается как материальная точка, с помощью которого описывают остальную часть системы (рис. 5). В молекулярной механике молекула представляется совокупностью взаимодействующих атомов.

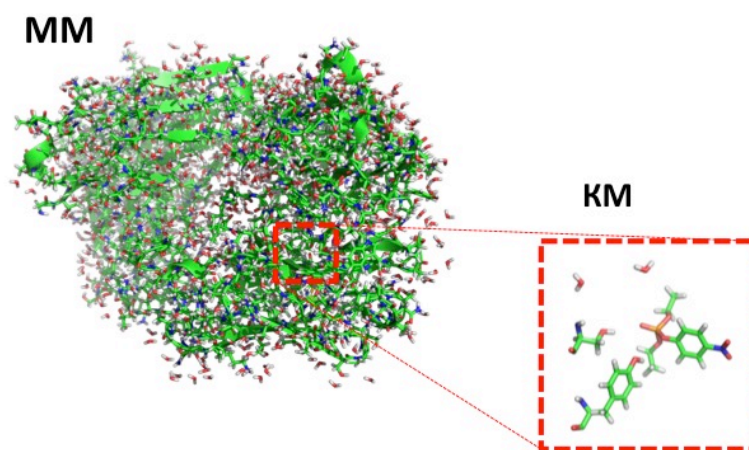


Рис. 5. Метод КМ/ММ. Методы КМ описывают активный центр белка, методы ММ описывают остальную часть системы.

Методами ММ можно описывать большие молекулярные системы (белки, 10^6 - 10^9 атомов). Однако ММ методы не пригодны для описания разрывов и образования химических связей. В КМ подходах моделью молекулы является устойчивая система ядер и электронов. С помощью квантово-механических методов можно рассчитать образование и разрыв связей, но это возможно сделать только для не больших (меньше 1000 атомов) систем.

Основное преимущество КМ/ММ методов заключается в их способности количественно описывать химические структуры, энергии и реакции. Хотя экспериментальные методы, такие как рентгеновская кристаллография, ЯМР и другие спектроскопические методы имеют решающее значение для изучения структуры фермента, они порой не в состоянии ответить на вопросы относительно

детализации каталитического механизма. Вычислительные методы позволяют напрямую оценить характеристики комплексов фермент-субстрат и фермент-продукт, а также метастабильных интермедиатов и переходных структур. Моделирование также позволяет разложить энергию реакции на индивидуальные составляющие. Таким образом, компьютерное моделирование может дать важную информацию, которая является дополнением к экспериментальным данным [36].

2.2.1. Направленное улучшение ферментов.

Одним из примером использования методов гибридного КМ/ММ подхода являются расчёты для создания мутантов ферментов с более высокой каталитической активностью по отношению к субстрату. Техника молекулярного докинга позволяет определить аминокислоты, ответственные за связывание лиганда, и типы молекулярных взаимодействий, которые играют критическую роль для процесса реакции. Определенные таким образом аминокислотные остатки являются потенциальными мишенями для сайт-направленного мутагенеза. Молекулярный докинг часто используется для рационального дизайна ферментов. Программы для докинга симулируют как целевая макромолекула (фермент, рецептор, нуклеиновые кислоты) взаимодействуют с маленькими молекулами лигандов (субстраты, ингибиторы). Более успешной является комбинация молекулярного докинга и молекулярной динамики (МД). Преимущество этой комбинации заключается в том, что методы дополняют друг друга: молекулярный докинг используется для того, чтобы найти правильную конформацию лиганда, а затем МД применяется для оптимизации сложных структур.

Этот метод был успешно использован в работе [37] при редизайне бутирилхолинэстеразы (БухЭ) в качестве анти-кокаинового препарата. Для рационального дизайна мутантов ферментов с более высокой каталитической активностью по отношению к субстрату, необходимо спроектировать мутацию, которая может ускорить лимитирующую стадию всего каталитического процесса, в то время как другие стадии реакции мутацией не замедляются. Молекулярная динамика была использована для симуляции образования переходного состояния для первой стадии реакции гидролиза (-)-кокаина бутирилхолинэстеразой и ее мутантами. Результаты моделирования показали, что процессы образования водородных связей между карбонильным кислородом бензоильного эфира (-)-

кокаина и оксианионной полостью БуХЭ являются скорость-лимитирующими для первого переходного состояния и могут быть ускорены за счет мутаций A199S/S287G/A328W/Y332G. Таким образом, симуляция переходного состояния предсказала, что этот мутант должен обладать значительно более низким энергетическим барьером и, вследствие этого, более высокой каталитической эффективностью гидролиза (-)-кокаина. Теоретические предсказания были подтверждены с помощью экспериментальных данных, которые показали увеличение активности мутанта в 456 раз по сравнению с диким типом. Однако, даже если бы этот мутант прошел клинические испытания, использование его в качестве лекарства при отравлениях (-)-кокаином крайне маловероятно – из-за необходимости использования высокой дозы БуХЭ (5 мг/кг) для защиты от летальной дозы кокаина. Поэтому авторы продолжили поиски мутанта с более высокой каталитической эффективностью.

Основываясь на предыдущих исследованиях, говорящих о том, что каталитическая эффективность БуХЭ или ее мутантов коррелирует с силой водородных связей между кокаином и ферментом, авторы предположили, что мутации аминокислот, не находящихся в активном центре, могут влиять на водородные связи и тем самым влиять на каталитическую активность фермента [38]. Авторы использовали полученный ранее в работе [37] мутант БуХЭ в качестве стартовой точки для дальнейших улучшений с помощью гибридных КМ/ММ расчетов. На основе полученного ранее мутанта БуХЭ A199S/S287G/A328W/Y332G, авторы создали виртуальную библиотеку, состоящую из одной, двух или трех замен аминокислот, находящихся на расстоянии 20 Å от субстрата, связанного мутантом. Размер библиотеки составил $6,7 \times 10^4$ вариантов. Для всех мутантов была определена энергия образования водородных связей. Наибольшей энергией обладал мутант A199S/F227A/P285A/S287G/A328W/Y332G. Экспериментальные данные показали, что его каталитическая эффективность по отношению к (-)-кокаину оказалась в 4500 раз выше, чем в случае БуХЭ дикого типа. Новые мутации не внесли дополнительных водородных связей, однако они не в прямую влияют на существующие водородные связи, тем самым стабилизируя переходное состояние и улучшая каталитическую активность. Эксперименты на мышах показали, что

минимальная защитная доза полученного мутанта – 150 мкг/кг – обеспечивает защиту от летальной дозы кокаина (180 мг/кг).

Металлопротеиды составляют почти половину всех белков в природе. Металл-связывающие сайты катализируют важные биологические процессы, такие как фотосинтез, дыхание, молекулярное восстановление кислорода, фиксация азота и другие [39]. В работе [40] с помощью программы RosettaMatch был разработан метод для изменения реактивности функциональных групп активного сайта металлофермента аденозиндеаминазы, в результате чего была получена мышьяная цинк-содержащая аденозиндеаминаза, катализирующая гидролиз P_R изомера кумаринового аналога циклозарина в 10^7 раз эффективнее, чем дикий тип.

2.2.2. Изучение механизмов реакции ферментов.

В настоящее время методы гибридного КМ/ММ подхода широко используются для изучения белковых систем. С помощью КМ/ММ методов был подтвержден механизм гидролиза пептидогликанов лизоцимом через стадию образования ковалентного интермедиата [41]. Ранее полагали, что в соответствии с механизмом Филлипса реакция идет по диссоциативному S_N1 механизму через образование карбоксоний-иона (рис. 6 левая часть). Положительный заряд этого интермедиата электростатически стабилизируется отрицательным зарядом карбоксильной группы Asp52. Однако существовала и другая схема, предложенная Кошландом. Согласно этой схеме, реакция протекает по S_N2 механизму с образованием ковалентного интермедиата между Asp52 и N-ацетилмурамовой кислотой (рис. 6 правая часть).

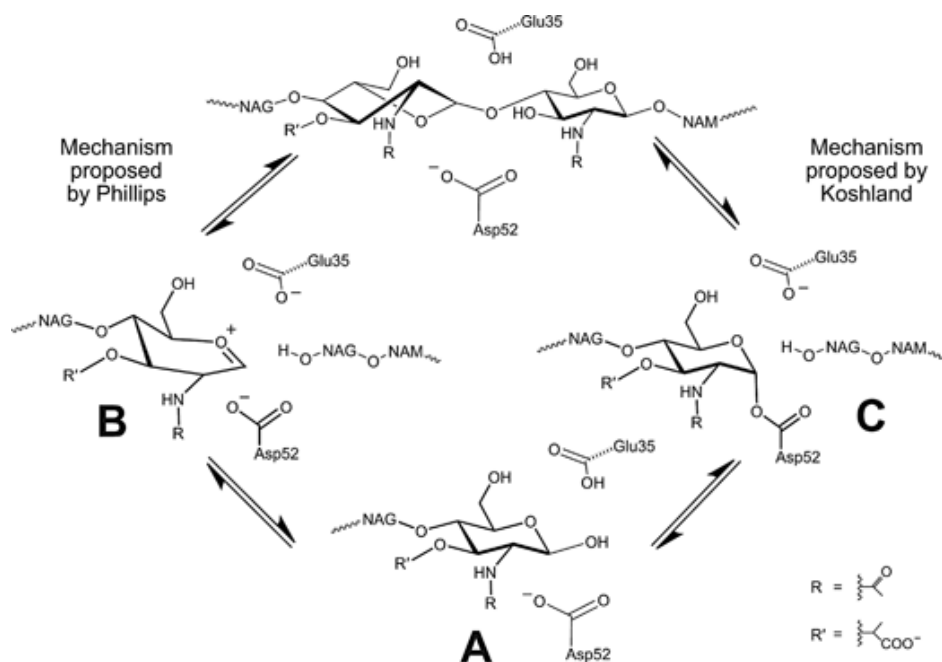


Рис. 6. Два предложенных механизма гидролиза пептидогликанов ферментом лизоцим [41].

Авторы работы [41] использовали методы КМ/ММ для расчёта данной реакции и показали, что ковалентный интермедиат значительно стабильнее карбоксоний-иона, примерно на 30 ккал/моль. Что совместно с данными кристаллографии и масс-спектрометрии доказывает S_N2 механизм реакции.

Цитратсинтаза (ЦС) является примером хорошо изученного фермента, для которого установление детального механизма реакции на экспериментальном уровне оказалось затруднительной задачей. ЦС катализирует первую реакцию цикла Кребса – реакцию конденсации ацетата (ацетил-кофермента А (ацетил-КоА)) и оксалоацетата, в результате чего образуется цитрат. Этот процесс включает в себя отрыв протона от ацетил-КоА (енолизацию), затем конденсацию депротонированного ацетил-КоА с оксалоацетатом, что приводит к образованию интермедиата – цитрил-КоА (рис. 7) и, наконец, гидролиз интермедиата с образованием цитрата и КоА.

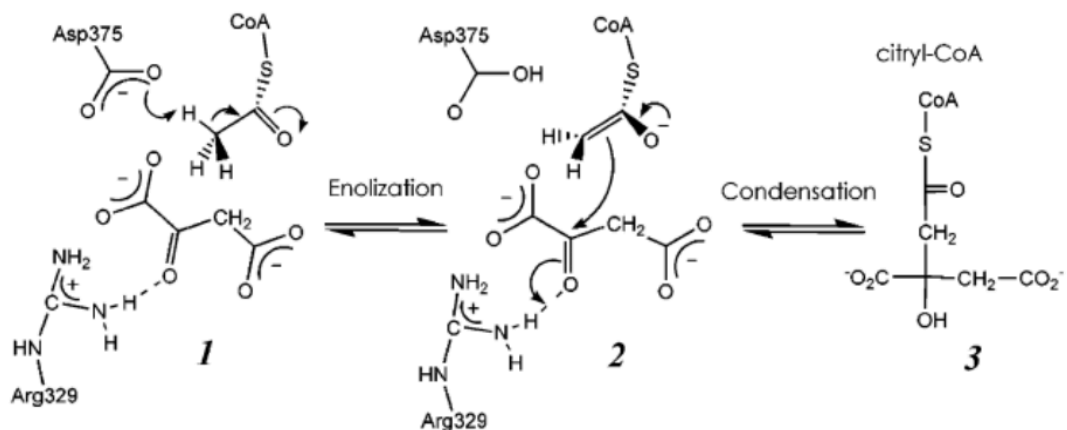


Рис. 7. Механизм образования цитрил-КоА [42].

Природа образования интермедиата с помощью отрыва протона от ацетил-КоА была не ясна. Возникали споры является ли интермедиат енолятом, енолом (образованным протонным трансфером от His274 ЦС) или “енольной” формой, с так называемой низко-барьерной водородной связью между His274 и кислородом ацетил-КоА (рис. 8) [43].

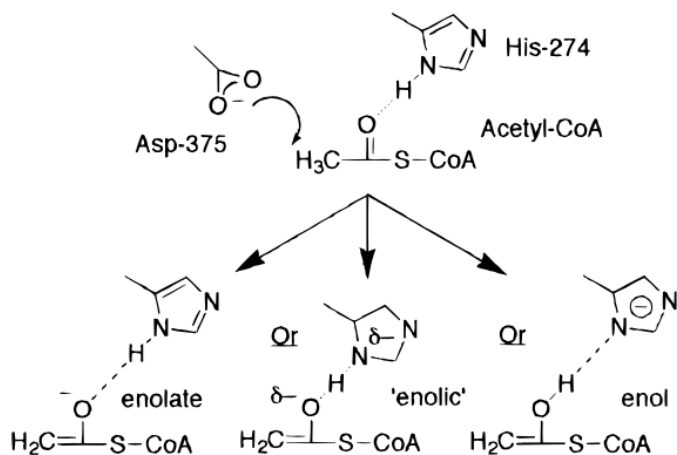


Рис. 8. Возможные пути образования интермедиата [44].

Компьютерные исследования с помощью КМ/ММ показали, что образование енолята является энергетически наиболее выгодным [44-46]. С помощью КМ/ММ расчетов было показано, что донорами водородных связей выступают His274 и

кристаллографически наблюдаемая молекула воды, что обеспечивает значительную стабилизацию интермедиата – енолята. Обе водородные связи являются обычными, т.е. не низко-барьерного типа. Енолят атакует карбонильный углерод оксалоацетата, образуя новую углерод-углеродную связь. Чтобы перейти в стабильный интермедиат (цитрил-КоА), должен произойти перенос протона на карбонильный кислород. Однако было не понятно, кто выступает донором протона. Было высказано предположение, что им может быть остаток His320 [47], но моделирование показало, что близлежащие гистидины заряжены нейтрально [48]. Недавнее КМ/ММ моделирование с использованием высокого уровня теории показало, что Arg329 может образовывать водородную связь с карбонильным кислородом оксалоацетата и тем самым выступать в качестве кислоты, отдавая протон [42]. Участие остатка аргинина в кислотно-основном катализе – это довольно противоречивый процесс, хотя он и был предложен для нескольких ферментов [49, 50]. Расчетный энергетический барьер реакции составил 14.2 ккал/моль, что согласуется с экспериментальными данными (14,7 ккал/моль). Механизм использования Arg329 в роли кислоты, позволяет избежать избыточной стабилизации в интермедиате цитрил-КоА.

Установление подробного химического механизма ферментативных реакций является областью, в которой методы КМ/ММ моделирования оказываются бесценными. Понимание механизма реакции может иметь огромную практическую значимость, например в случае ферментов, которые являются мишенями для дизайна лекарственных препаратов. Знание переходного состояния ферментативной реакции несет в себе огромный потенциал, возможность создавать высоко-аффинные лекарственные препараты, которые имитируют переходное состояние и, таким образом, ингибируют целевой фермент.

Гидролаза амидов жирных кислот (ГАЖК) играет важную роль в инактивации амидов жирных кислот, таких как анандамид и олеамид, которые присутствуют в мембранах клеток центральной и периферической нервной системы и выступают в качестве сигнальных молекул. ГАЖК является перспективной мишенью для создания препаратов для лечения заболеваний центральной и периферической нервной системы, таких как тревожные расстройства и гипертония. В этом свете понимание каталитического механизма

ГАЗК может помочь в разработке новых ингибиторов, которые могли бы обеспечить активность и селективность, требуемые для клинического применения. ГАЗК относится к семейству сериновых гидролаз. Рентгеновская кристаллография и мутагенез показали, в отличие от классической триады серин-гистидин-аспартат, найденной в большинстве сериновых гидролаз, каталитический центр этого фермента состоит из триады Ser217-Ser241-Lys142. В работе [51] был смоделирован первый этап ацилирования олеамида ГАЗК (рис. 9).

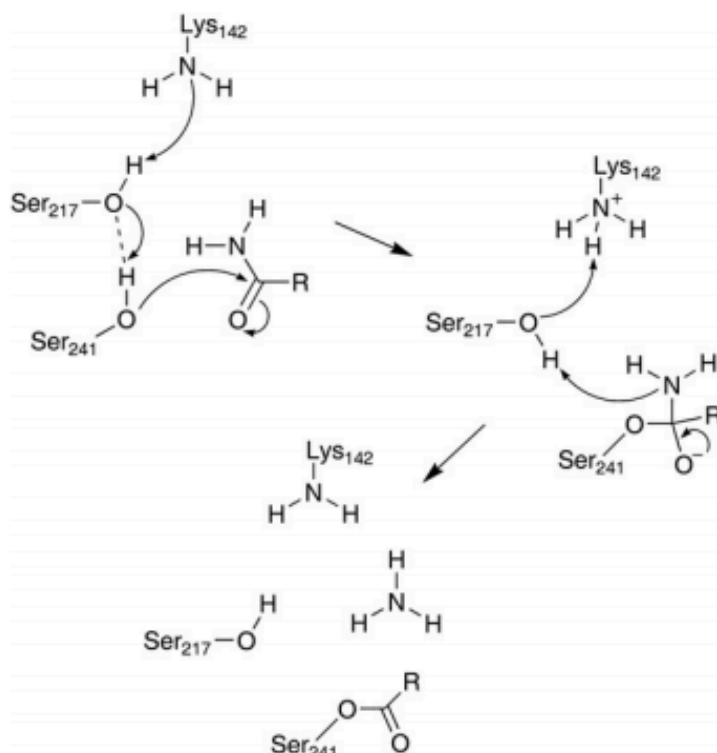


Рис. 9. Образование интермедиата – ацил-фермента [51].

Поверхность потенциальной энергии показала ключевые стадии процесса ацилирования: оттягивание протона от Ser217 лизином142; оттягивание протона от Ser241 серином217; атака Ser241 на карбонильную группу олеамида; образование тетраэдрического интермедиата. Расчетный барьер в 18 ккал/моль согласуется с экспериментальным значением (16 ккал/моль). Этот механизм был подтвержден в работе [52] с использованием PDDG-PM3/OPLS-AA КМ/ММ Монте-Карло моделирования образования тетраэдрического интермедиата.

Человеческая бутирилхолинэстераза (БухЭ) признана одним из наиболее

перспективных антидотов для фосфорорганических нервно-паралитических агентов. БуХЭ, фосфорилированные ФОТ, может пойти по трем возможным пост-ингибиторным путям: (1) спонтанная реактивация молекулой воды, что приводит к восстановлению ферментативной активности, (2) нуклеофил-индуцированная реактивация, восстанавливающая ферментативную активность, (3) “старение” фермента, которое происходит в результате деалкилирования фосфорилированной холинэстеразы, что приводит к необратимому ингибированию фермента. Было показано, что мутант G117H обладает улучшенной активностью против таких фосфорорганических соединений, как зарин и VX, однако он неактивен по отношению к зоману, одному из самых токсичных ФОТ [33]. Дальнейшие исследования привели к появлению двойного мутанта G117H/E197Q, который был способен гидролизовать зоман [30]. Для получения более улучшенных мутантов БуХЭ, инактивирующих ФОТ, важно понять, как мутация G117H и E197Q влияют на действие БуХЭ.

Используя молекулярную динамику, авторы [53] исследовали мутанты БуХЭ G117H/E197Q и G117H и показали, что остаток N117 координирует молекулу воды во всех независимых МД симуляциях. Было установлено, что эта молекула воды взаимодействует с другой молекулой воды, которая располагается в оксианионовой полости. Предполагается, что молекула воды в оксианионовой полости замещается фосфорильным кислородом в процессе ингибирования органофосфатной молекулой. Однако молекула воды, координированная остатком N117 должна оставаться неизменной. Таким образом, при ковалентном связывании органофосфатных соединений в активном центре эта молекула воды, связанная с N117, может выступать в роли нуклеофила при гидролизе орнагофосфатного соединения.

Так как остаток E197 расположен вблизи каталитического серина198, замена его может повлиять на электронную среду и конформационную устойчивость в активном центре. Экспериментально показано, что мутант E197Q имеет примерно в 11 раз меньшую холинэстеразную активность, чем БуХЭ дикого типа [30], а так же не имеет никакой повышенной активности по отношению к фосфорорганическим токсинам. В ходе МД симуляции мутантов E197Q и

G117H/E197Q было найдено, что остаток Q197, в отличие от остатка E197 в БуХЭ дикого типа, может быть расположен в двух различных ориентациях как в случае одиночного, так и в случае двойного мутанта. Однако авторы не смогли с помощью МД моделирования дать прямые доказательства участия E197Q в замедлении процесса старения фермента.

Результаты, идущие в разрез с результатами работы [53] были опубликованы в статье [54]. Авторы, используя КМ/ММ методы, показали, что в случае G117H мутанта человеческой БуХЭ, атакующая молекула воды занимает ту же позицию, что и в случае дикого типа БуХЭ, а так же, что другая молекула воды не может располагаться вблизи H117, демонстрируя то, что H117 не может выступать в качестве основания при спонтанной реактивации (то есть не может активировать молекулу воды, которая будет инициировать нуклеофильную атаку на атом фосфора). Реакция реактивации мутанта G117H с заринном также, как и в случае фермента дикого типа, состоит из двух стадий. Первая стадия совпадает с БуХЭ дикого типа: нуклеофильная атака на атом фосфора зарина атомом кислорода молекулы воды, что происходит одновременно с переносом протона от молекулы воды на боковую цепь H438. Однако вторая стадия в случае мутанта отличается от второй стадии БуХЭ: пространственная реорганизация, которая не происходит во втором этапе реакции БуХЭ дикого типа, участвует в втором этапе реакции мутанта G117H. Эта реорганизация приводит к тому, что атом кислорода боковой цепи каталитического S198 находится вблизи от протонированного H438, что облегчает уход кислорода боковой цепи S198 от атома фосфора. Вторая стадия реакции является скорость-лимитирующей стадией всего процесса для мутанта G117H. Расчетный энергетический барьер составил 23,9 ккал/моль, что согласуется с экспериментальными данными (23,0 ккал/моль).

Ацетилхолинэстераза принадлежит семейству сериновых гидролаз, которые используют хорошо известную каталитическую триаду серин-гистидин-глутамин (аспарагин). Замена любого из этих остатков на аланин значительно снижает каталитическую эффективность. Основным механизмом реакции ацилирования в случае АцХЭ и других ферментов этого семейства хорошо известен: серин служит нуклеофилом, который атакует карбонильный кислород эфира ацетилхолина, в то

время как протон гидроксила серина связывается гистидином. Это приводит к образованию ковалентного тетраэдрического интермедиата. Далее уходящая группа забирает протон от гистидина, что приводит к образованию ацил-фермента (рис. 10). Однако роль третьего участника каталитической триады – глутамина – остается под вопросом.

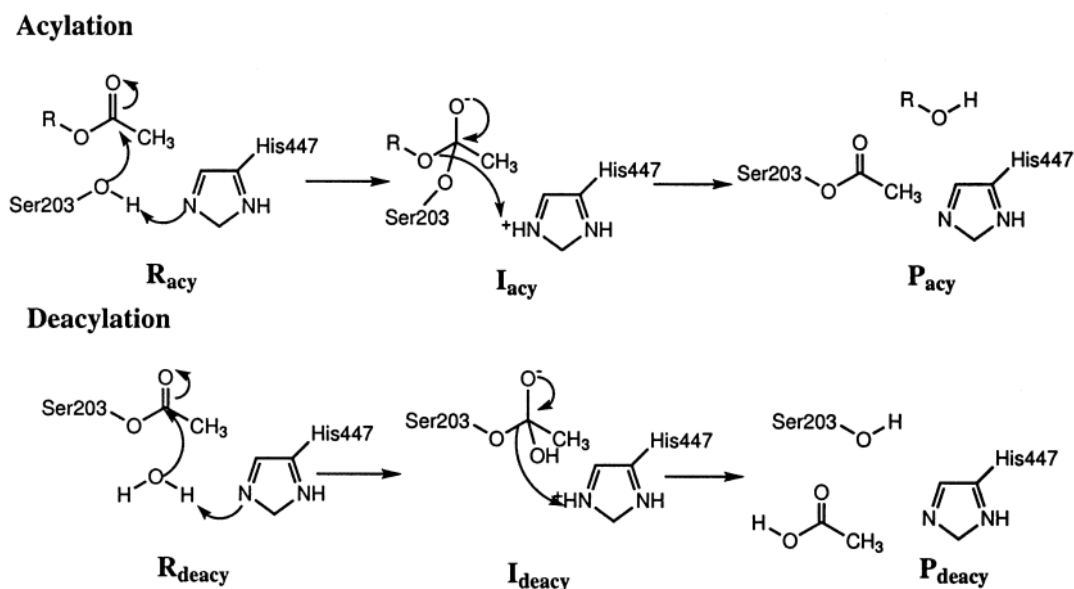


Рис. 10. Механизм реакции гидролиза ацетилхолина, катализируемой ферментом ацетилхолинэстеразой [55].

Компьютерные исследования с помощью *ab initio* КМ/ММ расчетов [55] показали, что роль одного из участников каталитической триады – Glu334 – это стабилизация с помощью электростатических взаимодействий протонированного гистидина в переходном состоянии и в состоянии ацил-фермента.

Недавние исследования [56] двух ингибиторов ацетилхолинэстеразы (TFK⁺ и TFK⁰) и мутанта фермента, в котором каталитический His447 был заменен на изолейцин (His447Ile) показали неожиданные результаты.



Рис. 11. Химические структуры TFK⁺ и TFK⁰.

TFK⁺ (m-(N,N,N-триметиламмоний)трифлуороацетофенон (TMTFA)) (рис. 11), известный ингибитор АцХЭ, может реагировать с мутантом АцХЭ His447Ile. В отличие от него, нейтральный аналог ингибитора TFK⁺ – TFK⁰, не показал активности с His447Ile мутантом, в то время как при реакции с АцХЭ дикого типа он показывает небольшое уменьшение связывания по сравнению с TFK⁺. Чтобы исследовать эту интригующую разницу в реакционной способности АцХЭ дикого типа и мутанта His447Ile с ингибиторами, Cheng с со-авторами [56] использовали метод B3LYP/6-31G(d)/AMBER95 КМ/ММ-FE для моделирования реакции. Формирование тетраэдрического интермедиата АцХЭ дикого типа с обоими ингибиторами происходило без активационного барьера. Моделирование реакции взаимодействия мутантного фермента с TFK⁺ с помощью молекулярной динамики показало, что молекула воды перемещается в положение, сходное с положением имидазольного кольца His447 фермента дикого типа, где формируется стабильные взаимодействия с двумя остатками Ser203 и Glu334 из каталитической триады и Ser229. Однако такое поведение молекулы воды никогда не наблюдалось в эквивалентных моделированиях с ингибитором TFK⁰ и, даже если молекулу воды принудительно задать в положение между Ser203 и Glu334 (что наблюдалось в моделировании с ингибитором TFK⁺), она покидала систему в течении первых наносекунд моделирования. Чтобы убедиться, что молекула воды может "заменить" His447 в оригинальной каталитической триаде (т.е. она может выполнять подобную функцию), моделирование реакции было выполнено с помощью КМ/ММ-FE, которое показало, что вода участвует в процессе формирования тетраэдрического интермедиата при связывании TFK⁺ с мутантным ферментом: вода забирает протон от Ser203 и отдает один из протонов Glu334 (рис. 12).

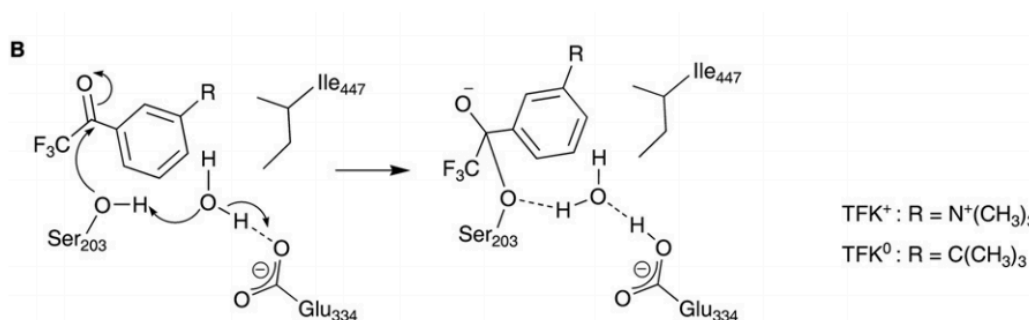


Рис. 12. Формирование ковалентного комплекса фермент-ингибитор (TFK⁺) в случае His447Ile [56].

Высота барьера варьируется в зависимости от начальных состояний и уровня КМ теории, но средний энергетический барьер составил около 8 ккал/моль, указывая на то, что предполагаемая реакция осуществима. Таким образом, КМ/ММ-FE и молекулярная динамика объяснили механизм связывания ингибитора TFK⁺ с мутантом АцХЭ, в котором каталитический остаток гистидина из каталитической триады заменен на изолейцин.

2.2.3. Создание ферментов *de novo*.

Дизайн белков *de novo* с применением методов структурной биоинформатики является активно развивающейся областью. Полученные результаты используются как в диагностике и лечении различных заболеваний, так и для создания новых биологических катализаторов.

В условиях, когда ограниченное число мутантов белков может быть экспериментально проверено, вычислительные методы дают возможности для создания широкого спектра новых белков: создание новых аминокислотных последовательностей для существующих структур [57, 58]; создание новых белков с уникальной последовательностью и ранее неизвестной топологией [59, 60]; создание ферментов с измененной субстратной специфичностью [61]; создание ферментов с совершенно новой каталитической активностью [62, 63]; создание ферментов с оптимизированной связывающей аффинностью [64, 65]; создание новых пар связывающихся белков с направленной аффинностью и специфичностью [66]; создание вариантов с улучшенной термостабильностью [67] или иммуногенностью [68, 69] и так далее.

Прорывом в создании ферментов *de novo* является создание ферментов, катализирующих реакции, для которых не существует природных ферментов: реакция элиминации Кемпа [70], реакция Дильса-Алдера [63] и обратная альдозная реакция [71]. Этот прорыв стал возможен благодаря разработке вычислительных методов для эффективного дизайна различных комбинаций молекул и атомов внутри белков, способствующих к осуществлению любых химических реакций, прежде всего тех, которые не могут быть катализированы природными ферментами.

Создание ферментов *de novo* включает в себя несколько этапов. Во-первых, необходимо выбрать целевую реакцию и соответствующий каталитический механизм, в том числе определить все необходимые функциональные группы. Во-вторых, с помощью методов квантовой механики создается идеальный активный центр, который так позиционирует каталитические остатки, что создается максимальная стабилизация переходного состояния. Эти структуры, называемые “теозимы” (theozyme, **theoretical enzyme**, теоритический фермент) [72], далее встраиваются в разнообразные белковые каркасы. Полученные комплексы оптимизируются *in silico* с помощью комбинаторного поиска аминокислотных замен, которые приведут к улучшению связывания переходного состояния [73]. И, наконец, все полученные структуры фильтруются на основе их энергии связывания переходного состояния, соответствия проектируемого связывающего кармана и переходного состояния. Завершают процедуру создания *de novo* ферментов экспериментальная характеристика лидирующих теозимов.

Элиминация Кемпа – реакция превращения бензизоксазола в салицилонитрил – не встречающийся в природе процесс химической трансформации, в ходе которой происходит протонный перенос в атомах углерода. Активация этого протонного переноса в обычных условиях крайне затруднена из-за высоких энергетических барьеров, но в результате длительных экспериментов группе Хоука–Бейкера [70] удалось сконструировать ферменты-прототипы, способные инициировать эту трансформацию. Реакция элиминации Кемпа протекает с образованием одного промежуточного состояния, в котором основание (положительно заряженный аминокислотный остаток) депротонирует углерод и рассеивает получившийся отрицательный заряд, а другая группа (донор водородной связи) стабилизирует частичный отрицательный заряд на атоме кислорода фенола. Эта реакция может быть ускорена за счёт стабилизации переходного состояния (рис. 13А) за счёт депротонирования атома углерода основанием, а также при помощи водородной связи. Авторы использовали два возможных варианта строения каталитического центра: одиночный карбоксильный остаток боковых цепей аспартата или глутамата (рис. 13В слева) и имидазольная группа гистидина, позиционированная и поляризованная расположенными рядом аспартатом или глутаматом (рис. 13В справа).

Карбоксильные остатки депротонируют субстрат, а ароматические остатки сайта связывания ещё больше способствуют стабилизации переходного состояния за счёт стэкинга. Для каждого варианта каталитического основания были перепробованы все возможности по стэкингу (Trp, Tyr, Phe) и донору водородной связи (Lys, Arg, Ser, Tyr, His, молекула воды), далее эти конфигурации служили «отправной точкой» для программы RosettaMatch, «достраивавшей» фермент на одном из выбранных вариантов остова белка.

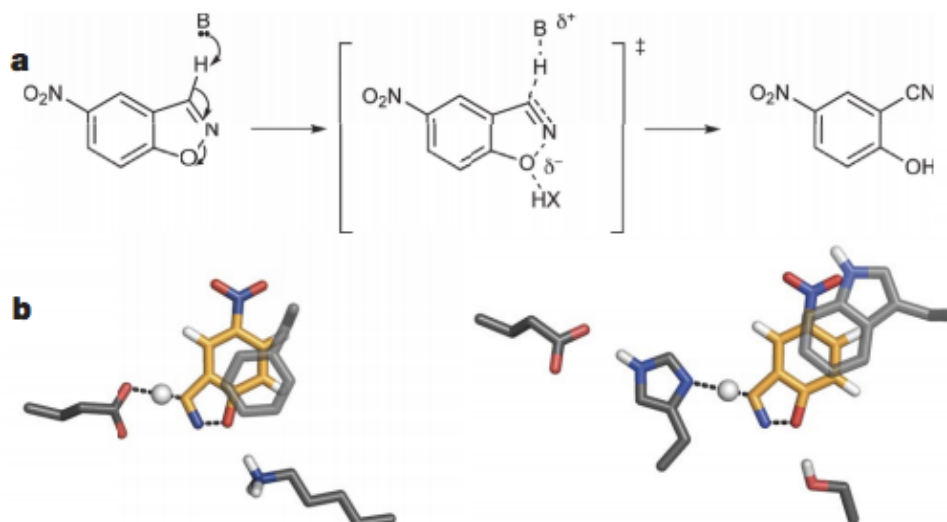


Рис. 13. Схема реакции (A) и каталитические мотивы (B), использованные в работе [70].

Для обоих исследуемых случаев авторы включили дополнительные функциональные группы для облегчения катализа с использованием КМ/ММ методов. Донор водородной связи был введен для нейтрализации получающегося отрицательного заряда на фенольном кислороде. Для каждого из вариантов каталитического центра КМ/ММ методы использовались для оптимизации положения и ориентации каталитических остатков. 59 мутантов, 39 из которых содержали аспаргат или глутамат в качестве основания, а 20 содержали диады гистидин-аспаргат или гистидин-глутамат, были экспериментально охарактеризованы, в результате 8 мутантов оказались активными. Рентгено-структурный анализ одного из активных мутантов (KE07) показал высокое сходство с компьютерной моделью. Однако созданные мутанты были более чем на порядок менее эффективны, чем каталитическое антитело 34E4, катализирующее реакцию Кемпа, полученное ранее [74], поэтому мутанты KE07, KE70 и KE59 были

использованы в качестве матрицы для дальнейшего случайного мутагенеза. В результате были получены мутанты, обладающие в 200 раз большей эффективностью (k_{cat}/K_M), чем исходный фермент KE07 [75], в 400 раз большей эффективностью, чем KE70 [76] и в 2000 раз большей эффективностью, чем KE59 [77].

Похожий подход использован в работе [78], в которой исследовали элиминацию Кемпа, катализируемую каталитическим антителом 34E4 и его Glu50Asp мутантом. Экспериментально показано, что удаление одной метиленовой группы привело к 30-кратному уменьшению эффективности катализа реакции Кемпа. Авторы использовали расчеты возмущения свободной энергии (Free energy perturbation) в сочетании с КМ/ММ Монте Карло симуляцией. По сравнению с диким типом, рассчитанный активационный барьер для мутанта увеличился на 2,4 ккал/моль, это соответствует 60-кратному уменьшению активности, что соотносится с экспериментальными данными.

Реакция Дильса-Альдера – реакция [4+2]-циклоприсоединения диенофилов и сопряжённых диенов с образованием шестичленного цикла (рис. 14). Используя метод иммунизации аналогом переходного состояния реакции было получено антитело 1E9, катализирующее реакцию Дильса-Альдера [79]. Спустя год было получено каталитическое антитело 39A11, полученное с использованием другого гаптена [80]. Следует отметить, что ферменты, катализирующие эту реакцию, не описаны и скорее всего не существуют. Полученное антитело 39A11, названное авторами Дильс-Альдеразой, избирательно катализирует неблагоприятную в обычных условиях экзо-атаку на диен. Серия сайт-направленного мутагенеза [81] позволила получить мутант антитела с увеличенной на порядок каталитической активностью.

В 1998 году была получена пространственная структура этого антитела, которая позволила детально описать механизмы связывания исходных веществ в активном центре и снижения энергетического барьера превращения [82].

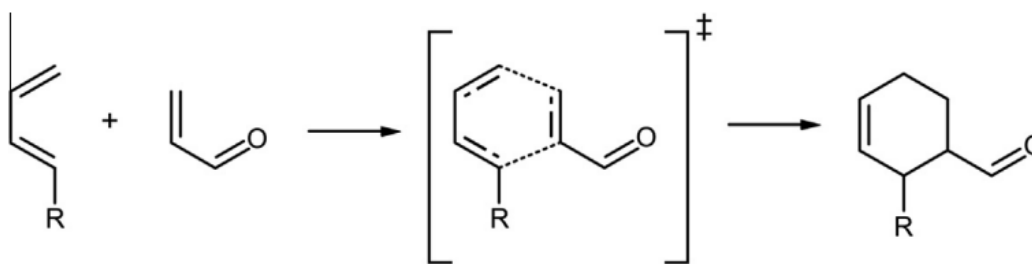


Рис. 14. Реакция Дильса-Альдера.

Первый *de novo* созданный фермент, катализирующий реакцию Дильса-Альдера с высокой стерео- и субстратной специфичностью, был описан авторами в работе [63]. С точки зрения теории граничных орбиталей, реакцию можно представить как взаимодействие высшей занятой молекулярной орбитали (ВЗМО) электронодонорного диена и низшей свободной молекулярной орбитали (НСМО) диенофила. Уменьшение энергетического интервала между ВЗМО и НСМО должно привести к уменьшению энергии активации и, таким образом, увеличить скорость реакции. Это было достигнуто путем позиционирования акцептора водородной связи таким образом, что бы он взаимодействовал с NH-группой карбамата диена (повышая энергию ВЗМО и нейтрализуя положительный заряд, накапливающийся в переходном состоянии), в то время как донор водородной связи взаимодействует с карбонильной группой диенофила (понижая энергию НСМО и нейтрализуя отрицательный заряд, накапливающийся в переходном состоянии). КМ расчеты предсказали, что эти водородные связи могут стабилизировать переходное состояние на 4,7 ккал/моль. В дополнение к электронной стабилизации, связывание двух субстратов в оптимальной для реакции ориентации будет приводить к большему увеличению каталитической эффективности за счет снижения энтропии. Таким образом, белок со связывающим карманом, в котором происходит правильное позиционирование двух субстратов в соответствующей ориентации и в котором соответствующим образом размещены донор и акцептор водородных связей, будет эффективным катализатором реакции Дильса-Альдера (рис. 15). Программа RosettaMatch была использована для поиска стабильных белковых каркасов, которые позволили бы нужному активному центру быть размещенным без существенных стерических проблем с белковым остовом. Из 10^{19} различных белковых структур было отобрано

84, которые удовлетворяли всем требованиям и только две из них показали каталитическую активность в опытах *in vitro*. После нескольких раундов направленной эволюции был получен мутант, обладающий в 100 раз большей эффективностью, чем исходный фермент.

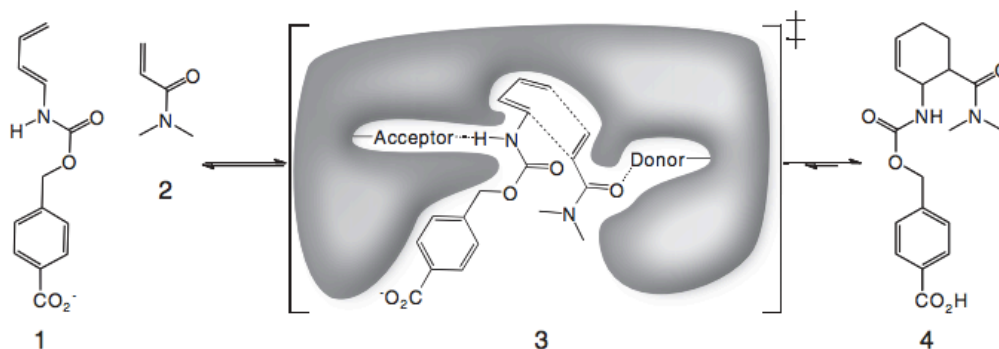


Рис. 15. Реакция Дильса-Альдера. Диен (1) и диенофил (2) подвергаются реакции [4+2]-циклоприсоединения (3) с образованием хирального циклогексенового кольца (4). На стадии (3) схематически показан активный сайт с акцептором и донором водородных связей, которые активируют диен и диенофил. Активный сайт ориентирует субстраты в позиции, оптимальной для катализа [63].

Обратная альдольная реакция – реакция, в ходе которой происходит разрыв углеродно-углеродных связей. Базовая альдольная реакция является важнейшим химическим процессом в живых организмах, способствующим синтезу углеводов, а также широко используется в фармацевтике и в промышленном производстве различных химических соединений. Что же касается обратной альдольной реакции, обнаружение химических механизмов, обеспечивающих быстрый и эффективный разрыв углеродных связей, в идеале может привести к значительному прогрессу технологий очистки органических отходов и создания возобновляемых источников энергии. В 1995 году группой Лернера был описан альтернативный традиционному способу получения абзимов – метод реакционной иммунизации [83]. Данный метод основан на иммунизации животных гаптенами на основе ковалентных ингибиторов сериновых гидролаз. Предполагается, что такие антигены будут образовывать ковалентный комплекс с антителами, обладающими подходящей структурой активного центра и, таким образом, стимулировать пролиферацию соответствующих клонов В-клеток. Этим способом были получены антитела 38C2 и 33F12 со свойствами альдолазы. Иммунизация мышей проводилась гаптеном на

основе 1,3-дикетона, который при реакции с первичной аминогруппой образует амид, являющийся промежуточным продуктом целевой реакции. Авторы предположили, что подобный гаптен будет способствовать образованию антител, содержащих остаток лизина в антигенсвязывающем центре. Ковалентная связь ϵ -аминогруппы лизина с гаптенем обеспечит наивысшее сродство антитела к антигену. Для формирования связи аминогруппа лизина должна выступать в качестве нуклеофила в каталитическом центре антитела и образовывать ковалентный комплекс с кетоном на промежуточной стадии реакции альдольной конденсации. В свою очередь, структура дикетона будет индуцировать структуру активного центра антитела, способную связывать оба субстрата одновременно. Рентгено-структурный анализ показал, что полученные моноклональные антитела действительно образовывали ковалентный комплекс (амид) с молекулой дикетона через остаток лизина [6].

Высокая каталитическая эффективность одного из полученных реакционной иммунизацией альдолазных абзимов (38C2) позволила использовать его в качестве катализатора при органическом синтезе [84] и при активации предшественников лекарств [85-87]. В то же время, в отличие от ферментов, антитело 38C2 было способно катализировать и обратную альдольную реакцию [88].

Первый *de novo* созданный фермент, катализирующий обратную альдольную реакцию был опубликован в 2008 году группой Бэйкера [71]. Авторы создали четыре различные теоретические структуры, каждая из которых содержала остаток лизина в качестве основания Шиффа. Четыре мотива активного сайта были оптимизированы с помощью КМ методов, они отличались только кислотами/основаниями, необходимыми для депротонирования β -спирта: диада лизин/аспарагиновая кислота; тирозин; диада гистидин/аспарагиновая кислота и молекула воды. Первый предложенный мотив активного сайта был аналогом активного сайта D-2-дезоксирибоза-5-фосфат альдолазы, в то время как другие три мотива были похожи на активные центры каталитических антител, в которых лизин расположен в гидрофобном кармане. Программное обеспечение Rosetta было использовано для оптимизации геометрии четырех мотивов, которые были помещены в связывающие карманы 71 белкового остова. В общей сложности 72

конструкции было выбрано для экспериментальной проверки. Для двух структур были определенные с помощью рентгено-структурного анализа геометрия каркаса и ориентация боковых цепей, которые показали идеальное сходство с расчетными структурами. 32 фермента показали Ретро-альдозазную активность, хотя скорость была на 2-3 порядка ниже, чем в случае каталитических антител. В попытке улучшить эффективность новых разработанных ферментов, группа Хилверта и Бейкера оптимизировала полученные белки с помощью направленной эволюции [89, 90]. В результате, с помощью случайного мутагенеза и скрининга, активность была увеличена более чем в 4400 раз, что дало возможность получить каталитическую эффективность, приближенную к природным ферментам. Удивительно, что полученные ферменты обладали значительными изменениями в активном сайте по сравнению с исходным ферментом. В частности, каталитический остаток лизина и молекула воды отсутствовали, а другой остаток лизина был найден в другом положении связывающего кармана, созданного в процессе оптимизации.

Несмотря на то, что для детального моделирования активных центров ферментов и дизайна последовательности аминокислот, концентрирующихся в этих активных центрах используются мощнейшие суперкомпьютеры, пока все искусственные ферменты, созданные при помощи компьютерного моделирования, по части обеспечения скорости протекания реакций значительно отстают от природных аналогов. Однако было бы наивным рассчитывать на то, что сконструированные за месяцы, прототипы смогут сразу же конкурировать с продуктами миллиардов лет естественной эволюции на Земле.

2.2.4. Направленное улучшение антител.

Clark и др. [91] оптимизировали антитело AQC2 для связывания с I доменом человеческого интегрина VLA1, используя молекулярную динамику – силовое поле CHARMM и программное обеспечение ICE, которое вычисляет электростатические взаимодействия и энергию десольватации. С помощью этого подхода удалось достичь улучшение аффинности связывания, даже не смотря на то, что исходное антитело обладает относительно высокой аффинностью ($K_d \approx 7$ нМ). Они проверили более 80 спроектированных мутантов включая

множественные мутации. Комбинация четырех мутаций (легкая цепь: S28Q, N52E, тяжелая цепь: T50V, K64E) показали самое высокое сродство (850 пМ), что в 10 раз лучше по сравнению с диким типом. Структура мутантного антитела была разрешена и была выявлена перегруппировка сети водородных связей.

В другом успешном редизайне взаимодействия антитела с антигеном [64], исследования также были направлены на электростатические взаимодействия. Одним из очевидных преимуществ для оптимизации электростатических сил является то, что взаимодействия дальнего радиуса могут быть включены в процесс проектирования. Авторы спроектировали единичные мутации во всех позициях в CDR, используя силовое поле CHARMM, ранжируя их с помощью электростатики Пуассона - Больцмана и показали, что четыре мутации (легкая цепь: N92A, тяжелая цепь: T28D, S57V, T58D) вместе генерируют 100-кратное улучшение аффинности по сравнению с диким типом (43 пМ против 4,4 нМ для дикого типа).

Несколько другим использованием компьютерного моделирования является определение выгодных позиций для экспериментального случайного мутагенеза, а не вычисление конкретных благоприятных мутаций. В таком исследовании Barderas и соавторы [92] использовали компьютерное моделирование, в том числе МД, чтобы выбрать подходящие остатки для случайного мутагенеза в CDR-H3 и -L3. Этот подход привел к появлению антитела к гастрину с аффинностью связывания 13.2 нМ, что в 454 раза лучше, чем в случае дикого типа.

В некоторых случаях специфичность, а не сродство является основной целью компьютерного дизайна, как это было продемонстрировано в работе [93]. Основная цель данной работы – улучшение кросс-специфичности анти-протеазного антитела E2. Проблема состоит в том, что антитела, полученные в мышах, иммунизированных человеческими антигенами, часто показывают низкую эффективность в доклинических испытаниях на животных потому, что структура и последовательность антигена не всегда консервативна у людей и мышей. Протеазный антиген MT-SP1 человека и эпитин мыши имеют 87% идентичной последовательности, но три поверхностных аминокислотных остатка, которые контактируют с антителом, различаются. На основании комплексной структуры антиген-антитело MT-SP1/E2, была смоделирована структура эпитин/E2. Аминокислотные остатки антитела, которое контактирует с антигеном, отобрали

для *in silico* мутагенеза, затем были предсказаны несколько мутаций, которые могут улучшить сродство к эпитину. Мутация T98R в CDR-H3 привела к наибольшему изменению свободной энергии. Последующие экспериментальные исследования подтвердили, что эта мутация привела к 14-кратному улучшению аффинности по сравнению с диким типом (K_d уменьшилось от 4,8 нМ до 340 пМ). Предполагается, что мутация улучшает связывание эпитина в результате появления новых водородных связей.

3. Получение антител, нейтрализующих ФОТ.

Ранее в лаборатории биокатализа ИБХ РАН методом фагового дисплея был осуществлен отбор на связывание с фосфонатом X антител из полусинтетической библиотеки сегментов переменных фрагментов генов иммуноглобулинов человека Griffin.1 (MRC, Center for protein engineering, Великобритания) [94]. Библиотека построена на основе зародышевых линий 49 сегментов переменных регионов тяжелых цепей, а также 26 и 21 сегмента переменных регионов κ и λ легких цепей, соответственно. Третьи гиперпеременные участки как тяжелых, так и легких цепей были рандомизированы методом ПЦР [95]. Гены одноцепочечных антител (scFv) были клонированы в фагемидный вектор pHEN2. Представительность библиотеки составляла более $1,2 \times 10^9$. Для проведения химической селекции и скрининга были использованы *n*-нитрофенил 8метил-8-азабицикло[3.2.1]октан фенилфосфонат (X) и его биотинилированное производное (Bt-X) (рис. 16 А и В).

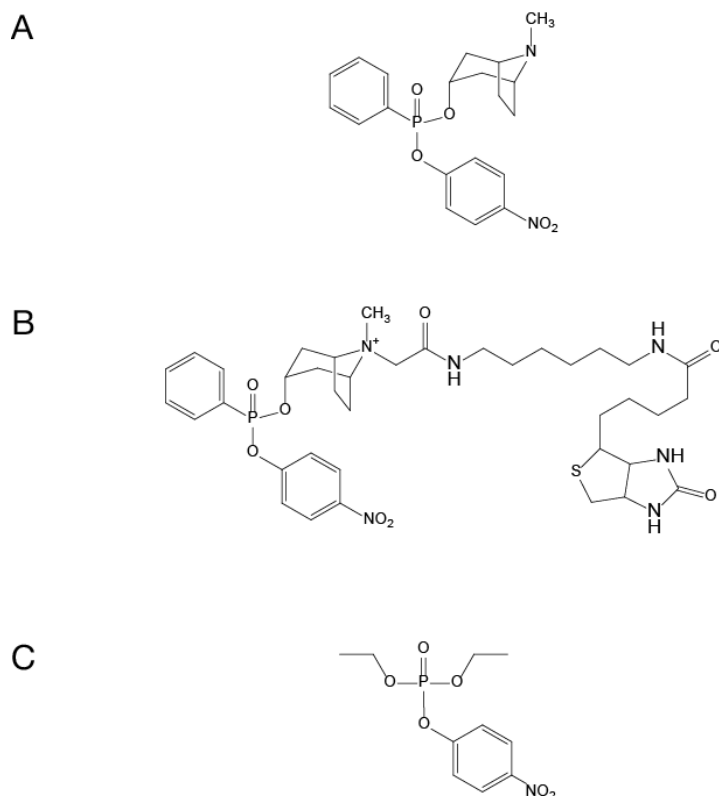


Рис. 16. Химические структуры фосфорорганических соединений. (А) *p*-нитрофенил 8метил-8-азабицикло[3.2.1]октил фенилфосфонат (фосфонат X) и его биотинилированное производное (В); (С) О,О-диэтил О-4-нитрофенил фосфат (параоксон).

Данный фосфонат был разработан как ингибитор сериновых гидролаз [96] и ранее использовался для детекции протеолитической активности у природных антител при различных аутоиммунных нарушениях [97]. Наличие *p*-нитрофенильной группы делает его весьма реакционно-способным по отношению к сериновым гидролазам. В отличие от фторпроизводных фосфонатов, данное соединение достаточно устойчиво в водных растворах и не проявляет неспецифической активности по отношению к инертным белкам. Для селекции активных антител, способных ковалентно взаимодействовать с Bt-X, была использована стандартная схема (рис. 17).

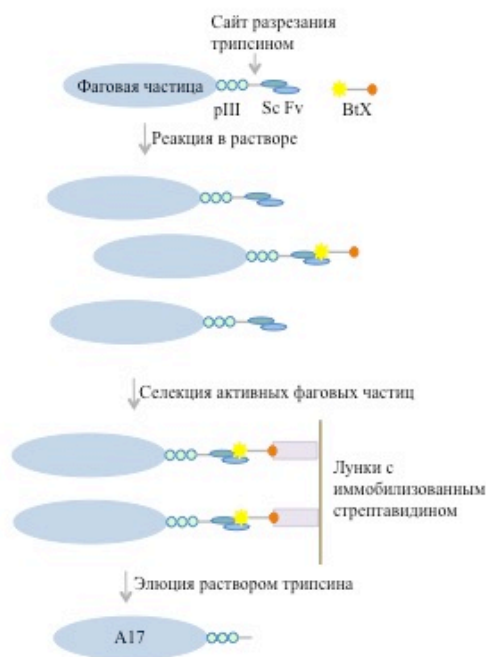
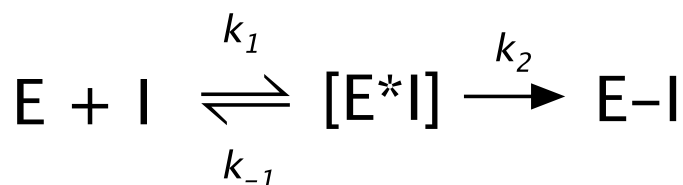


Рис. 17. Схема селекции активных антител, способных ковалентно взаимодействовать с Bt-X.

В результате трех раундов селекции из библиотеки были отобраны хорошо экспрессируемые растворимые одноцепочечные антитела, способные взаимодействовать с Bt-X фосфонатом ковалентно («реакционные» клоны), либо нековалентно («связывающие» клоны). Все «реакционные» клоны были охарактеризованы по кинетике взаимодействия с небитинилированным фосфонатом X. Детекцию протекания реакции во времени проводили спектрофотометрически при 405 нм по образующемуся окрашенному продукту (*p*-нитрофенолу). Параметры взаимодействия фермента с необратимым ингибитором оценивали с использованием кинетической схемы Китца-Уилсона, описывающей взаимодействие ковалентных механизм-зависимых ингибиторов с ферментами. Реакцию описывают в виде двухстадийного процесса: 1) образование обратимого нековалентного комплекса фермент-ингибитор и 2) более медленного процесса образования ковалентной связи между ингибитором и ферментом [98]. Схематически этот процесс можно изобразить в виде:



где E – фермент, I – ингибитор, E*I – обратимый комплекс, E-I – ковалентный комплекс.

Кинетические характеристики реакции взаимодействия с фосфонатом X для всех реакционных scFv варьировались в очень узком диапазоне. Однако антитело A17 оказалось практически на порядок более реакционноспособным ($2119 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$). Согласно ранее опубликованным данным, значения констант скорости реакции для бутирилхолинэстеразы, химотрипсина и трипсина с фосфонатом X составляли 1800, 2600 и $4100 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$, соответственно [96]. Таким образом, наиболее активное одноцепочечное антитело A17 обладает реакционной способностью, сравнимой с таковой для природных сериновых гидролаз.

Далее антитело A17 было наработано в клетках линии CHO-K1 в виде полноразмерного антитела [99]. Анализ реакционной способности показал, что полноразмерное антитело A17, сохранило способность взаимодействовать с небиотинилированным фосфонатом X. Оценка кинетических параметров этого взаимодействия с использованием схемы Китца-Уилсона показала, что реакционная способность полноразмерного антитела значительно выше по сравнению с опубликованными ранее данными для одноцепочечного антитела. 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 [99].

Методом масс-спектрометрии MALDI было установлено, что ковалентная модификация полноразмерного антитела A17 фосфонатом X происходит по тому же пептидному участку легкой цепи иммуноглобулина, что и в случае одноцепочечного антитела. Было показано, что полноразмерное антитело сохранило способность взаимодействовать с биотинилированным производным

фосфоната X и субстратную специфичность по отношению к аналогам ФОТ, сравнимую с одноцепочечным A17. В обоих случаях модификация фосфонатом Vt-X ингибируется диизопропилфторфосфонатом, 4-(2-аминоэтил) - бензилсульфонил фторидом и параоксоном (рис. 16С) [99].

Была разрешена структура Fab фрагмента каталитического антитела A17 и его ковалентного аддукта с остатком фосфоната X с разрешением 1.5 Å и 1.36 Å соответственно. Было установлено, что модификации фосфонатом X подвергается остаток Tyr37 легкой цепи, расположенный в консервативном каркасном регионе FWR2 [99].

Комплексное физико-химическое исследование позволило предположить осуществление механизма индуцированного соответствия при взаимодействии A17 с фосфонатом X. Изучение функциональной активности абзима позволило выявить его способность ускорять гидролиз фосфорорганического пестицида параоксон. Установлено, что гидролиз пестицида параоксон антителом A17 проходит через стадию образования фосфотирозинового ковалентного интермедиата с аминокислотным остатком Tyr37. Показано, что стадия дефосфорилирования является скоростью-лимитирующей [99].

Полученные результаты могут быть использованы как платформа для рационального дизайна с целью улучшения каталитической эффективности имеющейся активности антитела A17 или при получении новых биокатализаторов.

Комбинаторный подход, основанный на скрининге фаговых или клеточных библиотек, можно рассматривать в качестве эффективной стратегии для получения искусственных биокатализаторов *de novo*. Полученные ферменты можно использовать в качестве матрицы для дальнейшего рационального дизайна на основе анализа трехмерной структуры белка. Виртуальный скрининг мутантов с новой/улучшенной функциональностью может быть произведен путем сочетания метода молекулярной динамики и метода квантовой механики/молекулярной механики.

Материалы и методы.

1. Расчетные методы.

Молекулярный докинг.

Докинг был выполнен при помощи программы AutoDock Vina 1.1.2.

КМ/ММ расчеты.

В качестве стартовой конформации A17 с параоксоном была использована конформация, полученная с помощью молекулярного докинга. Атомы боковых цепей L-Ser35 и L-Tyr37, двух ближайших молекул воды и параоксона были включены в КМ часть системы. Молекулярно-механический подход с использованием силового поля parm99 был применен к остальной части системы [100]. КМ подсистема была описана полуэмпирическим Гамильтоном PM6-D3H4 [101]. При каждом моделировании система была заполнена молекулами воды, описанными моделью TIP3P [102], общий заряд был нейтрализован ионами Na^+ и Cl^- . Вода и ионы были уравновешены вокруг комплекса белок-параоксон путем проведения МД моделирования в течение 100 псек. Расчеты гибридного КМ/ММ моделирования были проведены с помощью программного обеспечения GROMACS/MOPAC2012 [103, 104]. Используемая длина шага – 0,2 фсек. Термостат Нозе-Хувера был использован для проведения расчетов при температуре человеческого тела. Время моделирования составило 20 псек. Чтобы преодолеть активационный барьер, был использован метод метадинамики [105]. Метадинамика используется для ускорения совершения редких событий и исследования конформационного пространства [106]. В работе для расчетов был использован плагин PLUMED. <http://www.plumed-code.org/>, [107]. Данный метод позволяет преодолевать локальные минимумы в ходе моделирования: каждые n шагов к потенциальной энергии системы добавляется слагаемое до тех пор, пока «потенциальная яма» не будет заполнена. О заполнении «потенциальной ямы» судят по изменению коллективных переменных. Метадинамика проводилась в два этапа: сначала проводилось насыщение связи между гидроксильным кислородом и протоном L-Tyr37 (Tyr-O...H). После образования переходного состояния, были

использованы две коллективные переменные – расстояние от протона до фосфорильного кислорода (P=O...H) и между кислородом уходящей группы и атомом фосфора параоксона (P...O-PNP). Добавленный потенциал строится в виде суммы Гаусса:

$$V(\vec{s}, t) = \sum_{k\tau < t} W(k\tau) \exp \left(- \sum_{i=1}^d \frac{(s_i - s_i(q(k\tau)))^2}{2\sigma_i^2} \right).$$

где \vec{s} — вектор коллективных переменных, s_i — значение i -й коллективной переменной на данном шаге, d — число коллективных переменных, t — время, $k\tau$ — шаг, параметры W и σ_i определяют высоту и ширину функции Гаусса по каждой из коллективных переменных соответственно, что отражает количество энергии, добавленное за каждый шаг. Несколько различных параметров метадинамики было протестировано, в результате были выбраны $W = 0,5$ кДж/моль и $\sigma_i = 0,01$ нм. Что бы предотвратить диффузию параоксона от активного остатка L-Тур37, расстояние между ними было ограничено $2,5\text{\AA}$ [108]. Весь этот набор коллективных переменных привел примерно к 50% вероятности образования переходного состояния.

Расчет поверхности свободной энергии.

Четырехмерный график был построен как зависимость энергии реакции взаимодействия с параоксоном мутантов и антитела дикого типа от трех коллективных переменных. Энергетический график построен на основе представительности состояний, $F(s) = -kBT \log(P(s))$, где P – вероятность встретить точный набор коллективных переменных. Исходя из метадинамики, каждая конформация обладала набором значений коллективных переменных. Были выбраны три интервала значений коллективных 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. Например, предреакционный комплекс соответствовал коллективным переменным: (Тур-О ... Н) < 1,2Å; (P=O ... Н) > 2,5Å и (P...O-PNP) < 1,9Å. Активированный с помощью вращения, предреакционный комплекс, соответствовал коллективным переменным: (Тур-О...Н) < 1,2Å; (P=O...Н) < 2,5Å и (P...O-PNP) < 1,9Å. Переходное

состояние соответствовал коллективным переменным: $(\text{Tyg-O}\dots\text{H}) > 1,2\text{\AA}$; $(\text{P=O}\dots\text{H}) < 1,2\text{\AA}$ и $(\text{P}\dots\text{O-PNP}) < 1,9\text{\AA}$.

Вычисление коэффициента диффузии.

Моделирование структуры. Координаты параоксона были построены с помощью OpenBabel с использованием спецификации SMILES. Геометрия молекулы была оптимизирована с помощью функционала B3LYP 6-31G(3d,2f) с последующим точечным расчетом атомного заряда. Точечные заряды были получены из ESP с тем же уровнем теории с использованием R.E.D., основанного на подходе RESP [109]. Молекулярная топология с оптимизированными координатами и полученные точечные атомные заряды были построены с помощью ACPYPE [110]. Исходные структуры всех комплексов были построены на основе позиции параоксона в активированном предреакционном комплексе. Все эксперименты проводились в программном пакете GROMACS 5.0.

Моделирование молекулярной динамики. Все эксперименты проводились в пакете молекулярной динамики GROMACS. Для расчета параметров моделирования было использовано силовое поле Parm99SB-ILDN [111]. При расчете электростатических взаимодействий был использован метод суммирования по Эвальду (Particle Mesh Ewald, PME) [112]. В расчетах была использована модель воды TIP4P [112]. Заряд системы был нейтрализован добавлением ионов Cl⁻. Коэффициенты диффузии были рассчитаны на основе моделирования в течении 1 нсек из соотношения Эйнштейна:

$$D = \mu_p \times k_B \times T$$

где D – коэффициент диффузии, μ_p – подвижность частиц, k_B – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура.

2. Химические реактивы и сопутствующие материалы.

В работе использовали следующие реактивы и материалы;

Реактивы: трис-гидроксиметиламинометан (трис), персульфат аммония, тетраборат натрия, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), гуанидин гидрохлорид (Amresham, США); одно- и двузамещенный фосфат натрия, одно- и двузамещенный фосфат калия, хлорид натрия, ацетат натрия, хлорид магния, 4-хлоро-1-нафтол, бромистый этидий, β -меркаптоэтанол, бычий сывороточный

альбумин фракция V (BCA), глицин (Sigma, США); акриламид, N',N'-метиленбисакриламид, додецилсульфат натрия (ДДС), мочевиная sequence grade, нитроцеллюлозная мембрана Hybond C extra (Amersham, США); nonidet P-40 (NP40); агар, пептон, дрожжевой экстракт (BD, США); металлохелатный сорбент Ni-NTA (Qiagen, Германия), MonoQ, Superdex75; раствор ТМБ (тетраметилбензидина) (США); остальные реактивы отечественного производства марки "осч" (особо чистые); п-нитрофенил 8-метил-8-азабицикло[3.2.1]октан фенилфосфонат (X) и его биотинилированный аналог (Bt-X); источник дрожжевых азотистых оснований (YNB) (BD, США); метанол, биотин (Sigma, США), глюкоза, глицерин, сорбитол (Sigma, США); ацетат лития (Sigma, США), натрия лауроилсаркозин (Amersham, США), дитиотреитол (Sigma, США); имидазол (Sigma, США);

Ферменты: термостабильная ДНК-зависимая ДНК-полимераза, щелочная фосфатаза, Rapid DNA Ligation kit (Fermentas, Литва), эндонуклеазы рестрикции и соответствующие стандартные буферные растворы (Fermentas, Литва); дезоксирибонуклеаза I (Biozyme Laboratories Ltd, США);

Маркеры: размера фрагментов ДНК и молекулярной массы: GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; GeneRuler™ 1 k DNA Ladder, Protein Molecular Weight Marker 14.4-116.0 кДа, Prestained Protein Molecular Weight Marker 19.0-118.0 кДа (Fermentas, Литва);

Фосфорорганические токсины: параоксон (Sigma, США);

Антитела: антитела козы к каппа цепи IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США); антитела мыши к FLAG эпитопу, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США); стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена, (Sigma, США); нейтравидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (Pierce, США);

Плазмидные векторы: pPicZalpha (Invivogen, США);

Бактериальные штаммы E. coli: DH5α - supE44, delta lacU169 (phi 80 lacZ delta M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1 (Gibco, Великобритания);

Дрожжевые штаммы: Pichia Pastoris GS115 (Invivogen, США);

3. Растворы.

Все растворы готовились на дистиллированной воде или на воде особой чистоты из установки “Milli-Q” (Millipore).

PBS: 8.0 г/л NaCl, 0.2 г/л KCl, 1.15 г/л Na₂HPO₄, 0.2 г/л KH₂PO₄, pH 7.2.

TBE десятикратный: 0.89 М трис-основание, 0.89 М борная кислота, 20 мМ ЭДТА, pH 8.0.

TE: 10 мМ Трис-HCl, 1мМ ЭДТА, pH 8.0.

Соленый спирт: 70% EtOH, 30% 0.14М NaCl.

Бактериальные среды.

LB: 10 г/л пептона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl.

LB-агар: LB, 18 г/л агара.

2xYT: 16 г/л пептона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl.

SOB: 20 г/л пептона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0.5 г/л NaCl, 250 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂.

SOC: SOB, 50 мМ глюкоза.

Дрожжевые среды.

YPD: 10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона, 20 г/л глюкозы.

YPD-агар: YPD, 18 г/л агара.

BMGY: 10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона, 100 мМ калий-фосфата pH 6, 13,4 г/л YNB, 0,4 мг/л биотина, 10 г/л глицерина.

BMMY: 10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона, 100 мМ калий-фосфата pH 6, 13,4 г/л YNB, 0,4 мг/л биотина, 0,5% метанол.

Антибиотики.

Раствор натриевой соли ампициллина в воде с концентрацией 25 мг/мл.

Водный раствор зеоцина с концентрацией 50 мг/мл.

4. Работа с нуклеиновыми кислотами.

Аmplификация фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции.

Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе T100 (BioRad, США).

Готовили инкубационную смесь следующего состава:

- однократный буфер для Taq-полимеразы

- по 10 pM каждого праймера
- по 0,2 mM каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата
- 1-2 ед. Taq-полимеразы
- 0.1-0.2 мкг ДНК

Амплификацию проводили по следующей схеме:

А

предварительная денатурация

1 цикл.

Б

денатурация

отжиг праймеров

элонгация

25 циклов.

В

элонгация

1 цикл

Расчет температуры отжига праймера (X) производили по формуле:

$$X = 2^{\circ}\text{C} \times n (\text{A/T}) + 4^{\circ}\text{C} \times n (\text{G/C}) - 5^{\circ}\text{C},$$

где n - число соответствующих нуклеотидов. Для праймеров длиной более 24 нуклеотидов использовали температуру отжига 68°C или максимальную возможную температуру, определенную экспериментально.

Рестрикция.

Рестрикцию ПЦР продуктов вели 14-16 часов, плазмидной ДНК – 1-2 часа, в водном термостате при 37°C/30°C. При рестрикции плазмидной ДНК, в последние 10 минут инкубации добавляли панкреатическую рибонуклеазу до конечной концентрации 1 мкг/мл.

Лигирование.

Для лигирования использовали лигазный кит (Fermentas, Литва) согласно инструкции производителя. Лигирование вели в объеме 20 мкл, при молярном

соотношении вектора и вставки 1:10, в течение 2-20 часов при комнатной температуре. Затем в лигазную смесь добавляли 1/10 объема тРНК (соосадителя), обрабатывали равным объемом хлороформа, и переосаждали водную фазу 3 объемами этанола. Центрифугировали 10 минут на скорости 13200 об/мин при комнатной температуре, промывали осадок 70% спиртом, затем растворяли в 6 мкл воды.

Выделение плазмидной ДНК.

Выделение плазмидной ДНК в большинстве случаев проводили по [113] с некоторыми модификациями. Одну колонию бактерий инкубировали в 5 мл LB или 2xYT с добавлением селективного антибиотика и растили при 37°C, с хорошей аэрацией, в течение 18-22 часов. Осаждали клетки центрифугированием 3 минуты на скорости 5000 об/мин при комнатной температуре, последовательно в один эппендорф. Ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера (50 mM глюкоза, 25 mM Трис-HCl pH 8.0; 10 mM ЭДТА), инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Добавляли 400 мкл свежеприготовленного раствора 0.2 M NaOH, 1% ДСН, перемешивали переворачиванием и инкубировали на льду 5 минут. Затем быстро нейтрализовали 300 мкл ледяного 7.5 M NH₄Ac pH 7.6, перемешивали переворачиванием и 10 минут инкубировали при комнатной температуре до образования белого осадка, который осаждали центрифугированием на скорости 13200 об/мин при комнатной температуре в течение 5 минут. Супернатант переносили в новый эппендорф с 0.6 объема (540 мкл) изопропанола, перемешивали переворачиванием до образования взвешенного белого осадка, 10 минут центрифугировали на скорости 13200 об/мин при комнатной температуре. Осадок суспендировали в 100 мкл ледяного 2 M NH₄Ac pH 7.4 на льду и инкубировали в течение 5 минут при 0°C. Затем центрифугировали 5 минут в тех же условиях, супернатант переносили в пробирку с 100 мкл изопропанола. 10 минут инкубировали при комнатной температуре, центрифугировали 10 минут в тех же условиях. Осадок промывали 300 мкл соленого спирта, подсушивали на воздухе, растворяли в 20 мкл TE или воды.

Выделение плазмидной ДНК для секвенирования производилось согласно приведенной выше методике со следующими модификациями. Осадок, полученный после второго переосаждения изопропанолом, повторно

суспендировали в 100 мкл ледяного 2 М NH_4Ac pH 7.0, инкубировали 5 минут при 0°C центрифугировали 5 минут на скорости 132500 об/мин при комнатной температуре, супернатант переосаждали изопропанолом, как описано выше. Осадок, полученный после третьего переосаждения изопропанолом растворяли в 49 мкл ТЕ, добавляли 1 мкг/мл панкреатической РНКазы, инкубировали 15 минут при 37°C. Добавляли 25 мкл 2 М NH_4Ac pH 7.4 и 75 мкл изопропанола, инкубировали 10 минут при комнатной температуре, центрифугировали на скорости 13200 об/мин при +4°C. Осадок трижды промывали 300 мкл соленого спирта, затем 1 раз 500 мкл перегнанного этанола, подсушивали на воздухе, растворяли в 20 мкл ТЕ или воды.

Электрофорез ДНК в агарозном геле.

Для проведения электрофореза использовали 0,8-1,5% агарозный гель, приготовленный на однократном TBE с бромистым этидием в концентрации 0.5 мкг/мл. Пробы смешивали в соотношении 1:10 с буфером нанесения, содержащим 0.1% бромфенолового синего, 0.5% ДСН, 0.1 М ЭДТА, pH 8.0, 50% глицерина. Электрофорез вели в буфере TBE в форежной камере Hoefer Scientific Instruments при напряжении 5 В/см. По окончании электрофореза ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм на трансиллюминаторе фирмы LKB.

Электрофорез ДНК в полиакриламидном геле.

Для проведения электрофореза использовали 5% полиакриламидный гель, (соотношение акриламида и бисакриламида 19:1), приготовленный на однократном TBE. Толщина аналитического геля составляла 0.75 мм, препаративного – 1 мм. Процесс осуществляли на приборе ЕС-200 фирмы ЕС Apparatus (США). В течение 30 минут проводили предварительный фореж при 90-110 В. Пробы смешивали в соотношении 1:10 с буфером нанесения, содержащим 0.1% бромфенолового синего, 0.5% ДСН, 0.1 М ЭДТА, pH 8.0, 50% глицерина и наносили на гель. Начинали электрофорез при 90 В до вхождения проб в гель, после этого поднимали напряжение до 130-140 В. По окончании электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл) и визуализировали в ультрафиолетовом свете.

Электроэлюция.

Фрагменты ДНК элюировали из однопроцентных агарозных или пятипроцентных полиакриламидных гелей. После завершения электрофореза, гель окрашивали в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл) и визуализировали в ультрафиолетовом свете, далее вырезали нужный фрагмент геля, помещали его в диализный мешок с 50-80 мкл однократного ТВЕ. Затем осуществляли электроэлюцию в форезной камере Hoefer Scientific Instruments при 100 В в ТВЕ около 20 минут. Перемещение ДНК из геля в раствор контролировали в ультрафиолетовом свете.

К элюату ДНК добавляли раствор NaCl до 0.14 М, обрабатывали смесью фенол-хлороформ 1:1, перемешивали, центрифугировали 5 мин на скорости 13200 об/мин при комнатной температуре. Водную фазу осаждали 3 объемами этанола, центрифугировали 10 мин на скорости 13200 об/мин при комнатной температуре, осадок промывали соленым спиртом, высушивали, растворяли в 20 мкл ТЕ или воды.

Секвенирование плазмидной ДНК.

Секвенирование плазмидной ДНК проводили при помощи автоматического секвенатора ABI PRISM в Межинститутском ЦКП «Геном» ИМБ РАН.

5. Методы работы с бактериями E.coli.

Получение электрокомпетентных клеток.

Клетки из музея истощающим штрихом высевались на чашку Петри с LB-агаром без антибиотика, инкубировались 14 часов при 37°C в воздушном термостате. Отдельную колонию переносили и инкубировали в 5 мл 2xYT без антибиотика для получения ночной культуры и растили при 37°C с хорошей аэрацией.

250 мкл и 750 мкл ночной культуры высевали с разбавлением 1:1000 и 1:333 соответственно в две конические колбы, содержащие по 250 мл среды SOB, и растили при 37°C с хорошей аэрацией до оптической плотности 0.4 ОЕ, но не более двух часов. Затем клетки охлаждали во льду около десяти минут, стерильно переносили в охлажденные центрифужные стаканы на 250 мл, центрифугировали 10 минут 4000 об/мин при 0°C на центрифуге Beckman J-21.

Клетки суспендировали в небольшом объеме ледяной стерильной деионизированной воды, переносили в стерильные охлажденные центрифужные стаканы объемом 35 мл, доливали водой до верху, центрифугировали в тех же условиях. Промывку водой повторяли еще 2 раза, затем клетки отмывали охлажденным 10% глицерином. Осадок суспендировали в 2-3 мл 10% глицерина, разносили по 100 мкл в стерильные охлажденные эппендорфы, после чего замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C .

Компетентность клеток проверялась трансформацией плазмидой с известной концентрацией и принималась равной количеству выросших колоний поделенной на количество плазмиды в мкг.

Трансформация клеток *E.coli* методом электропорации.

Электропорация проводилась на приборе ECM600 (ВТХ, США) согласно инструкции производителя. Использовались 1 мм кюветы фирмы BioRad.

К размороженной на льду аликвоте (100 мкл) электрокомпетентных клеток добавляли раствор плазмиды или очищенную и обессоленную лигазную смесь, перемешивая, переносили клетки в охлажденную кювету и осуществляли электропорацию (1.2-1.4 кV / 5.19-5.22 мс). Затем клетки переносили в 1 мл теплой среды SOC без антибиотиков, инкубировали в воздушном термостате при 37°C 1 час для репарации клеточной стенки и начала экспрессии генов устойчивости к селективным антибиотикам. Далее высевали (100 мкл при трансформации плазмидой, 1 мл при трансформации лигазной смесью) на чашку Петри с LB-агаром, с добавлением селективных антибиотиков, и помещали в воздушный термостат на 37°C на 14-16 часов.

ПЦР с колоний.

Амплификацию проводили на приборе T100 (BioRad, США) по следующей схеме:

Готовили инкубационную смесь следующего состава:

- 2.5 мкл десятикратного буфера для Taq-полимеразы
- по 10 пМ прямого и обратного праймера
- по 0,2 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата
- вода до 24 мкл.

Раствор разносили по пробиркам по 22 мкл.

Бактериальные колонии переносили петлей в пробирки и одновременно делали штрихи на свежей, размеченной чашке Петри с твердой питательной средой. Пробирки помещали в прибор, проводили денатурацию при 94°C 3 минуты, на последней минуте первого цикла по пробиркам разносили Taq-полимеразу. Далее осуществляли 25 циклов ПЦР (денатурация: 94°C 30 сек, отжиг праймера $X = 2^{\circ}\text{C} \times n (\text{A/T}) + 4^{\circ}\text{C} \times n (\text{G/C}) - 5^{\circ}\text{C}$ 30 сек, элонгация 72°C 30-90 сек). Продукты полимеразной цепной реакции анализировали электрофорезом в агарозном геле.

Ночная культура.

Бактериальную колонию помещали в 5 мл среды LB или 2xYT с добавлением селективного антибиотика, наращивали клетки при 37°C и интенсивной аэрации около 12-14 часов.

Приготовление музейного штамма.

Из отдельной колонии бактерий выращивали ночную культуру, добавляли глицерин до концентрации 12-14%, инкубировали 20 минут при комнатной температуре, делили на аликвоты по 1 мл и замораживали их в жидком азоте. Далее хранение осуществляли при температуре -70 °C. Штамм из музея рассеивали истощающим штрихом на чашку Петри, содержащую среду LB-агар и инкубировали 14-16 часов при 37°C в воздушном термостате.

6. Методы работы с дрожжами *Pichia Pastoris*.

Получение электрокомпетентных клеток.

Клетки из музея истощающим штрихом высевали на чашку Петри с YPD-агаром инкубировали в течение ночи при 30°C в воздушном термостате. Для получения ночной культуры отдельную колонию помещали в 5 мл среды YPD и растили в течение ночи при 30°C с интенсивной аэрацией. 100 мкл ночной культуры высевали в 50 мл свежей среды YPD, и растили в течение ночи при 30°C с интенсивной аэрацией до оптической плотности 1.3-1.5 ОЕ. Затем клетки охлаждали во льду около десяти минут, стерильно переносили в охлажденные 50-мл пробирки, центрифугировали 1500g x 5 мин при +4°C на центрифуге Eppendorf 5804. Далее клетки суспендировали в 40 мл буфера 100 mM LiAc, 10 mM дитиотреитол, 0,6 M сорбитол, 10 mM Трис-HCl pH 7.5 и оставляли на 30 минут

при комнатной температуре. Клетки центрифугировали 1500g x 5 мин при +4°C, суспендировали в 50 мл ледяного 1 М сорбитола, центрифугировали в тех же условиях и повторяли эту процедуру два раза. Осадок суспендировали в 1-2 мл 1М сорбитола, разносили по 80 мкл в стерильные охлажденные эппендорфы и использовали для электротрансформации.

Трансформация клеток методом электропорации.

Электропорация проводилась на приборе фирмы Genetronics согласно инструкции производителя. Использовались 2 мм кюветы фирмы BioRad. К аликвоте (80 мкл) электрокомпетентных клеток добавляли 5-20 мкг линейаризованной ДНК, перемешивали и инкубировали во льду 5 мин. Затем переносили клетки в охлажденную кювету и осуществляли электропорацию (2.5kV / 8-10 мс). Затем клетки переносили в 1 мл охлажденного во льду 1М сорбитола, инкубировали в воздушном термостате при 30°C 1 час и далее высевали 200-500 мкл на чашку Петри с YPD-агаром, с добавлением селективных антибиотиков, и помещали в воздушный термостат на 30°C на 48- 72 часа.

ПЦР с генома дрожжей.

Дрожжевые колонии переносили петлей в лунки 24-луночного планшета со средой YNB и одновременно делали штрихи на свежей, размеченной чашке Петри с твердой питательной средой. Далее клетки растили в течение 16-20 ч. при 30°C с интенсивной аэрацией и центрифугировали 1500g x 5 мин. Супернатант сливали и заливали клетки 200 мкл буфера 6 М гуанидин гидрохлорид, 30 mM трис-HCl pH 8, 5 mM ЭДТА, 0,1 М β-меркаптоэтанол, 0,5% саркозил. Клетки кипятили 5 минут 95°C, центрифугировали 1500g x 5 мин, супернатант сливали и заливали осадок MQ. Далее центрифугировали 1500g x 5 мин и повторяли процедуру 2 раза. Клеточный осадок растворяли в 50 мкл MQ и использовали далее для ПЦР. Пробирки помещали в прибор, проводили денатурацию при 94°C 3 минуты, на последней минуте первого цикла по пробиркам разносили Taq-полимеразу. Далее осуществляли 30 циклов ПЦР (денатурация: 94°C 30 сек, отжиг праймера $X = 2^{\circ}\text{C} \times n$ (A/T) + 4°C x n (G/C) -5°C 30 сек, элонгация 72°C 30-90 сек).

Продукты полимеразной цепной реакции анализировали электрофорезом в агарозном геле.

Анализ трансформантов.

Аналитическую экспрессию проводили по методике фирмы-изготовителя (Invitrogen®, США), используя среды BMGY и BMMY. Колонию помещали в 5 мл среды BMGY и растили в течение 16-20 ч. при 30°C с интенсивной аэрацией. Далее клетки центрифугировали 1500g x 5 мин и переводили в среду BMMY до 1 ОЕ. Метанол добавляли до концентрации 0.5% каждые 24 ч, экспрессию проводили в течение 72 ч с момента индукции. Аликвоты культуральной жидкости отбирали каждые 24 ч, осветляли центрифугированием при 2000 g течение 10 мин. Накопление в культуральной среде целевых белков наблюдали с помощью иммуноблоттинга. Анализ проводили с использованием антител мыши к FLAG-эпитопу и константному участку каппа-цепи человеческих иммуноглобулинов, конъюгированных с пероксидазой хрена.

Приготовление музейного штамма.

Из отдельной колонии выращивали ночную культуру, добавляли глицерин до концентрации 15%, инкубировали 20 минут при комнатной температуре, делили на аликвоты по 1 мл и замораживали их в жидком азоте. Далее хранение осуществляли при температуре -70°C.

Экспрессия Fab-фрагмента антитела в условиях культивирования в качалочных колбах.

Музейную культуру *P.pastoris* из замороженного глицеринового стока рассеивали методом истончающегося штриха на чашки со средой YPD. Клетки растили 24-72 часа при +30°C. Индивидуальные колонии *P. pastoris* помещались в 50 мл среды BMGY в колбы и растили в течение 16-20 ч. при 30°C с интенсивной аэрацией. Клетки собирали центрифугированием при 2000 g x 15 мин, экспрессию индуцировали суспендированием клеточного осадка в 250 мл среде BMMY до конечной плотности 1 ОЕ и культивировали 72 часа при 30°C с интенсивной аэрацией. Метанол добавляли до концентрации 0.5% каждые 24 ч, экспрессию проводили в течение 72 ч с момента индукции. После окончания культивации клетки осаждали центрифугированием 2000 g x 15 мин., супернатант отбирали.

7. Работа с белками.

Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле.

Электрофорез проводили по стандартной методике Леммли [114]. Готовили двухкомпонентный гель следующего состава: концентрирующий гель – 5% смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.125 М Трис-НСl, pH 6.8; разделяющий гель – 12-15% смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.375 М Трис-НСl, pH 8.9. Для полимеризации сначала добавляли N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин до концентрации $5 \cdot 10^{-5}\%$, а затем персульфат аммония до $1.5 \cdot 10^{-4}\%$.

Двухкратный буфер нанесения образцов: 5% 2-меркаптоэтанола, 4% ДСН, 0.25 М Трис-НСl, pH 6.8; 4 мМ ЭДТА-Na, pH 8.0, 10% глицерина, 0.25 мг/мл бромфенолового синего.

Пятикратный электродный буфер для электрофореза по Леммли: глицин 72 г/л, ДСН 5 г/л, Трис-НСl 6.5 г/л, pH 8.3.

Образцы белковых препаратов смешивали с буфером нанесения в соотношении 1:1, прогревали 5 минут при 95°C, наносили на гель и вели электрофорез при напряжении 90 В до перемещения красителя в разделяющий гель, после чего выставляли силу тока 25 мА на 1 пластину геля и вели электрофорез до момента выхода краски из разделяющего геля.

По окончании электрофореза отделяли разделяющий гель, который затем окрашивали Кумасси синим R-250.

Окрашивание ПААГ Кумасси синим R-250 с усилением контраста солью меди.

Разделяющий гель 5 минут инкубировали в горячем растворе, содержащем 10% этанола и 10% уксусной кислоты. Далее его помещали на 10 минут в горячий раствор следующего состава: 15% этанола, 25% уксусной кислоты, 0.3 г/л красителя Кумасси синий R-250 и 0.45 г/л пятиводного сульфата меди. Затем гель многократно отмывали в горячем растворе, содержащем 10% этилового спирта и 10% уксусной кислоты до полного исчезновения фонового окрашивания.

Иммуноблоттинг.

Проводили гель-электрофорез белков в денатурирующих условиях по Леммли с использованием предокрашенного маркера (Fermentas, Литва).

Отделяли разделяющий гель и проводили перенос на мембрану HyBond C extra (Amersham, США) на приборе для полусухого электропереноса 2117 MULTIPHOR II Electrophoresis Unit производства LKB (Швеция) согласно инструкции производителя. Для этого вырезали мембрану, 3 листа бумаги Whatman 3MM размером с гель и 3 листа ватмана на 1 см больше с каждого края, смачивали в все буфере для переноса, содержащем 39 мМ глицин, 48 мМ Трис-основание, 0.0375% ДСН и 20% этиловый спирт. Помещали на нижний электрод установки для переноса стопку бумаги Whatman 3MM (листы большего размера), сверху мембрану, затем гель, стопку бумаги Whatman 3MM, накрывали верхним электродом и вели электроперенос в течение 1 часа при силе тока 0.8 мА/см². По окончании процесса мембрану помещали в блокирующий раствор, содержащий 5% БСА в PBS, на качающейся платформе. Инкубацию вели 1 час при блокировании альбумином. Далее мембрану отмывали 3 раза по 5 минут в PBS, содержащем 0.05% Tween 20. Гибридизацию с первичными антителами в разведении, указанном производителем, проводили в течение часа в конъюгатном буфере (PBS, 0.5% БСА), после чего опять трижды отмывали. Затем мембрану час инкубировали со вторичными специфичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена в разведении, указанном производителем, в том же буфере и отмывали 5 раз по 5 минут. Проявление мембраны проводили с помощью кита ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham, США) на приборе VersaDoc (BioRad, США).

Очистка Fab-фрагментов.

Среду после культивирования собирали и центрифугировали в течение 10 минут при 2000g. Супернатант фильтровали через ячейки Millistak+ pod filter (Millipore): сначала через ячейку с размером пор 0,6 – 9 мкм, затем через ячейку с размером пор 0,2 – 2 мкм.

Далее отфильтрованную культуральную среду концентрировали методом ультрафильтрации на приборе Pellicon (Millipore). Ультрафильтрацию осуществляли с использованием мембраны с размером пор, соответствующей прохождению веществ с молекулярным весом не более 10 кДа. Движение жидкостей обеспечивалось работой перистальтического насоса. Модуль фильтрационной системы имеет 3 выхода: «вход» (через который фильтруемая

жидкость поступает в систему), «проскок» (через который проходит фракция, не задержанная мембраной) и «выход» (через который осуществляется движение веществ, не проникших сквозь мембрану). К каждому из выходов подсоединяли шланги соответствующего диаметра. Шланг, соответствующий «входу» подсоединяли к насосу.

Перед началом концентрирования готовили следующий буферный раствор:

Буфер А: 50 мМ натрий-фосфат pH 8, 300 мМ NaCl

Подготовка модулей к работе:

Модули хранились под раствором 0,1 М NaOH. Перед началом работы мембрану промывали 4 л MQ, опустив концы «выхода» и «проскока» в слив. Начальная скорость промывки составляла 100 мл/мин. Затем ее постепенно увеличивали до максимальной (800 мл/мин). Налив 2 л свежей MQ, систему промывали в режиме циркуляции 20 мин, концы «выхода» и «проскока» поместив в емкость с MQ. Затем систему промывали 1 л буфера А, опустив концы «выхода» и «проскока» в слив. Далее, налив 1 л свежего буфера А, систему промывали в режиме циркуляции 20 мин, поместив концы «выходы» и «проскока» в емкость с буфером А.

Ультра-фильтрация через модуль 10 кДа.

Подготавливали модуль 10 кДа к работе (как описано выше). В емкость с отфильтрованной средой помещали шланги «входа» и «выходы», фракцию, соответствующую «проскоку» собирали в отдельную емкость. Начальная скорость концентрирования составляла 100 мл/мин. Затем ее постепенно увеличивали до 800 мл/мин. Процесс концентрирования останавливали в тот момент, когда уровень среды в исходном резервуаре составлял около 100 мл. К концентрату добавляли 2 л буфера А и продолжали концентрировать. Процесс концентрации опять останавливали, когда объем концентрата в исходном резервуаре составлял порядка 100 мл. В исходный резервуар снова добавляли 2 л буфера А, процедуру проводили еще два раза.

Модуль промывали и рециркулировали сначала MQ, так же, как перед

началом работы, затем те же процедуры повторяли с раствором 0,1 М NaOH.

Далее очистку Fab-фрагмента из концентрата, полученного с помощью ультрафильтрации, осуществляли с помощью металл-хелатной хроматографии на колонке Ni-NTA (Qiagen), в буфере А. Колонку промывали до прекращения дрейфа базовой линии. Fab-фрагменты антител элюировали буфером А, содержащем 300 мМ имидазола. Все растворы для хроматографической очистки перед использованием стерилизовали автоклавированием. Непосредственно перед использованием колонку очищали 10 объемами буфером А, содержащем 300 мМ имидазола. Далее элюат диализовали против 20 мМ натрий-фосфатного буфера pH 8. Дальнейшую очистку проводили на ионообменной колонке monoQ (Amersham) в 20 мМ натрий-фосфатном буфере pH 8. Элюцию проводили градиентом соли – от 0 М до 1 М NaCl в 20 мМ натрий-фосфатном буфере pH 8. Заключительным этапом очистки являлась гель-фильтрация на колонке Superdex 75 (Amersham) в буфере 20 мМ натрий-фосфат pH 8 и 150 мМ NaCl на 0,5 мл/мин.

Отсутствие видимых белковых примесей в очищенных препаратах антител контролировали ДСН-ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси синим и иммуноблоттингом.

Модификация Fab-фрагментов антитела фосфонатом и параоксоном.

Кинетику модификации исследовали при температуре 25⁰С. Концентрацию фосфоната X и параоксона варьировали от 20 до 1000 мкМ и использовали 5-15 мкМ антител. Детекцию протекания реакции вели спектрофотометрически по образующемуся продукту реакции – п-нитрофенолу на 405 нм, на плащечном спектрофотометре VarioScan (Termo), оснащенного термостатируемой ячейкой. Коэффициент молярного поглощения рассчитывали исходя из pH реакционного буфера по формуле:

$$\epsilon_{\text{pNP-OH}} = ((\epsilon_{\text{pNPH}} - \epsilon_{\text{pNP}}) \times 10^{\text{pH-pK}_a}) / (1 + 10^{\text{pH-pK}_a}),$$

где $\epsilon_{\text{pNPH}} = 114 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ и $\epsilon_{\text{pNP}} = 18 \text{ 131 M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ молярный коэффициент протонированной и непротонированной формы п-нитрофенола, соответственно. Константы модификации определяли в соответствии с кинетической схемой Китца-

Уилсона [98], в координатах Хиксона-Кребса [115]. Количественную обработку результатов кинетических экспериментов осуществляли с помощью пакета программ DynaFit software (BioKin, США). Точную концентрацию субстрата определяли спектрофотометрически по концентрации выделяющегося п-нитрофенола в результате гидролиза 0,2 М NaOH. Каждую экспериментальную кривую строили за вычетом фонового распада субстрата в растворе того же состава, но без добавления антитела.

Предстационарная кинетика взаимодействия антитело-субстрат методом остановленного потока.

Флуоресцентные кинетические кривые были зарегистрированы на спектрофотометре «остановленной струи» SX.18MV (Applied Photophysics, Великобритания). «Мертвое время» прибора составляло 1,1 мсек. За реакцией следили по изменению внутренней флуоресценции триптофана в молекуле антитела, $\lambda_{ex} = 290$ нм, $\lambda_{em} = 320$ нм. Реакционный буфер содержал 50 мМ Na-фосфата pH 7,4, 150 мМ NaCl, 40% глицерина. Глицерин был использован для замедления скорости реакции в соответствии с [116]. Концентрация антитела составляла 10 мкМ, концентрацию субстрата варьировали от 5 до 1000 мкМ. Каждую кинетическую кривую усредняли минимум по данным четырех экспериментов с коррекцией фоновой флуоресценции. Количественную обработку результатов экспериментов осуществляли путем оптимизации параметров, входящих в кинетические схемы. Для этого использовали метод нелинейной регрессии, включающий численное интегрирование дифференциальных уравнений, описывающих кинетику процесса с помощью пакета программ DynaFit software (BioKin, США).

Триптический гидролиз для масс-спектрометрического анализа.

10 мкМ раствор исследуемого белка инкубировали с 2 мМ параоксона в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,4 при 37°C в течение 16 часов. Далее пробы обрабатывали бычим трипсином в соответствии с протоколом (Bruker applications guide).

Масс-спектрометрия MALDI.

Масс-спектрометрию проводили в институте ИБХ РАН при помощи масс-спектрометра Ultraflex II MALDI ToF-ToF (Bruker Daltonics, Германия) Масс-спектрометрические данные анализировали в программе flexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Germany).

Кристаллизация Fab-фрагмента антитела L-S35R и рентгеноструктурный анализ.

Кристаллы модифицированного и немодифицированного параокосном мутанта L-S35R были получены с помощью метода “висящей капли” с помощью смешивания равных объемов белка (8 мг/мл в буфере 50 mM трис-HCl pH 7,4) и преципитирующего раствора (0.15-0.2 M $MgCl_2$, 12-18% (w/v) полиэтиленгликоль 6000, 0.1 M ADA буфер pH 7.5), условия кристаллизации были очень близки к условиям кристаллизации нативного антитела A17 [99]. Через несколько дней были получены кристаллы палочковидной формы с примерными размерами $0.4 \times 0.2 \times 0.2$ мм. Данные рассеяния для немодифицированного белка были получены на оборудовании European Molecular Biology Laboratory/Deutsches Elektronen-Synchrotron (EMBL/DESY, Гамбург) на луче X13 на накопительном кольце DORIS, используя длину волны 0.8123 Å и детектор MARCCD 165mm. Данные рассеяния для модифицированного параокосном белка были получены на оборудовании European Molecular Biology Laboratory/Deutsches Elektronen-Synchrotron (EMBL/DESY, Гамбург) на луче P14 на накопительном кольце PETRA III, используя длину волны 0.8266 Å и детектор Pilatus 6M. Данные были получены при температуре жидкого азота (100 K) и в качестве криопротектного буфера использовали буфер (0.15-0.2 M $MgCl_2$, 12-18% (w/v) полиэтиленгликоль 6000, 0.1 M ADA буфер pH 7.5, 20% (v/v) PEG 400). Дифракционные данные были проиндексированы и интегрированы с помощью XDS [117] и масштабированы с помощью SCALA [118]. Значения $I/\sigma(I)$ и CC1/2 были использованы для поредления границ разрешения для мутанта L-S35R, модифицированного параокосном, в то время как для немодифицированного белка были использованы данные с самым высоким разрешением [119]. Значения $I/\sigma(I)$ и CC1/2 были использованы для определения границ разрешения для мутанта L-S35R, модифицированного параокосном, в то время как для немодифицированного белка были использованы данные с самым высоким разрешением (таблица 6).

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 белков, соответственно.

Результаты и обсуждения.

1. Детализация механизма реакции антитела A17 с параоксоном.

Ранее в лаборатории биокатализа ИБХ РАН в результате скрининга полусинтетической библиотеки переменных фрагментов генов иммуноглобулинов человека с использованием п-нитрофенил 8-метил-8-азабицикло[3.2.1]октан фенилфосфоната (рис. 16 А, В), было отобрано рекомбинантное одноцепочечное антитело A17, ковалентно взаимодействующее с необратимыми ингибиторами сериновых гидролаз [94]. 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. 16, С). Установлено, что гидролиз пестицида параоксон антителом A17 проходит через стадию образования фосфотирозинового ковалентного интермедиата с аминокислотным остатком L-Y37 [99]. Детали механизма реакции были проанализированы на полноразмерном антителе, экспрессированном в клетках CHO с использованием данных рентгено-структурного анализа и предстационарной кинетики [99]. Антитело A17 катализировало реакцию гидролиза параоксона в соответствии со следующей кинетической схемой:



Схема 1

где OP-X – лиганд, X – уходящая группа, Tyr37 – нуклеофильный остаток.

В данной работе нами была поставлена задача «улучшения» эффективности катализа первой стадии реакции, т.е. мы предприняли попытку «ускорить реакцию захвата» фосфонильного остатка молекулы параоксона остатком L-Y37 белка – акцептора (схема 2). При этом мы планировали свести до минимума реакцию

гидролиза фосфонильного производного (см. схему 1), т.е. превратить антитело А 17 в модельный антидот для связывания лиганда.

Ковалентное связывание

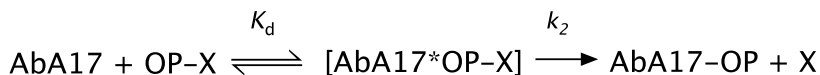


Схема 2

Для решения этой задачи мы прибегли к использованию набора расчетных методов для установления наиболее вероятного механизма реакции гидролиза параоксона (схема 1) с целью выяснения возможных потенциальных мутаций молекулы А17 для осуществления желаемой «перепрограммированной реакции» (схема 2). Таким образом, в данной работе мы рассматриваем антитело А17 в качестве исходной матрицы для последующей направленной модификации структуры с целью получения модельного антидота к ФОТ. На начальном этапе нам было необходимо представить детальный механизм полной реакции (см. схему 1) с целью формулировки «вектора эволюции» выбранной исходной матрицы. Данная часть работы выполнялась в рамках сотрудничества с группой доктора химических наук А.В. Головина (МГУ им. М.В.Ломоносова). Расчеты проводились на суперкомпьютере «Ломоносов». Автор диссертации принимал непосредственное участие в формулировке задачи по перепрограммированию реакционного пути и анализу алгоритмов расчетов.

На первой стадии была изучена ориентация параоксона внутри активного центра антитела А17 в предреакционном комплексе. Для этого был использован метод молекулярного докинга – метод, который позволяет предсказать наиболее выгодную для образования устойчивого комплекса ориентацию и положение одной молекулы по отношению к другой. В следствии того, что стартовое состояние реагирующих молекул не задано, будут 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 связывающих состояний. Положения параоксона, в котором возможна атака атома фосфора тирозином, наблюдались примерно в 5% случаев (рис. 18).

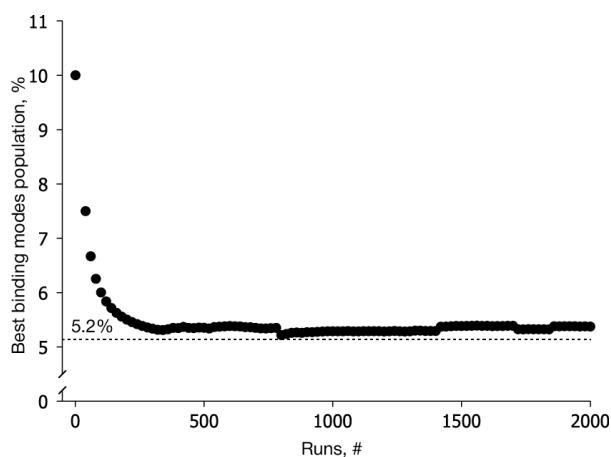


Рис. 18. Кривая насыщения популяции лучшего связывающего состояния.

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 (рис. 19). Наши расчеты были направлены на выяснение структуры предреакционного комплекса и базировались на известных нам данных рентгено-структурного анализа (см. литературный обзор).

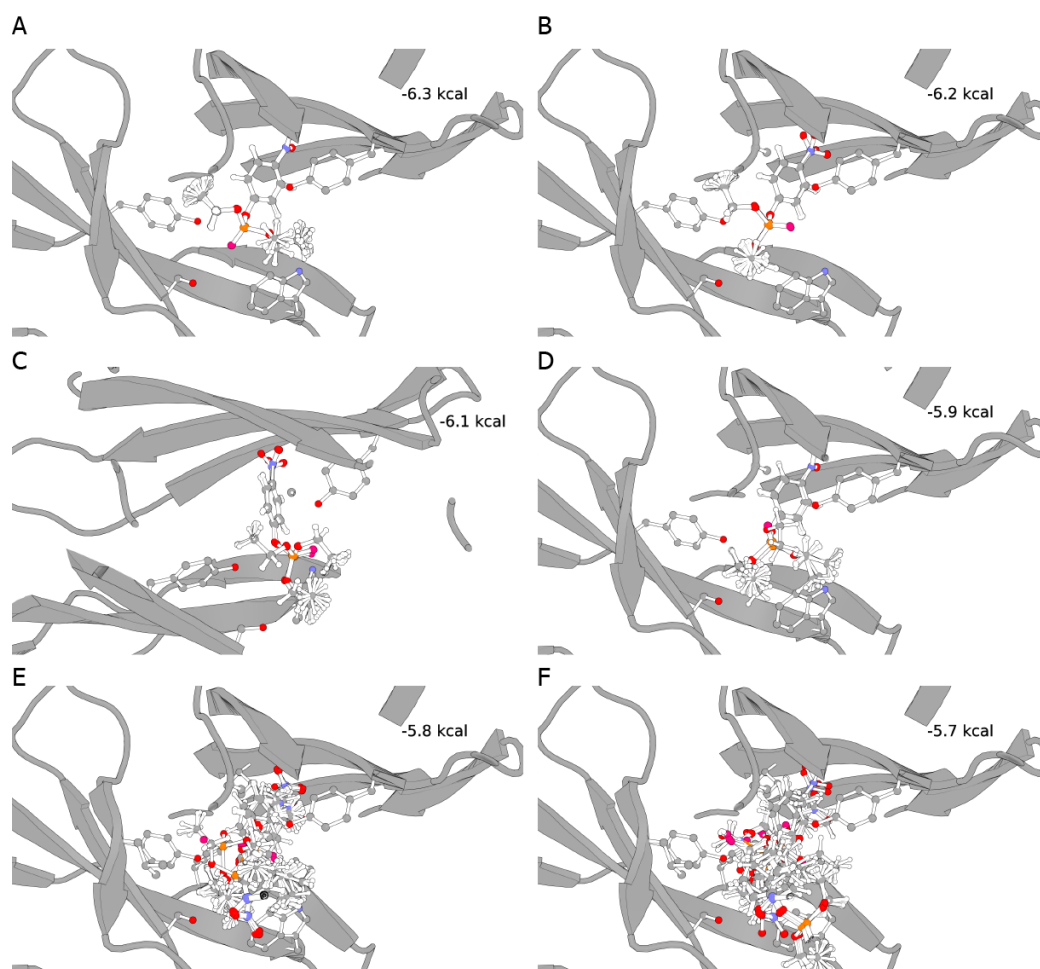


Рис. 19. Кластерный анализ связывающих состояний параоксона в активном центре антитела A17. Пунктирными линиями отмечены водородные связи между параоксоном и аминокислотными остатками активного центра – L-Tyr37 и L-Ser35. Атомы кислорода отмечены красным цветом, атом фосфора отмечен оранжевым цветом. Неоднородность связывающих состояний в каждом кластере показана в виде индивидуальных конформаций. Значения энергии связывания отмечены для каждого кластера.

Ни в одном из кластеров не наблюдалось нахождение нуклеофильного кислорода остатка L-Tyr37, расположенного в позиции, необходимой для *in-line* атаки атома фосфора параоксона. С помощью расчетов конформаций был определен один кластер, в котором возможно *in-line* позиционирование параоксона в предреакционной ориентации. Проведенные расчеты показывают, что в данном состоянии происходит вращение одной P-O и одной C-O связей относительно неподвижного нитробензольного кольца (рис. 20).

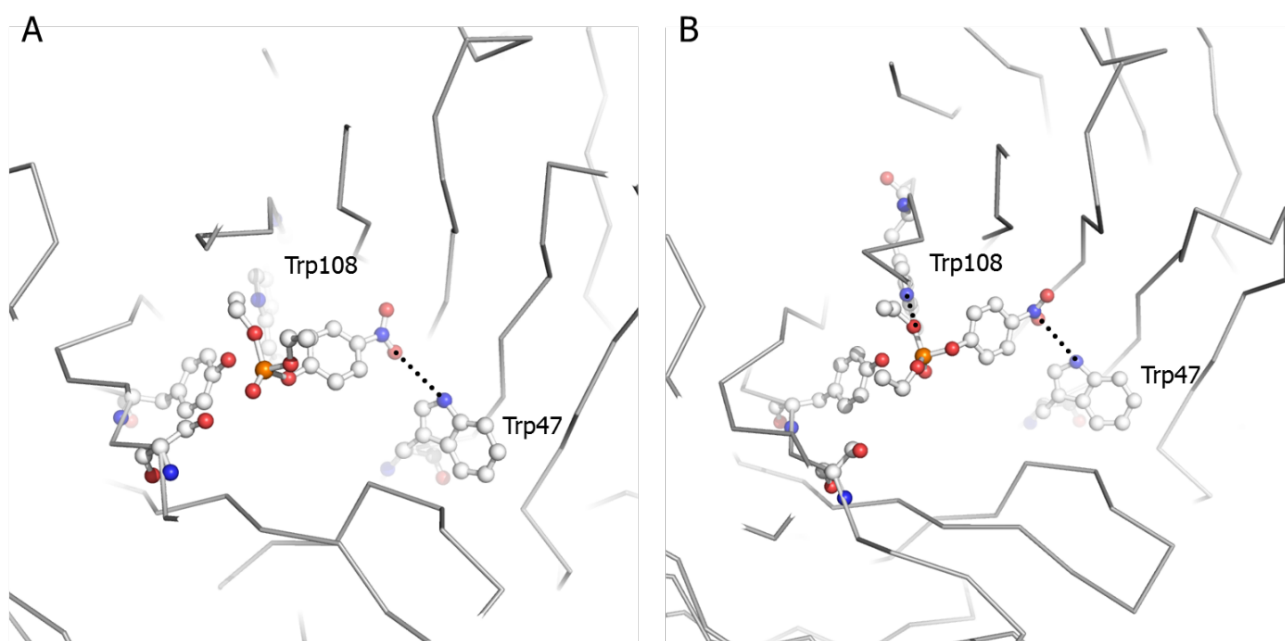


Рис. 20. Улучшение предреакционного комплекса для осуществления in-line атаки L-Tyr37. **(В)** Положение лиганда в предреакционном комплексе, найденное на основе лучшего кластера, представленного на рисунке 19, А. **(А)** Поворот вокруг связей PNP-O и PNPOP-O приводит к появлению активированного предреакционного состояния, в котором возможна in-line атака. Пунктирными линиями отмечены водородные связи между PNP и остатками 47 и 108 тяжелой цепи. Атомы кислорода отмечены красным цветом, атом фосфора отмечен оранжевым цветом.

После того, как было получено положение параоксона в предреакционном комплексе, необходимо было изучить механизм реакции взаимодействия антитела A17 с пестицидом параоксон. Поскольку изучаемая реакция – крайне редкое событие, для ускорения расчетов вместо классической КМ/ММ динамики была использована метадинамика. Метадинамика — метод, разработанный для ускорения появления редких событий [106]. 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.21). На первом этапе наблюдается предреакционный комплекс, определенный с помощью молекулярного докинга. Далее происходит сближение атома фосфора и L-Tyr37, и на расстоянии $2,2\text{\AA}$ между кислородом тирозина и атомом фосфора параоксона (O-P), 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 O–P 1,9Å), в результате чего происходит образование тригональной бипирамиды в позднем переходном состоянии. 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 паранитрофенола.



Рис. 21. Определенный с помощью КМ механизм реакции: S_N2 механизм образования тригональной бипирамиды.

С помощью данных КМ метадинамики был построен четырехмерный график поверхности свободной энергии образования ковалентного комплекса (рис. 22). График был построен как зависимость энергии реакции взаимодействия антитела A17 с параоксоном от трех коллективных переменных. Представительность состояний была рассчитана с помощью формулы

$$F(s) = -kBT \log(P(s))$$

где P – вероятность встретить точный набор коллективных переменных. Исходя из метадинамики, каждая конформация обладала набором значений коллективных переменных. Были выбраны три интервала значений коллективных 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 ($P=O\cdots H$) и от кислорода уходящей группы до атома фосфора параоксона ($P\cdots O-PNP$). Что бы предотвратить диффузию параоксона от активного остатка L-Tyr37, расстояние между ними было ограничено $2,5\text{\AA}$, что приводило к образования переходного состояния примерно в 50% случаев. На рисунке 22 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 $Tyr-O\cdots H$ и $P=O\cdots H$. 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 $P\cdots O-PNP$ с образованием метастабильного нитрофенолят-аниона, который получая протон превращается в п-нитрофенольную уходящую группу (4).

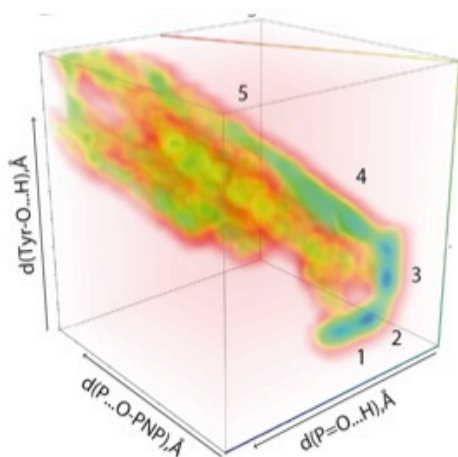


Рис. 22. 4D график, построенный исходя из данных изменения трех коллективных переменных – расстояний от протона до кислорода L-Tyr37 ($Tyr-O\cdots H$), от протона до фосфорильного кислорода ($P=O\cdots H$) и между кислородом уходящей группы и атомом фосфора параоксона ($P\cdots O-PNP$) и изменения энергии (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 $P\cdots O$ –

PNP с образованием метастабильного нитрофенолят-аниона, который получая протон превращается в п-нитрофенольную уходящую группу.

2. 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. 23, 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.

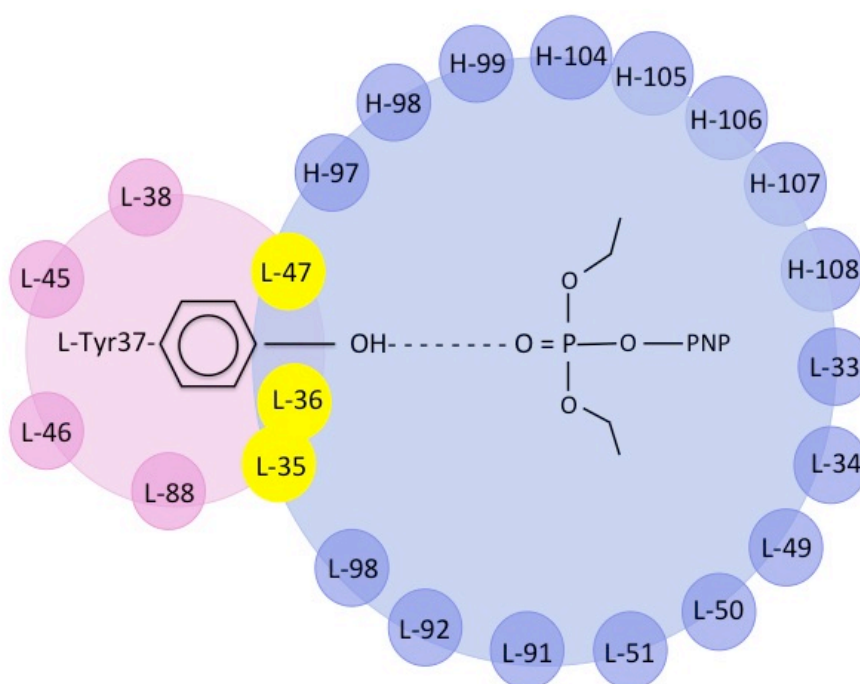


Рис. 23. Схематическое изображение активного центра антитела A17. Синими сферами отмечены аминокислотные остатки, которые теоретически могут образовывать водородные связи с параоксоном. Аминокислотные остатки, которые могут влиять на нуклеофильность тирозина отмечены розовыми сферами. Остатки, которые 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 $1,7 \cdot 10^9$ (уравнение 1), что все еще велико для *in silico* скрининга.

$$\left(\frac{aa!}{(aa-k)!} \right) \times \left(\frac{n!}{(n-k)!} \right) \text{ уравнение 1,}$$

где $k = 4$ (число одновременных замен), $aa = 11$ (число мутантных аминокислот), $n = 23$ (число аминокислотных позиций для замены).

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. 23, 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. 23, розовые и желтые сферы).

Эти ограничения привели к уменьшению библиотеки до 167538 мутантов (уравнение 2).

$$aa! \times \left(\left(\sum_{r=1}^3 \frac{n!}{(n-r)!} \right) + \frac{n!}{(n-1)!} \right) \times m \times p - p \times 6$$

уравнение 2,

где $n = 7$ (число позиций для замены на Glu, Asp или Ser); $r = 3$ (число сайтов, занятых Glu, Asp или Ser ($aa = 3$)); $p = 7$ (число аминокислотных остатков, которые теоретически могут образовывать водородную связь с параоксоном – Arg, His, Lys, Ser, Thr, Trp, Tyr), $m = 19$ (число аминокислотных позиций, которые теоретически могут образовывать водородную связь с параоксоном).

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 (рис. 24, уравнение 3).

$$E_{LJ} = \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad \text{уравнение 3}$$

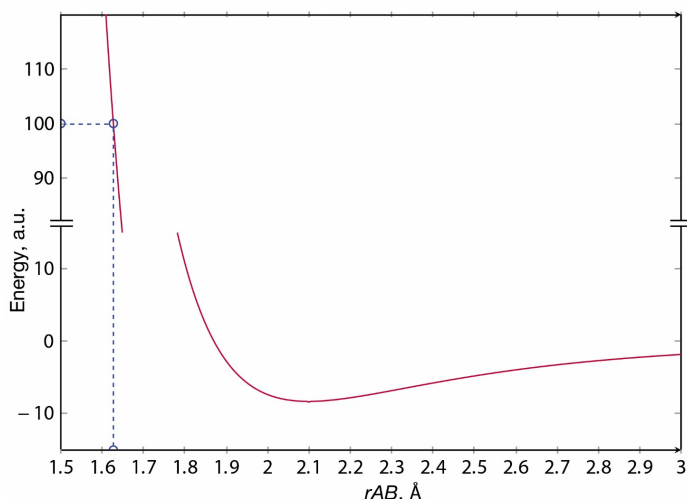


Рис. 24. Потенциал Леннарда-Джонса.

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 состояния 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. 25), 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. 26). 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

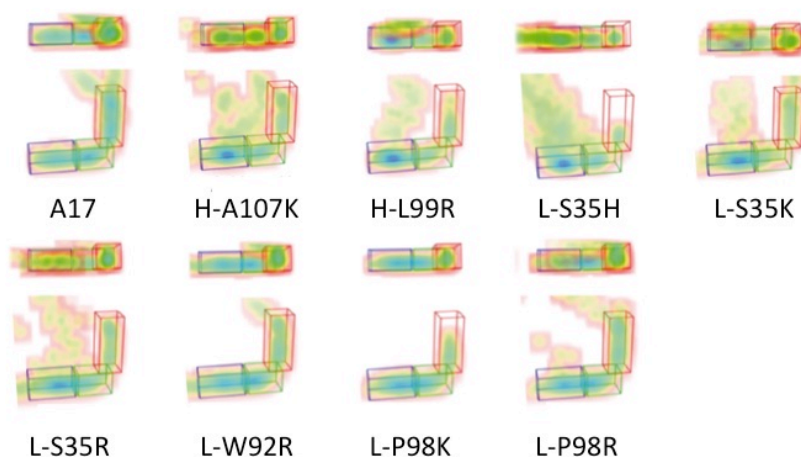


Рис. 25. 4D графики плотности конформаций. По трём осям отложены координаты реакции – расстояния от протона до кислорода L-Tyr37 (Tyr-O...H), от протона до фосфорильного кислорода (P=O...H) и между кислородом уходящей группы и атомом фосфора параоксона (P...O-PNP), которые описывают перенос протона и образование переходного состояния. Состояния, обведенные синими линиями, соответствуют не ковалентному связыванию. Состояния, обведенные зелеными линиями, соответствуют переносу протона. Состояния, обведенные красными линиями, соответствуют образованию тригональной бипирамиды.

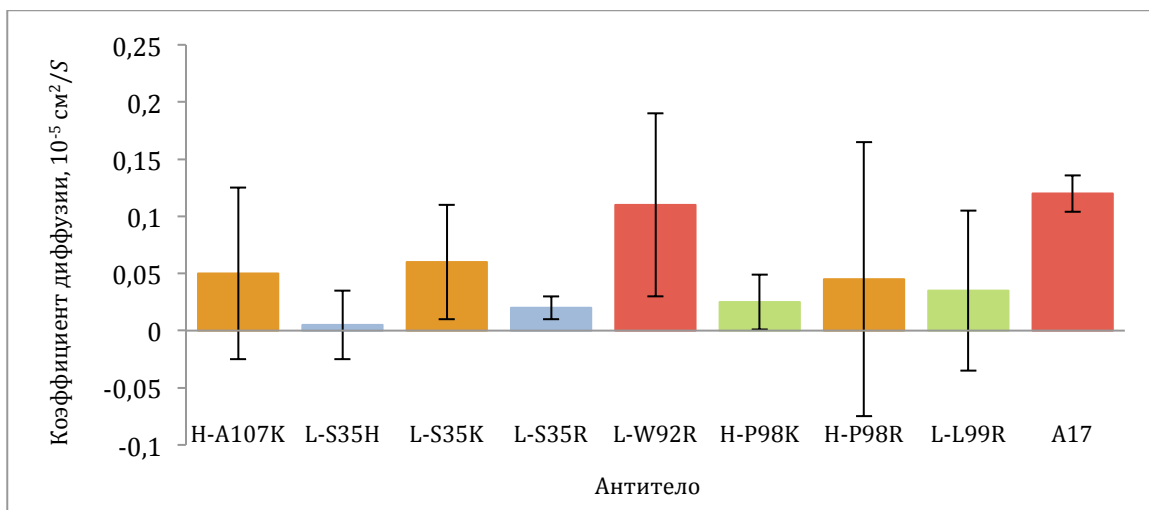


Рис. 26. Коэффициенты диффузии для параоксона в различных мутантах при классическом моделировании молекулярной динамики.

На стадии переноса протона может быть образована водородная связь между гидроксилом 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 антитела 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. 27).

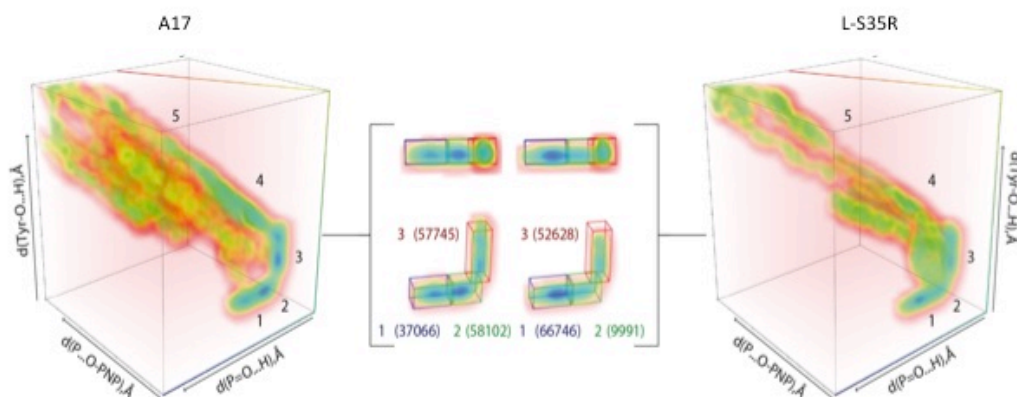


Рис. 27. 4D графики плотности конформаций, построенные исходя из данных изменения трех коллективных переменных – расстояний от протона до кислорода L-Tyr37 (Tyr-O...H), от протона до фосфорильного кислорода (P=O...H) и между кислородом уходящей группы и атомом фосфора параоксона (P...O-PNP) и изменения 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. 28.



Рис. 28. "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.

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

Таким образом, на основании приведенных расчетов нами был отобран набор ряда мутантов, потенциально обеспечивающих «перепрограммирования» выбранного нами маршрута реакции.

Для экспериментального подтверждения расчетных данных предсказанные мутанты были получены в виде рекомбинатных Fab-фрагментов. Конструкции, предназначенные для получения тяжелых и легких цепей Fab-фрагментов антител, были созданы на основе плазмиды pPicZ α (“Invitrogen”). pPicZ α содержит следующие элементы: индуцибельный промотор гена AOX1 (алкоголь оксидазы); нативный терминатор и сигнал полиаденилирования гена AOX1 дрожжей *P. pastoris* дикого типа; ген Sh ble, продукт которого обеспечивает устойчивость трансформантов к зеоцину; нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерный пептид α -фактора из *S. cerevisiae*, необходимую для секреции продуктов экспрессии. Так же вектор позволяет клонировать последовательность, кодирующую белок, слитый с с-тус эпитопом и шестью остатками гистидина, для стандартизации процесса обнаружения и очистки целевых белков. -

Для создания необходимых мутантов нами были созданы соответствующие генетические конструкции pPicZ α /polyJk1 (рис. 29, А), позволяющие клонировать легкие цепи антител, в вектор pPicZ α с помощью ПЦР-мутагенеза были внесены следующие изменения: элиминированы сайты рестрикции *HindIII* и *XhoI* в последовательностях AOX1 промотора и сигнального пептида α -фактора; внесен в последовательность полилинкера сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции *BsmBI*, позволяющий встраивание переменных доменов легкой цепи антител непосредственно за лидерным пептидом, часть полилинкера заменена на последовательность, кодирующую Jk1 фрагмент легкой цепи антител. Последовательность, кодирующая участок AOX1, α -factor и Jk1, содержащая сайты рестрикции для эндонуклеаз *BsmBI* и *XhoI*, была получена методом ПЦР и клонирована в вектор pPICZ α с использованием эндонуклеаз рестрикции *MfeI* и *XhoI* [120].

Нуклеотидную последовательность, кодирующую константный каппа домен α -цепи иммуноглобулина человека амплифицировали из полученных ранее конструкций методом ПЦР с помощью праймеров 1 и 2.

1. aggtaccaagctcgagatcaaacgtactgtggctgcaccatct
2. gcggcatcgatacactctcccctgttgaagctcttt

Полученный ПЦР продукт обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *XhoI* и *ClaI* и очищали в агарозном геле с последующей элюцией с помощью QIAquick PCR Purification Kit. Очищенный фрагмент был лигирован в вектор pPicZ α /polyJk, обработанный рестрикционными эндонуклеазами *XhoI* и *ClaI*. Корректность полученной последовательности pPicZ α /каппа (рис. 29, В) проверяли секвенированием по Сэнгеру [121]. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer.

Для экспрессии полноразмерной легкой цепи антитела A17 был сконструирован вектор pPicZ α /A17_Vl_каппа (рис. 29, С). Нуклеотидная последовательность, кодирующая переменный домен легкой цепи антитела A17 была амплифицирована из полученных ранее конструкций методом ПЦР с помощью праймеров 3 и 4.

3. ttgatctcgagcttggctccctcc
4. gaaggacctgcaggaaagacagtctgtgctgacgca

Полученный ПЦР продукт обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *BspMI* и *XhoI* и очищали в агарозном геле с последующей элюцией с помощью QIAquick PCR Purification Kit. Очищенный фрагмент был лигирован в вектор pPicZ α /каппа, обработанный рестрикционными эндонуклеазами *BspMI* и *XhoI*.

Для экспрессии тяжелой цепи был использован вектор pPicZ α /A17_Vh_CH1 (рис. 29, D) [120], который позволяет получить полипептид, содержащий лидерную область, фрагмент тяжелой цепи антитела и два эпитопа (3xFLAG и 6xHis), обеспечивающих альтернативное выявление и выделение требуемого продукта.

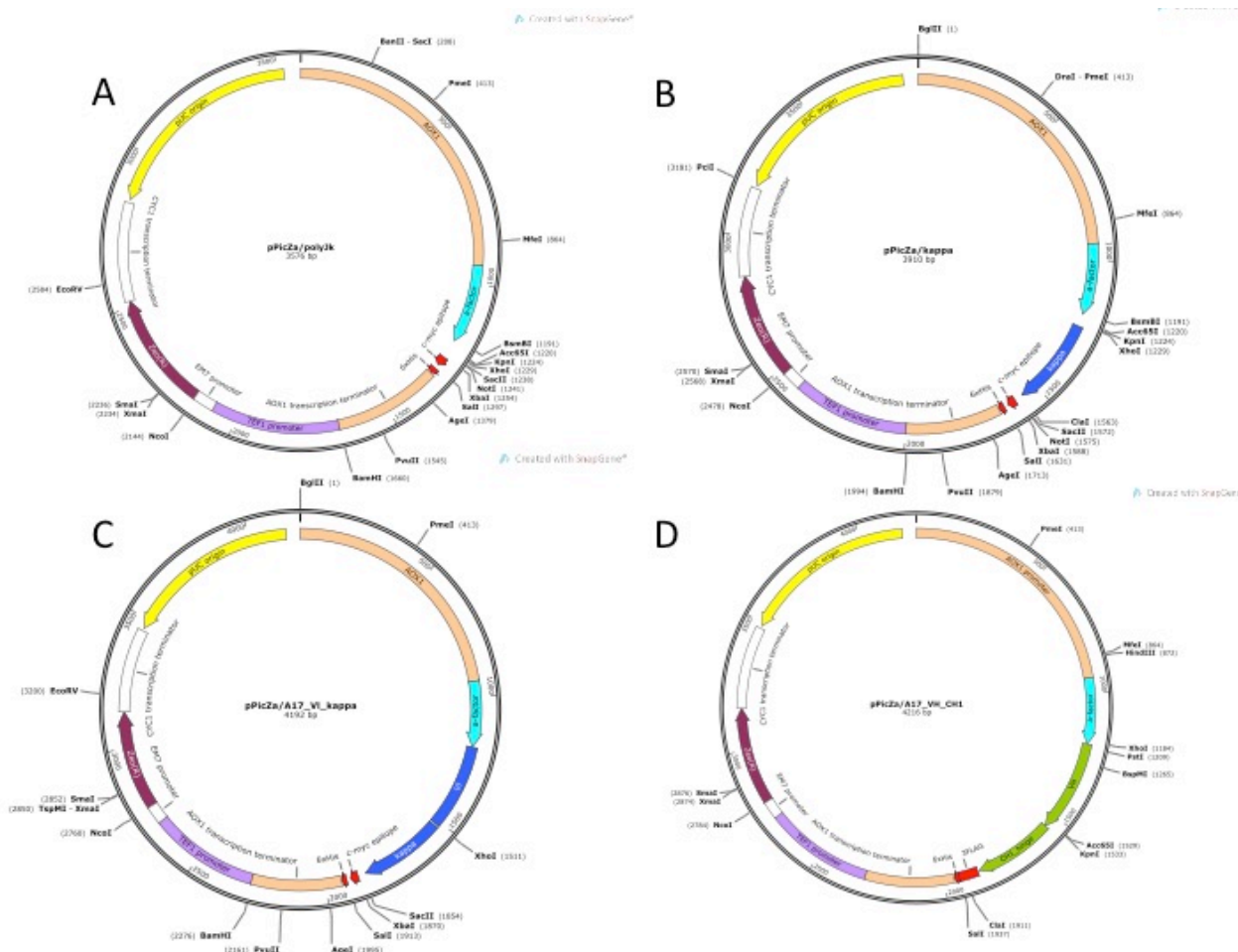


Рис. 29. Схемы генетических конструкций, использованных в работе.

Мутации в легкой цепи L-S35R, L-S35H, L-S35E, L-S35K, L-S35A, L-P98R были получены методом удлинения перекрывающихся ПЦР-продуктов, используя плазмиду pPicZa/A17_VI_kappa в качестве матрицы и праймеры: а/с и b/d для мутации L-S35R; а/h и b/g для мутации L-S35H; а/j и b/i для мутации L-S35E; а/к и b/l для мутации L-S35A; а/m и b/n для мутации L-S35K; а/f и b/e для мутации L-L47R; а/aa и b/bb для мутации L-P98R. Удлинение перекрывающихся ПЦР-продуктов осуществляли с помощью праймеров а/b. Тройные мутации L-L47D/L-S35R/L-W92D, L-L47R/L-S35D/L-P98E, L-L47D/L-S35E/L-Y50R, H-A107D/L-L47R/L-S35E были получены методом удлинения трех перекрывающихся ПЦР-продуктов. Мутации L-L47D/L-S35R/L-W92D были получены методом удлинения трех перекрывающихся ПЦР-продуктов, используя pPicZa/A17_L-S35R_kappa в качестве матрицы и праймеры q/p, b/o и a/r. Удлинение перекрывающихся ПЦР-продуктов осуществляли с помощью праймеров q/b, и далее с помощью праймеров а/b. Мутации L-L47R/L-S35D/L-P98E были получены методом удлинения трех

перекрывающихся ПЦР-продуктов, используя pPicZ α /A17_L-L47R/Lch в качестве матрицы и праймеры t/u, b/s и a/v. Удлинение перекрывающихся ПЦР-продуктов осуществляли с помощью праймеров u/b, и далее с помощью праймеров a/b. Мутации L-L47D/L-S35E/L-Y50R получали методом удлинения перекрывающихся ПЦР-продуктов, используя плазмиду pPicZ α /A17_L-S35E_kappa в качестве матрицы и праймеры b/x и a/w. Удлинение перекрывающихся ПЦР-продуктов осуществляли с помощью праймеров a/b. Полученные фрагменты ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *BspMI* и *XhoI*, элюировали из ПААГ и лигировали в вектор pPicZ α /kappa, предварительно рестрицированный по сайтам *BsmBI* и *XhoI* и дефосфорилированный. Мутации L-L47R/L-S35E были получены путем замены вставки между сайтами *KpnI* и *XhoI* в pPicZ α /A17_L-S35E_kappa на вставку, обработанную теми же эндонуклеазами рестрикции из плазмиды pPicZ α /A17_L-L47R_kappa. Мутация в тяжелой цепи H-A107D была получена с помощью ПЦР, используя pPicZ α /A17_Vh_CH1 в качестве матрицы и праймеры y/z. Мутацию H-L99R получали методом удлинения перекрывающихся ПЦР-продуктов, используя плазмиду pPicZ α /A17_Vh_CH1 в качестве матрицы и праймеры z/cc и ee/dd. Удлинение перекрывающихся ПЦР-продуктов осуществляли с помощью праймеров z/dd. Полученные фрагменты ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *KpnI* и *PstI*, элюировали из ПААГ и лигировали в вектор pPicZ α /A17_Vh_CH1, предварительно рестрицированный по тем же сайтам и дефосфорилированный. Для быстрой селекции клонов мутантов, в последовательности были введены или удалены сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции (таблица 2). Корректность всех полученных последовательностей проверяли секвенированием.

Таблица 2. Введенные или удаленные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции для быстрой селекции мутантных клонов.

	Введение сайта	Удаление сайта
L-S35R		<i>KpnI</i>
L-S35K	<i>SnaBI</i>	
L-S35H	<i>ApaII</i>	
L-S35E	<i>Eco105I</i>	

L-S35A	<i>SspI</i>	
L-L99R	<i>PvuII</i>	
H-P98R	<i>Acc65I</i>	
L-L47D/L-S35R/L-W92D	<i>BglIII, HindIII</i>	<i>KpnI</i>
L-L47R/L-S35D/L-P98E	<i>AfeI, SalI, DraI</i>	
L-L47D/L-S35E/L-Y50R	<i>EheI, Eco105I</i>	
L-L47R/L-S35E/H-A107D	<i>AfeI, Eco105I, MfeI</i>	

Последовательности использованных праймеров:

- a) ttgatctcgagcttggtccctcc
- b) atcgtctcaaagacagtctgtgctgacgc
- c) ttatgtacgctggtatcagcagc
- d) gctgctgataccagcgtacataa
- e) cataaattaagcgcttgggggctg
- f) cagcccccaagcgcttaatttatg
- g) tgctggtaccagtgcacataattattc
- h) aataattatgtgcactggtaccagcag
- i) gctgctggtaccattctacgtaattattc
- j) aataattacgtagaatggtaccagcagc
- k) aataattatgtagcttgggtaccagcagctc
- l) accaagctacataattattcccaatattggagct
- m) aataattacgtaaagtgggtatcagcag
- n) ctgataccactttacgtaattattccc
- o) gtcataaatgagatctttgggggctg
- p) cagcccccaaagatctcatttatgac
- q) cggattcaagcttgaatcatctgttccgcagtaata
- r) tattactgcggaacagatgattcaagcttgaatccg
- s) gctgctggtaccagtcgacataattattcc
- t) ggaataattatgtcgactggtaccagcagc
- u) ccgccgaatacttcatttaaactgctatcccatg
- v) catgggatagcagtttaaatgaagtattcggcgg
- w) gtaccagcagctcccaggaacggcgcccaaagacctcattagagacaataataagcgaccc

- x) tgagggtcgcttattattgtctctaatagaggtctttgggcgccgttcctgggagctgctg
- y) gaccagggtaccttgcccccaattgtcatcattatgcg
- z) aaaagacaggtgcagctgcaggag
- aa) aatcgcgtattcggcggaggtaccaag
- bb) cttgg acctccgccgaatacgcgatt
- cc) cgtgcgtcctgcacagtaatacacagctgt
- dd) gcctgagttccacgacaccgtca
- ee) actgtgcaggacgcacgcagtc

Конструкции pPicZ α , кодирующие тяжелые и легкие цепи Fab-фрагмента антитела A17 дикого типа или мутантов, были линейаризованы с помощью эндонуклеазы рестрикции *PmeI*. Линейаризованные конструкции были использованы для трансформации клеток штамма GS115 *P. pastoris*. Селекцию клонов, содержащих Fab-фрагменты антитела A17 проводили с использованием антибиотика зеоцин. Встраивание соответствующих экспрессионных единиц в хромосомную ДНК трансформантов *P. pastoris* подтверждали с помощью ПЦР анализа с использованием специфических олигонуклеотидов 5'АОХ и 3'АОХ, соответствующих 5'- и 3'- концам последовательности АОХ1 промотора и терминатора. При использовании в качестве матрицы геномной ДНК рекомбинантных клонов, были амплифицированы фрагменты ДНК размером около 1200 и 2100 п.о., соответствующие нуклеотидной последовательности интегрированных тяжелой (1212 п.о.) и легкой (1188 п.о.) цепей антитела A17 и гену алкогольоксидазы АОХ1 (2105 п.о.). Поскольку в ходе создания мутаций в легкой и тяжелой цепях в качестве маркера мутированного ДНК фрагмента использовали изменение рестриктоного профиля – создание дополнительного или элиминирование существующего рестриктоного сайта, полученные ПЦР-продукты были рестрицированы с помощью нужной эндонуклеазы рестрикции. Так, например, рестрикциионные сайты *Eco105I* и *ApaII* были введены в последовательности в случае мутаций L-S35E и L-S35H, соответственно. При рестрикции ПЦР-фрагмента мутанта L-S35E рестриктазой *Eco105I*, будут получены фрагменты 2105 п.о. (АОХ1), 1212 п.о. (тяжелая цепь) и два фрагмента легкой цепи 748 п.о. и 440 п.о. При рестрикции ПЦР-фрагмента мутанта L-S35H рестриктазой *ApaII*, будут получены фрагменты 2105 п.о. (АОХ1), два фрагмента

тяжелой цепи 846 п.о. и 366 п.о. и два фрагмента легкой цепи 748 п.о. и 440 п.о. Поскольку ПЦР-фрагменты тяжелой и легкой цепи имеют сходную массу, то наличие тяжелой цепи определяли с помощью рестрикции по сайту *Bam*HI, что дает фрагмент 2105 п.о. (АОХ1), два фрагмента тяжелой цепи 761 п.о. и 451 п.о. и фрагмент 1188 п.о. (легкая цепь) (рис. 30).

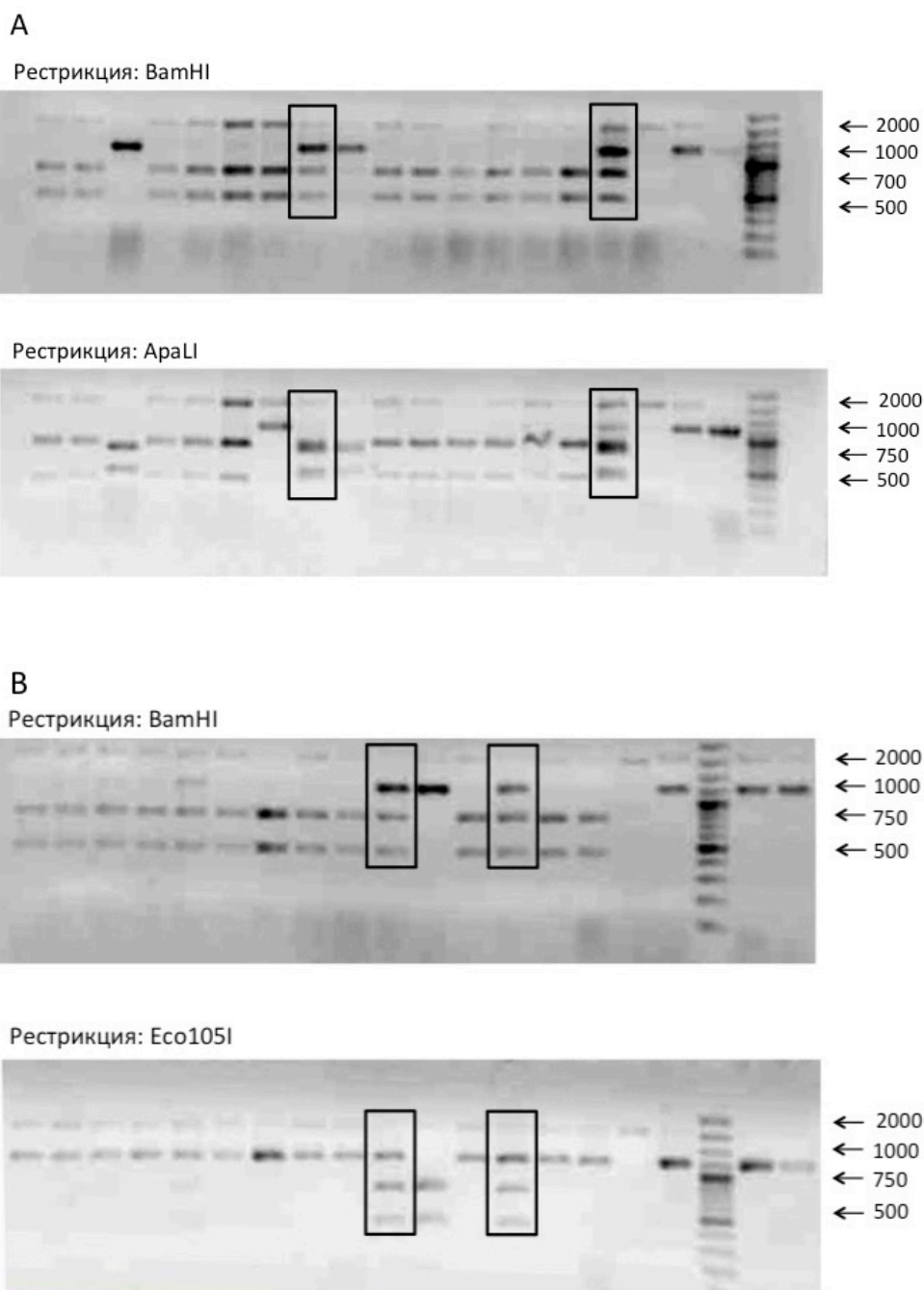


Рис. 30. Рестрикционный анализ ПЦР продуктов амплификации генов мутантов L-S35H (**А**) и L-S35E (**В**), интегрированных в геном дрожжей. Клоны с корректной вставкой обеих цепей обведены прямоугольниками.

Последовательности использованных праймеров:

5' AOX: gactggtccaattgacaagc

3' AOX: gcaaatggcattctgacatcc

Аналогичная процедура была проведена для всех мутантов.

Также с помощью дот-блот-Вестерн анализа проверяли наличие в экспрессионной среде одновременно тяжелой и легкой цепи (рис. 31). Аналогичная процедура была проведена для всех мутантов.

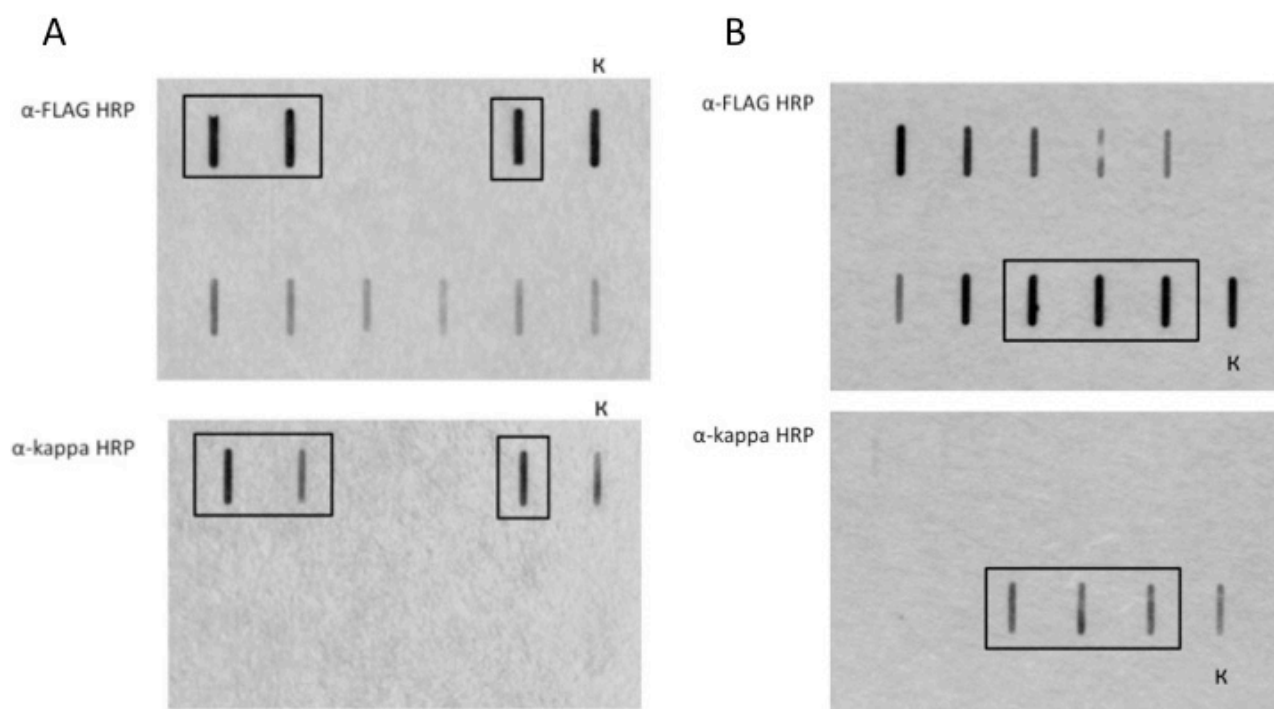


Рис. 31. Анализ продукции Fab-фрагментов L-S35E (А) и L-S35H (В) методом дот-блот. Визуализацию осуществляли с использованием антител козы к каппа цепи иммуноглобулинов человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (для детекции легкой цепи) и антител мыши к FLAG эпитопу, конъюгированные с пероксидазой хрена (для детекции тяжелой цепи). к – контроль. Прямоугольниками обведены клоны, экспрессирующие одновременно обе цепи.

Затем была разработана система экспрессии Fab-фрагмента антитела A17 в препаративных количествах. Для этого были использованы качалочные колбы большого объема (750 мл). Культуральную среду собирали и центрифугировали

при 1500 g и 4°C в течение 5 минут. Далее супернатант фильтровали через фильтрационные ячейки Millistak+ pod filter (Millipore). Осветленную культуральную среду концентрировали на мембране 10 кДа в 10-20 раз по объему на приборе Pellicon (Millipore). Полученный концентрат был переведен в соответствующий буфер нанесения и очищен методом металл-хелатной хроматографии на колонке Ni-NTA (Qiagen). Вследствии ограниченной емкости колонки, посадка всего белка не возможна за один раунд хроматографии, поэтому фракцию, несорбировавшуюся на колонке, переносили несколько раз до тех пор, пока весь целевой белок не будет очищен (рис. 32). После чего осуществляли ионообменную хроматографию на носителе monoQ (Amersham) (рис. 33) и гель-фильтрацию на колонке Superdex 75 (Amersham) (Рис. 34).

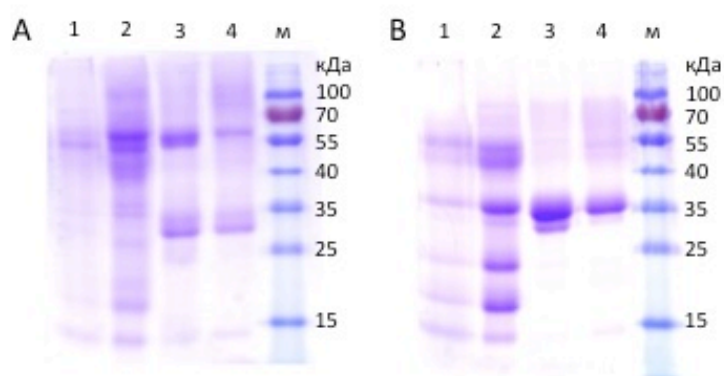


Рис. 32. Электрофореграмма денатурирующего 12% ПААГ в невосстанавливающих (А) и восстанавливающих (В) условиях с последующей окраской Кумассии синим R250 очистки Fab-фрагмента L-S35E из культуральной среды. 1 – культуральная среда, 2 – концентрат 10 кДа, 3 , 4 – элюат Ni-NTA, м-маркер молекулярных весов.

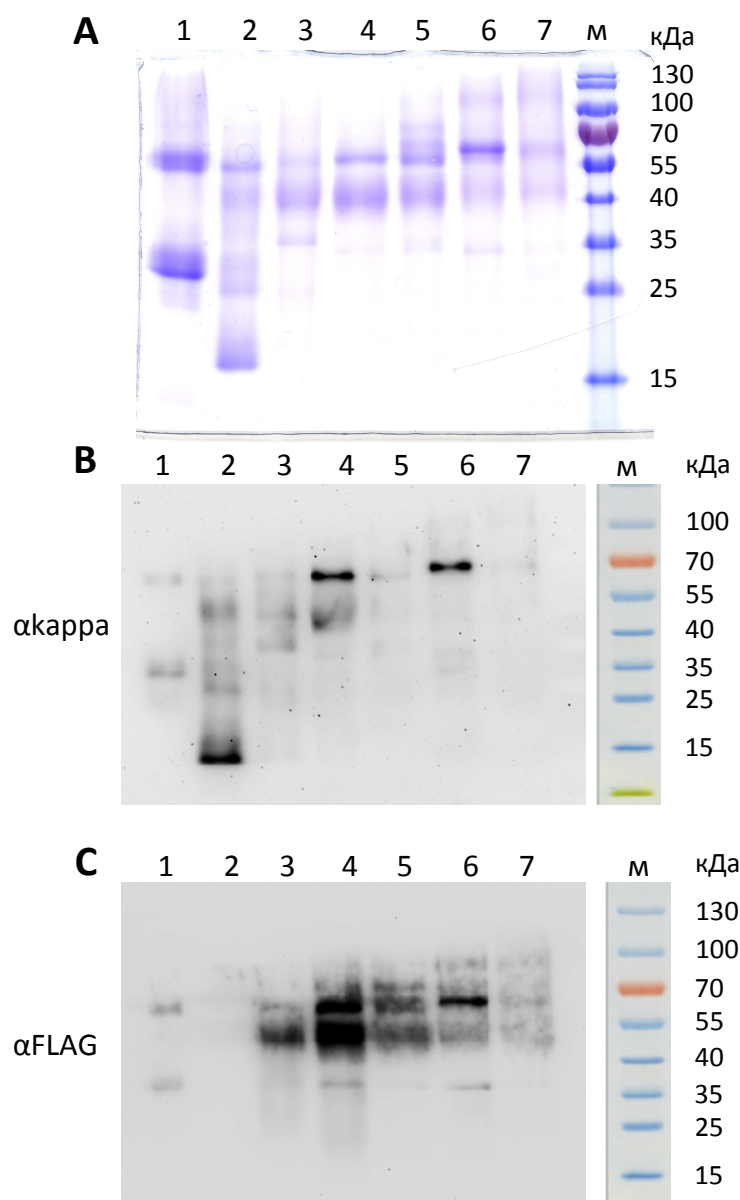


Рис. 33. Электрофореграмма денатурирующего 12% ПААГ в невосстанавливающих (A) условиях с последующей окраской Кумасии синим R250 и Вестерн-блот анализ в невосстанавливающих условиях (B, C) очистки Fab-фрагмента L-S35E на носителе моноQ. 1 – элюат Ni-NTA, 2 – фракция, не сорбировавшаяся на носителе, 3-7 – элюат моноQ, м – маркер молекулярных весов. Визуализацию осуществляли с использованием антител козы к каппа цепи иммуноглобулинов человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (для детекции легкой цепи, B) и антител мыши к FLAG эпитопу, конъюгированные с пероксидазой хрена (для детекции тяжелой цепи, C).

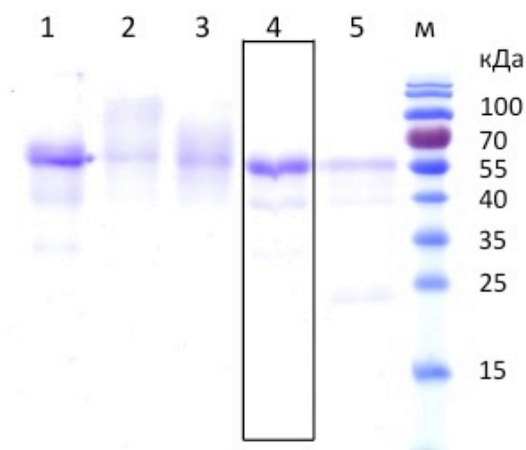


Рис. 34. Электрофореграмма денатурирующего 12% ПААГ в невозстанавливающих условиях с последующей окраской Кумасии синим R250 очистки Fab-фрагмента L-S35E с помощью гель-фильтрации на колонке Superdex 75. 1 – элюат с моноQ, 2-5 – элюат Superdex 75, м – маркер молекулярных весов. Фракция очищенного препарата обведена прямоугольником.

Клетки, трансформированные смесью линейизованных плазмид pPicZ α , кодирующие тяжелые и легкие цепи Fab-фрагмента антитела A17 дикого типа или мутантов продуцировали набор секреторных белков с подвижностью около 55 и 27 кДа, связывающихся с антителами к константному домену каппа цепи иммуноглобулинов человека и с антителами к FLAG эпитопу (рис. 32, 33, 34). Эти данные согласуются 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. В таблице 3 представлены наибольшие уровни продукции клонов, экспрессирующих антитело A17 и его мутанты, посчитанные с помощью денситометрического анализа.

Таблица 3. Уровни экспрессии наилучших клонов антитела A17 и его мутантов.

	Уровень продукции, мг/л
A17	15
L-S35R	20
L-S35K	8
L-S35H	9,5

L-S35E	13
L-S35A	15
L-L99R	10
H-P98R	17
L-L47D/L-S35R/L-W92D	9
L-L47R/L-S35D/L-P98E	10
L-L47D/L-S35E/L-Y50R	11
L-L47R/L-S35E/H-A107D	19

Функциональный анализ полученных мутантов антитела A17.

С целью подтверждения гипотезы о «перепрограммировании реакционного пути» (см. схему 1 и 2) 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 (рис. 16) приведены в таблице 4. 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 4)), 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 связано с худшими значениями 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 худшей ориентацией субстрата в активном центре (рис. 26). 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. Так же был

проанализировали мутант, который исходя из компьютерных расчетов был неактивным – мутант с глутаминовой кислотой в 35 положении. Согласно экспериментальным данным, этот мутант не активен по отношению к параоксону и фосфонату X. По видимому, перенос протона с тирозина на параоксон затруднен вблизи отрицательно-заряженной аминокислоты. Так же 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 рКа боковой цепи гистидина равен 6,1, присутствие гидроксил-иона вблизи активного центра возможно, поэтому гидролиз возможен.

Таблица 4. 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 ⁻¹)	K_d (M)	k_3 (min ⁻¹)	k_2/K_d (M ⁻¹ min ⁻¹)	k_2/K_d (M ⁻¹ min ⁻¹)
L-S35R	7.8×10^{-2}	3.40×10^{-4}	Н.Д	229	Н.Д
L-S35K	8×10^{-2}	6.00×10^{-4}	Н.Д	133	Н.Д
L-S35H	1.2×10^{-2}	6.00×10^{-4}	1.2×10^{-4}	20	Н.Д
L-S35E	Н.Д	Н.Д	Н.Д	-	Н.Д
L-S35A	Н.Д	Н.Д	Н.Д	-	Н.Д
L-L99R	0.6×10^{-2}	5.10×10^{-4}	Н.Д	11.7	78
H-P98R	Н.Д	Н.Д	Н.Д	-	Н.Д
A17	Н.Д	Н.Д	1.6×10^{-4}	1.35	2000±500 [99]

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. 35).

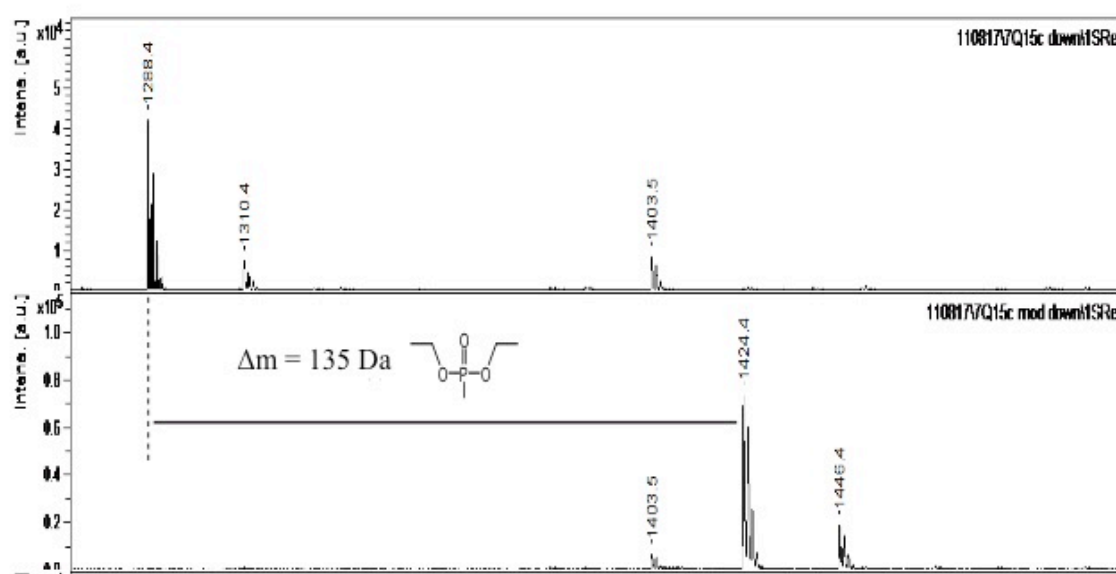


Рис. 35. MALDI масс-спектр триптического гидролизата Fab-фрагмента антитела L-S35R (верхний спектр) и его производного, модифицированного параоксоном (нижний спектр). Разница молекулярных масс соответствующих пиков пептидов (WYQQLPGTAPK), содержащих аминокислотный остаток L-Tyr37 в немодифицированном и модифицированном антителе соответствует весу остатка параоксона (136 Да).

Ранее в лаборатории биокатализа было показано использование каталитическим антителом A17 принципа индуцированного соответствия при взаимодействии с фосфонатом X [99]. Для детализации каталитического механизма мутантов L-S35R и L-S35H и антитела дикого типа, наряду со стационарной, была изучена предстационарная кинетика взаимодействия с параоксоном, анализ которой показал, что все три белка реализуют механизм индуцированного соответствия при взаимодействии с параоксоном (таблица 5). Действительно, как

следует из таблицы схема взаимодействия антител с параоксоном включает стадии связывания субстрата и перестройку комплекса абзим/субстрат.

Таблица 5. 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.

	$K_I,$ $mM^{-1} sec^{-1}$	$k_1 sec^{-1}$	K_{D1} (mM)	k_2, sec^{-1}	$k_{-1} sec^{-1}$	K_{D2}	K_{Dpss} (mM)
A17	3.3±0.1	460±13	142±7	42±1	117±2	2.8±0.1	380±32
L-S35R	1.77±0.03	260±10	130±7	73±4	105±4	1.4±0.1	180±23
L-S35H	1.58±0.2	150±5	95±4	50±3	60±2	1.2±0.1	114±14

4. 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, показавшего ускорение реакции акцепции фосфонильного остатка параоксона в 170 раз (см. предыдущий раздел). 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 п-нитрофенолу на 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 центрифугирования на 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.

Кристаллизация и анализ рентгено-структурных данных осуществлялись в Европейской молекулярно-биологической лаборатории (EMBL) в рамках совместного гранта (№ RFMEFI61614X0009, руководители зав. лабораторией EMBL М. Вильманнс, г. Гамбург, Германия и зав. лаборатории биокатализа ИБХ РАН, А.Г. Габибов). Детальный анализ структуры был осуществлен в рамках совместных семинаров двух лабораторий. Кристаллизация была осуществлена непосредственно автором диссертации, которая также принимала непосредственное участие в сборе и анализе рентгеновских данных. 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. 36). 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. Структурные данные и статистика улучшения представлены в таблице 6.

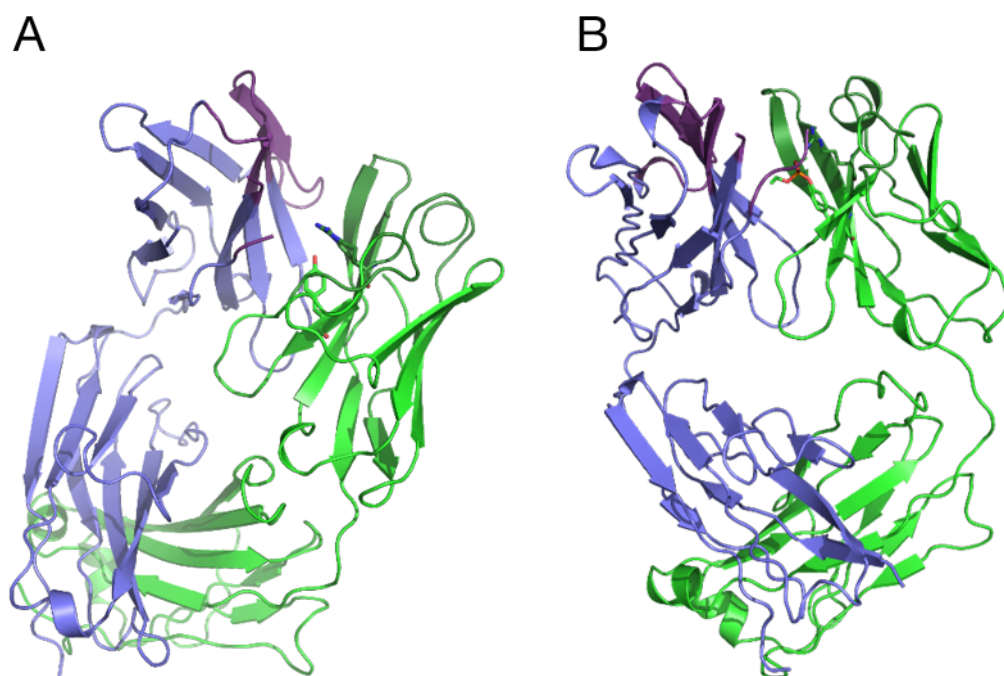


Рис. 36. (А) Общая структура антитела L-S35R и (В) его ковалентного аддукта с остатком параоксона (PDB: 5ADP и PDB: 5ADO, соответственно). Тяжелая цепь показана синим, легкая цепь показана зеленым.

Таблица 6. Структурные данные и статистика улучшения.

	Мутант L-S35R	
	Немодифицированный, pdb 5ADP	Модифицированный, pdb 5ADO
Структурные данные		
Источник	Луч X13, DORIS, EMBL/DESY	Луч P14, PetraIII, EMBL/DESY
Количество изображений	334	3600
Диапазон колебаний (°)	0,45	0,1
Пространственная группа	P 1 2 ₁ 1	P 1 2 ₁ 1
Параметры ячейки	a=52.55 Å, b=67.04 Å, c=66.95 Å, β=107.6°	a=52.66 Å, b=67.08 Å, c=66.7 Å, β=107.5°
Разрешение (Å)	19,4 – 2,13 (2,21 – 2,13)	20,0 – 1,53 (1,65 – 1,53)
Длина волны (Å)	0,8123	0,8266
Завершенность (%)	97,7 (93,4)	99,7 (99,8)
Повторяемость	3,2 (2,9)	6,7 (6,9)
R_{merge} (%)	4.3 (27.3)	4.6 (93.4)
R_{rim} (%)	6.1 (38.5)	5.0 (100)
R_{pim} (%)	4.3 (27.1)	1.9 (38.0)
CC_{1/2}	99.9 (91.0)	99.9 (78.4)
<I/σI>	19.4 (4.7)	18.5 (2.0)
Расчетный B-фактор (Wilson plot)	26,8	23,5
Статистика улучшения		
Диапазон разрешения (Å)	19,3-2,1	20,0-1,53
Число отражений/использованных для расчета R_{free}	24208/1231	60774/3246
R_{work}/R_{free} (%)	17.9/22.0	16.8/19.9
Число атомов белка	3226	3267

Число атомов лиганда	0	8
Число атомов растворителя	241	494
В-фактор (Å), белок	29,3	31,1
В-фактор (Å), лиганд		38,9
В-фактор (Å), растворитель	34,7	42,2
Среднеквадратичное отклонение, длина связи (Å)	0,003	0,01
Среднеквадратичное отклонение, угол (Å)	0,8	1,2

Обе структуры были изоморфны кристаллической структуре нативного антитела A17, принадлежащей $P 1 2_1 1$ пространственной группе. Структура L-S35R была разрешена с помощью молекулярного замещения с использованием MOLREP [122] и структуры нативного A17 в качестве исходной модели (PDB код 2XZA, [99]). Дальнейшее улучшение было произведено с помощью PHENIX [123]. Молекулы растворителя были расположены автоматически с помощью PHENIX под визуальным контролем. Для немодифицированного L-S35R окончательная модель содержала остатки 2-223 тяжелой цепи и 2-218 легкой цепи, за исключением остатков 101-106 и 135-139 тяжелой цепи. Для модифицированного параоксоном варианта окончательная модель состояла из остатков 2-222 тяжелой цепи и 4-216 легкой цепи, исключая остатки 101-104 и 134-139 тяжелой цепи.

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 [124]). 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) (таблица 7).

Таблица 7. Сравнение параметров смещения атомов для CDR легкой и тяжелой цепей антитела дикого типа и мутанта L-S35R (L-S35R – PDB 5ADP; L-S35R, модифицированный параоксоном – PDB 5ADO; A17 – PDB 2XZA; A17, модифицированный фосфонатом X – PDB 2XZC).

Петля CDR	ADP (Å ²)				Нормализованный ADP			
	A17	L-S35R	A17 фосфонат X	L-S35R параоксон	A17	L-S35R	A17 фосфонат X	L-S35R параоксон
H-CDR1	17.4	53.1	10.7	50.0	1.2	1.6	0.9	1.8
H-CDR2	16.9	40.2	10.6	39.5	1.1	1.2	0.9	1.4
H-CDR3	22.0 (34.9)	69.7	13.3 (16.6)	59.2	1.3 (2.3)	2.1	1.1 (1.4)	2.1
L-CDR1	20.9	46.4	12.8	34.0	1.4	1.4	1.1	1.2
L-CDR2	19.2	40.1	12.7	29.8	1.3	1.2	1.1	1.0
L-CDR3	18.5	38.0	12.2	28.3	1.2	1.1	1.0	1.0

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. 37, 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. 37, 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: С ϵ сдвигается на 5.2 Å (рис. 37, С), наглядно демонстрируя механизм индуцированного соответствия для этого антитела, показанный ранее с помощью

предстацонарна кінетика взаємодії антитело-субстрат методом
остановленого потоку.

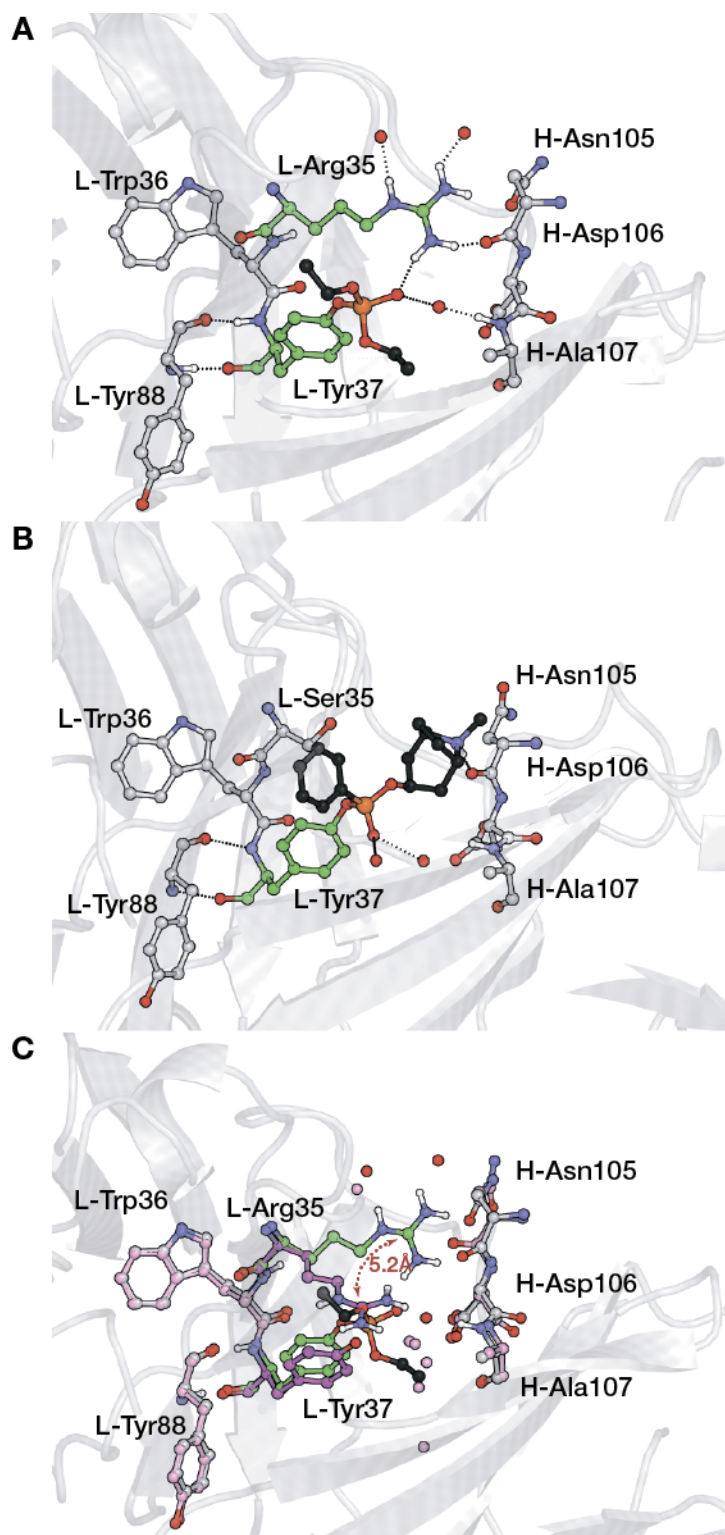


Рис. 37. Структурний аналіз ковалентних комплексів мутанта L-S35R і нативного антитіла A17 з параоксоном і фосфонатом X, відповідно. (А) Активний сайт і водородні зв'язки в активному центрі L-S35R, зв'язаного з залишком параоксона (PDB: 5ADO); каталітичний залишок L-Tyr37 показаний зеленим, “пасивні” амінокислотні залишки – сірим, діетил фосфат – чорним, водородні зв'язки – чорними пунктирними

линиями. (В) активный сайт и водородные связи в активном центре антитела A17, связанного с остатком фосфоната X (PDB: 2XZC); каталитический остаток L-Тур37 показан зеленым, пассивные аминокислотные остатки – серым, фенилфосфонат – черным, водородные связи – черными пунктирными линиями. (С) 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. 37, А). Как следует из данных рентгено-структурного 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 фосфонильного остатка параоксона мутантной формой антитела A17.

Заключение.

В данной работе 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 проэкспрессированы, 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.

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.

Список литературы.

1. Reetz, M.T. and J.D. Carballeira, *Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes*. Nat Protoc, 2007. **2**(4): p. 891-903.
2. Wong, T.S., D. Zhurina, and U. Schwaneberg, *The diversity challenge in directed protein evolution*. Comb Chem High Throughput Screen, 2006. **9**(4): p. 271-88.
3. Cesaro-Tadic, S., et al., *Turnover-based in vitro selection and evolution of biocatalysts from a fully synthetic antibody library*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(6): p. 679-85.
4. Yin, J., J.H. Mills, and P.G. Schultz, *A catalysis-based selection for peroxidase antibodies with increased activity*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(10): p. 3006-7.
5. Strobel, H., D. Ladant, and J.L. Jestin, *In vitro selection for enzymatic activity: a model study using adenylate cyclase*. J Mol Biol, 2003. **332**(1): p. 1-7.
6. Barbas, C.F., 3rd, et al., *Immune versus natural selection: antibody aldolases with enzymic rates but broader scope*. Science, 1997. **278**(5346): p. 2085-92.
7. Yim, S.S., et al., *Rapid isolation of antibody from a synthetic human antibody library by repeated fluorescence-activated cell sorting (FACS)*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e108225.
8. Zhang, J., et al., *Mammalian cell display for rapid screening scFv antibody therapy*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014. **46**(10): p. 859-66.
9. Freeman, A., et al., *Screening of large protein libraries by the cell immobilized on adsorbed bead approach*. Biotechnol Bioeng, 2004. **86**(2): p. 196-200.
10. Daugherty, P.S., *Protein engineering with bacterial display*. Curr Opin Struct Biol, 2007. **17**(4): p. 474-80.
11. Gera, N., M. Hussain, and B.M. Rao, *Protein selection using yeast surface display*. Methods, 2013. **60**(1): p. 15-26.
12. Zhou, C., et al., *Development of a novel mammalian cell surface antibody display platform*. MAbs, 2010. **2**(5): p. 508-18.
13. Rajpal, A., et al., *A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(24): p. 8466-71.
14. Tawfik, D.S. and A.D. Griffiths, *Man-made cell-like compartments for molecular evolution*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(7): p. 652-6.
15. Griffiths, A.D. and D.S. Tawfik, *Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartmentalization*. EMBO J, 2003. **22**(1): p. 24-35.
16. Sepp, A., D.S. Tawfik, and A.D. Griffiths, *Microbead display by in vitro compartmentalisation: selection for binding using flow cytometry*. FEBS Lett, 2002. **532**(3): p. 455-8.
17. Mastrobattista, E., et al., *High-throughput screening of enzyme libraries: in vitro evolution of a beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions*. Chem Biol, 2005. **12**(12): p. 1291-300.
18. Gupta, R.D., et al., *Directed evolution of hydrolases for prevention of G-type nerve agent intoxication*. Nat Chem Biol, 2011. **7**(2): p. 120-5.
19. Goldsmith, M., et al., *Evolved stereoselective hydrolases for broad-spectrum G-type nerve agent detoxification*. Chem Biol, 2012. **19**(4): p. 456-66.
20. Tu, R., et al., *A flow cytometry-based screening system for directed evolution of proteases*. J Biomol Screen, 2011. **16**(3): p. 285-94.

21. Guo, M.T., et al., *Droplet microfluidics for high-throughput biological assays*. Lab Chip, 2012. **12**(12): p. 2146-55.
22. Clausell-Tormos, J., et al., *Droplet-based microfluidic platforms for the encapsulation and screening of Mammalian cells and multicellular organisms*. Chem Biol, 2008. **15**(5): p. 427-37.
23. Mazutis, L., et al., *Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics*. Nat Protoc, 2013. **8**(5): p. 870-91.
24. Schaerli, Y. and F. Hollfelder, *The potential of microfluidic water-in-oil droplets in experimental biology*. Mol Biosyst, 2009. **5**(12): p. 1392-404.
25. Granieri, L., et al., *High-throughput screening of enzymes by retroviral display using droplet-based microfluidics*. Chem Biol, 2010. **17**(3): p. 229-35.
26. Agresti, J.J., et al., *Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(9): p. 4004-9.
27. Stewart, J.D., et al., *Site-directed mutagenesis of a catalytic antibody: an arginine and a histidine residue play key roles*. Biochemistry, 1994. **33**(8): p. 1994-2003.
28. Hifumi, E., et al., *Highly efficient method of preparing human catalytic antibody light chains and their biological characteristics*. FASEB J, 2012. **26**(4): p. 1607-15.
29. Zheng, L., et al., *Expression improvement and mechanistic study of the retro-Diels-Alderase catalytic antibody 10F11 by site-directed mutagenesis*. J Mol Biol, 2004. **341**(3): p. 807-14.
30. Millard, C.B., O. Lockridge, and C.A. Broomfield, *Organophosphorus acid anhydride hydrolase activity in human butyrylcholinesterase: synergy results in a somanase*. Biochemistry, 1998. **37**(1): p. 237-47.
31. Järv, J., *Stereochemical aspects of cholinesterase catalysis*. Bioorganic Chemistry, 1984. **12**(4): p. 259-78.
32. Lockridge, O., et al., *A single amino acid substitution, Gly117His, confers phosphotriesterase (organophosphorus acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase*. Biochemistry, 1997. **36**(4): p. 786-95.
33. Millard, C.B., O. Lockridge, and C.A. Broomfield, *Design and expression of organophosphorus acid anhydride hydrolase activity in human butyrylcholinesterase*. Biochemistry, 1995. **34**(49): p. 15925-33.
34. Warshel, A. and M. Levitt, *Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme*. J Mol Biol, 1976. **103**(2): p. 227-49.
35. Warshel, A. and M. Karplus, *Calculation of pi-pi excited state conformations and vibronic structure of retinal and related molecules*. J Am Chem Soc, 1974. **96**(18): p. 5677-89.
36. van der Kamp, M.W. and A.J. Mulholland, *Computational enzymology: insight into biological catalysts from modelling*. Nat Prod Rep, 2008. **25**(6): p. 1001-14.
37. Pan, Y., et al., *Computational redesign of human butyrylcholinesterase for anticocaine medication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(46): p. 16656-61.
38. Zheng, F., et al., *A highly efficient cocaine-detoxifying enzyme obtained by computational design*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3457.
39. Lu, Y., et al., *Design of functional metalloproteins*. Nature, 2009. **460**(7257): p. 855-62.
40. Khare, S.D., et al., *Computational redesign of a mononuclear zinc metalloenzyme for organophosphate hydrolysis*. Nat Chem Biol, 2012. **8**(3): p. 294-300.

41. Bowman, A.L., I.M. Grant, and A.J. Mulholland, *QM/MM simulations predict a covalent intermediate in the hen egg white lysozyme reaction with its natural substrate*. Chem Commun (Camb), 2008(37): p. 4425-7.
42. van der Kamp, M.W., F. Perruccio, and A.J. Mulholland, *High-level QM/MM modelling predicts an arginine as the acid in the condensation reaction catalysed by citrate synthase*. Chem Commun (Camb), 2008(16): p. 1874-6.
43. Warshel, A. and A. Papazyan, *Energy considerations show that low-barrier hydrogen bonds do not offer a catalytic advantage over ordinary hydrogen bonds*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13665-70.
44. Mulholland, A.J., P.D. Lyne, and M. Karplus, *Ab Initio QM/MM Study of the Citrate Synthase Mechanism. A Low-Barrier Hydrogen Bond Is not Involved*. J. Am. Chem. Soc., 2000. **122**(3): p. 534-5.
45. Mulholland, A.J. and W.G. Richards, *Acetyl-CoA enolization in citrate synthase: a quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) study*. Proteins, 1997. **27**(1): p. 9-25.
46. Yang, W. and D.G. Drueckhammer, *Coenzyme A: Demonstration of a Layered Quantum Mechanical Approach*. The Journal of Physical Chemistry B, 2014. **107**(24): p. 5986-5994.
47. Karpusas, M., B. Branchaud, and S.J. Remington, *Proposed mechanism for the condensation reaction of citrate synthase: 1.9-A structure of the ternary complex with oxaloacetate and carboxymethyl coenzyme A*. Biochemistry, 1990. **29**(9): p. 2213-9.
48. van der Kamp, M.W., F. Perruccio, and A.J. Mulholland, *Ab initio QM/MM modelling of acetyl-CoA deprotonation in the enzyme citrate synthase*. J Mol Graph Model, 2007. **26**(3): p. 676-90.
49. Mowat, C.G., et al., *Kinetic and crystallographic analysis of the key active site acid/base arginine in a soluble fumarate reductase*. Biochemistry, 2001. **40**(41): p. 12292-8.
50. Hung, J.E., et al., *Investigation of the role of Arg301 identified in the X-ray structure of phosphite dehydrogenase*. Biochemistry, 2012. **51**(21): p. 4254-62.
51. Lodola, A., et al., *QM/MM modelling of oleamide hydrolysis in fatty acid amide hydrolase (FAAH) reveals a new mechanism of nucleophile activation*. Chem Commun (Camb), 2005(35): p. 4399-401.
52. Tubert-Brohman, I., O. Acevedo, and W.L. Jorgensen, *Elucidation of hydrolysis mechanisms for fatty acid amide hydrolase and its Lys142Ala variant via QM/MM simulations*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(51): p. 16904-13.
53. Vyas, S., et al., *Butyrylcholinesterase and G116H, G116S, G117H, G117N, E197Q and G117H/E197Q mutants: a molecular dynamics study*. Chem Biol Interact, 2010. **187**(1-3): p. 241-5.
54. Yao, Y., J. Liu, and C.G. Zhan, *Why does the G117H mutation considerably improve the activity of human butyrylcholinesterase against sarin? Insights from quantum mechanical/molecular mechanical free energy calculations*. Biochemistry, 2012. **51**(44): p. 8980-92.
55. Zhang, Y., J. Kua, and J.A. McCammon, *Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: an ab initio QM/MM study*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(35): p. 10572-7.

56. Cheng, Y., et al., *Acetylcholinesterase: mechanisms of covalent inhibition of wild-type and H447I mutant determined by computational analyses*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(20): p. 6562-70.
57. Socolich, M., et al., *Evolutionary information for specifying a protein fold*. Nature, 2005. **437**(7058): p. 512-8.
58. Dahiyat, B.I. and S.L. Mayo, *De novo protein design: fully automated sequence selection*. Science, 1997. **278**(5335): p. 82-7.
59. Kuhlman, B., et al., *Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy*. Science, 2003. **302**(5649): p. 1364-8.
60. Koga, N., et al., *Principles for designing ideal protein structures*. Nature, 2012. **491**(7423): p. 222-7.
61. Chen, C.Y., et al., *Computational structure-based redesign of enzyme activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 3764-9.
62. Zanghellini, A., et al., *New algorithms and an in silico benchmark for computational enzyme design*. Protein Sci, 2006. **15**(12): p. 2785-94.
63. Siegel, J.B., et al., *Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction*. Science, 2010. **329**(5989): p. 309-13.
64. Lippow, S.M., K.D. Wittrup, and B. Tidor, *Computational design of antibody-affinity improvement beyond in vivo maturation*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(10): p. 1171-6.
65. Tinberg, C.E., et al., *Computational design of ligand-binding proteins with high affinity and selectivity*. Nature, 2013. **501**(7466): p. 212-6.
66. Grigoryan, G., A.W. Reinke, and A.E. Keating, *Design of protein-interaction specificity gives selective bZIP-binding peptides*. Nature, 2009. **458**(7240): p. 859-64.
67. Korkegian, A., et al., *Computational thermostabilization of an enzyme*. Science, 2005. **308**(5723): p. 857-60.
68. Osipovitch, D.C., et al., *Design and analysis of immune-evading enzymes for ADEPT therapy*. Protein Eng Des Sel, 2012. **25**(10): p. 613-23.
69. Salvat, R.S., et al., *Computationally driven deletion of broadly distributed T cell epitopes in a biotherapeutic candidate*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(24): p. 4869-80.
70. Rothlisberger, D., et al., *Kemp elimination catalysts by computational enzyme design*. Nature, 2008. **453**(7192): p. 190-5.
71. Jiang, L., et al., *De novo computational design of retro-aldol enzymes*. Science, 2008. **319**(5868): p. 1387-91.
72. Tantillo, D.J., J. Chen, and K.N. Houk, *Theozymes and compuzymes: theoretical models for biological catalysis*. Curr Opin Chem Biol, 1998. **2**(6): p. 743-50.
73. Malisi, C., O. Kohlbacher, and B. Hocker, *Automated scaffold selection for enzyme design*. Proteins, 2009. **77**(1): p. 74-83.
74. Thorn, S.N., et al., *Large rate accelerations in antibody catalysis by strategic use of haptenic charge*. Nature, 1995. **373**(6511): p. 228-30.
75. Khersonsky, O., et al., *Evolutionary optimization of computationally designed enzymes: Kemp eliminases of the KE07 series*. J Mol Biol, 2010. **396**(4): p. 1025-42.

76. Khersonsky, O., et al., *Optimization of the in-silico-designed kemp eliminase KE70 by computational design and directed evolution*. J Mol Biol, 2011. **407**(3): p. 391-412.
77. Khersonsky, O., et al., *Bridging the gaps in design methodologies by evolutionary optimization of the stability and proficiency of designed Kemp eliminase KE59*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(26): p. 10358-63.
78. Alexandrova, A.N. and W.L. Jorgensen, *Origin of the activity drop with the E50D variant of catalytic antibody 34E4 for Kemp elimination*. J Phys Chem B, 2009. **113**(2): p. 497-504.
79. Hilvert, D., et al., *Antibody Catalysis of a Diels-Alder Reaction*. J. Am. Chem. Soc., 1989. **111**: p. 9261-1.
80. Braisted, A.C. and P.G. Schultz, *An Antibody-Catalyzed Bimolecular Diels-Alder Reaction* J Am Chem Soc, 1990. **112**: p. 7430-1.
81. Romesberg, F.E. and P.G. Schultz, *A mutational study of a Diels-Alderase catalytic antibody*. Bioorg Med Chem Lett, 1999. **9**(13): p. 1741-4.
82. Romesberg, F.E., et al., *Immunological origins of binding and catalysis in a Diels-Alderase antibody*. Science, 1998. **279**(5358): p. 1929-33.
83. Wirsching, P., et al., *Reactive immunization*. Science, 1995. **270**(5243): p. 1775-82.
84. Sinha, S.C., C.F. Barbas, 3rd, and R.A. Lerner, *The antibody catalysis route to the total synthesis of epothilones*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14603-8.
85. Shamis, M., H.N. Lode, and D. Shabat, *Bioactivation of self-immolative dendritic prodrugs by catalytic antibody 38C2*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(6): p. 1726-31.
86. Sinha, S.C., et al., *Prodrugs of dynemicin analogs for selective chemotherapy mediated by an aldolase catalytic Ab*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 3095-9.
87. Shabat, D., et al., *In vivo activity in a catalytic antibody-prodrug system: Antibody catalyzed etoposide prodrug activation for selective chemotherapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7528-33.
88. List, B., C.F. Barbas, 3rd, and R.A. Lerner, *Aldol sensors for the rapid generation of tunable fluorescence by antibody catalysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15351-5.
89. Giger, L., et al., *Evolution of a designed retro-aldolase leads to complete active site remodeling*. Nat Chem Biol, 2013. **9**(8): p. 494-8.
90. Althoff, E.A., et al., *Robust design and optimization of retroaldol enzymes*. Protein Sci, 2012. **21**(5): p. 717-26.
91. Clark, L.A., et al., *Affinity enhancement of an in vivo matured therapeutic antibody using structure-based computational design*. Protein Sci, 2006. **15**(5): p. 949-60.
92. Barderas, R., et al., *Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(26): p. 9029-34.
93. Farady, C.J., et al., *Improving the species cross-reactivity of an antibody using computational design*. Bioorg Med Chem Lett, 2009. **19**(14): p. 3744-7.
94. Reshetnyak, A.V., et al., *Routes to covalent catalysis by reactive selection for nascent protein nucleophiles*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(51): p. 16175-82.
95. Griffiths, A.D., et al., *Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires*. EMBO J, 1994. **13**(14): p. 3245-60.

96. Tramontano, A., et al., *Inhibition and labeling of enzymes and abzymes by phosphonate diesters*. Appl Biochem Biotechnol, 2000. **83**(1-3): p. 233-42; discussion 242-3, 297-313.
97. Paul, S., et al., *Phosphonate ester probes for proteolytic antibodies*. J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28314-20.
98. Kitz, R. and I.B. Wilson, *Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase*. J Biol Chem, 1962. **237**: p. 3245-9.
99. Smirnov, I., et al., *Reactibodies generated by kinetic selection couple chemical reactivity with favorable protein dynamics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(38): p. 15954-9.
100. Duan, Y., et al., *A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations*. J Comput Chem, 2003. **24**(16): p. 1999-2012.
101. Rezac, J. and P. Hobza, *Advanced Corrections of Hydrogen Bonding and Dispersion for Semi-empirical Quantum Mechanical Methods*. J. Chem. Theory Comput., 2011. **8**(1): p. 141-51.
102. Jorgensen, W.L., et al., *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water*. J. Chem. Phys., 1983. **79**(2): p. 926-35.
103. Bekker, H., et al., *Gromacs: A parallel computer for molecular dynamics simulations*. Physics Computing' 92, 1993.
104. Stewart, J.J.P., *MOPAC2012*. Stewart Computational Chemistry, 2008.
105. Laio, A. and M. Parrinello, *Escaping free-energy minima*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12562-6.
106. Laio, A. and F.L. Gervasio, *Metadynamics: A method to simulate rare events and reconstruct the free energy in biophysics, chemistry and material science*. Reports on Progress in Physics, 2008. **71**(12).
107. Bonomia, M., et al., *PLUMED: A portable plugin for free-energy calculations with molecular dynamics*. Computer Physics Communications, 2009. **180**(10): p. 1961-72.
108. Tribello, G.A., et al., *PLUMED 2: New feathers for an old bird*. Computer Physics Communications, 2014. **185**(2): p. 604-613.
109. Dupradeau, F.Y., et al., *The R.E.D. tools: advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building*. Phys Chem Chem Phys, 2010. **12**(28): p. 7821-39.
110. Sousa da Silva, A.W. and W.F. Vranken, *ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface*. BMC Research Notes 2012. **5**.
111. Lindorff-Larsen, K., et al., *Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field*. Proteins, 2010. **78**(8): p. 1950-8.
112. Bussi, G., D. Donadio, and M. Parrinello, *Canonical sampling through velocity rescaling*. J Chem Phys, 2007. **126**(1): p. 014101.
113. Lee, S.Y. and S. Rasheed, *A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA*. Biotechniques, 1990. **9**(6): p. 676-9.
114. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
115. Hixson, C.S. and E.G. Krebs, *Affinity labeling of catalytic subunit of bovine heart muscle cyclic AMP-dependent protein kinase by 5'-p-fluorosulfonylbenzoyladenosine*. J Biol Chem, 1979. **254**(16): p. 7509-14.

116. Pocker, Y. and N. Janjic, *Enzyme kinetics in solvents of increased viscosity. Dynamic aspects of carbonic anhydrase catalysis*. Biochemistry, 1987. **26**(9): p. 2597-606.
117. Kabsch, W., *Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 2): p. 133-44.
118. Evans, P., *Scaling and assessment of data quality*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2006. **62**(Pt 1): p. 72-82.
119. Karplus, P.A. and K. Diederichs, *Linking crystallographic model and data quality*. Science, 2012. **336**(6084): p. 1030-3.
120. Zakharov, A.V., et al., *[Expression of the catalytic antibodies in eukaryotic systems]*. Mol Biol (Mosk), 2011. **45**(1): p. 86-95.
121. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
122. Vagin, A. and A. Teplyakov, *Molecular replacement with MOLREP*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 1): p. 22-5.
123. Afonine, P.V., et al., *Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2012. **68**(Pt 4): p. 352-67.
124. Kabsch, W., *A solution for the best rotation to relate two sets of vectors*. Acta Crystallogr A 1976. **32**: p. 922-923.