

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Степановой Анастасии Валерьевны «НАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ АНТИТЕЛ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КОМБИНАТОРНЫХ БИБЛИОТЕК ГЕНОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 «молекулярная биология»

Диссертационная работа А.В. Степановой посвящена актуальным вопросам современной молекулярной биологии, связанным со структурными закономерностями и молекулярными механизмами важных с практической точки зрения функциональных процессов. При этом автор использует в работе самые современные методы и подходы, удачно их сочетая для получения новых фундаментальных знаний о каталитической активности антитела A17 по отношению к определенным фосфоорганическим пестицидам. Это обстоятельство делает работу важной также и с практической точки зрения, учитывая неоднозначное влияние на биосферу многих токсических фосфоорганических соединений (ФОТ).

Диссертационная работа А.В. Степановой построена по традиционной схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, используемых в работе, изложения результатов, их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 111 страницах, содержит 37 рисунка и 7 таблиц. В библиографии диссертации представлено 124 источника.

В вводной части автор в краткой форме обосновывает актуальность направления представленных исследований, формулирует цели, задачи и положения, выносимые на защиту.

Подготовленный А.В. Степановой литературный обзор вводит все понятия, необходимые для рассмотрения рационального дизайна как средства улучшения каталитической активности и эффективности действия белковых структур, а также сопутствующих вопросов. Подробно рассмотрены как экспериментальные, так и теоретические методы рационального дизайна структур ингибиторов ФОТ, эффективные методы отбора структурных библиотек для этих белков, а также получения антител против ФОТ. Можно отметить хороший и приятно читающийся обзор работ в области результатов применения методов КМ/ММ для изучения механизмов ферментативного гидролиза ФОТ. В качестве замечаний по этому разделу можно отметить ряд опечаток, использования англицизмов и забавных выражений типа: «Поверхность потенциальной энергии показала...» (с.28), «замена его может повлиять на электронную среду...» (с.29), «происходит протонный перенос в атомах углерода...» (с.34), «депротонирует углерод и рассеивает получившийся отрицательный заряд...» (там же), и др.

В разделе «Материалы и методы» автор с достаточной степенью подробности излагает используемые им расчетные методы биоинформатики и молекулярного моделирования, а также экспериментальные методы, которые были необходимы для получения мутантных форм антител и изучения их структуры. В частности, изложены особенности применения к изучаемым системам метода КМ/ММ, указаны используемые программные ресурсы, а также описаны необходимые сведения об использованных экспериментальных методах и реактивах для получения, выделения и очистки мутантных форм антител, а также их кристаллизации. Отметим также, что выполнялся рентгеноструктурный анализ полученных форм антител для установления пространственной структуры с использованием возможностей синхротрона в Гамбурге. Полученные данные были размещены в Protein Data Bank.

В разделе «Результаты и обсуждения» представлена сутевая часть полученных автором результатов. На первом этапе работы был исследован механизм реакции взаимодействия антитела A17 с пестицидом параоксон. Моделирование и детальное понимание механизма реакции позволило автору понять алгоритм получения мутантных форм антитела A17 с заданной специфичностью. Разработанный автором подход позволил редуцировать размер библиотеки возможных антител (порядка 20^{23} вариантов), и проскринировав редуцированную библиотеку получить ограниченный набор вариантов последовательностей для решения поставленных задач. С помощью разработанного алгоритма число мутантов было сокращено до 9 активных мутантов, для одного из которых (L-S35R) с помощью квантово-механического/молекулярно-механического анализа было показано максимальное увеличение вероятности формирования водородной связи между нуклеофильным остатком и фосфорильным атомом кислорода по сравнению с антителом дикого типа, а также наименьшее значение коэффициента диффузии параоксона в активном центре антитела. Положительным моментом диссертации является проведенная автором экспериментальная проверка расчетных результатов. Для всех мутантов, обладающих активностью по данным КМ/ММ расчетов были созданы генетические конструкции, которые были проэкспрессированы в эукариотической системе *Pichia Pastoris*. Получение чистых белковых препаратов позволило провести ряд экспериментов, которые подтвердили то, что мутант L-S35R обладает наибольшей эффективностью взаимодействия с параоксоном. Дальнейший рентгеноструктурный анализ мутантного антитела L-S35R и его ковалентного комплекса с остатком параоксона подтвердил предположение что введение остатка аргинина в 35 положение легкой цепи улучшает позиционирование за счет образования водородной связи с фосфорильным атомом кислорода параоксона. Интересно отметить, что полученная кристаллическая

структура активного центра модифицированного антитела L-S35R практически совпадает с теоретически предсказанной несмотря на то, что все расчеты базировались на структуре антитела дикого типа.

В ходе выполнения работы А.В. Степановой получен ряд новых научных результатов. Показана возможность теоретического прогнозирования и получения каталитических антител против высокотоксичных антигенов, чего невозможно достичь использованием классических методов иммунизации животных. Автор показал, что на основании знаний об особенностях протекания реакции возможно создание широких виртуальных библиотек активного центра, размеры которых ограничены только мощностью современных суперкомпьютеров.

Материалы исследования логично и последовательно изложены в подготовленной диссертации и ее автореферате. Результаты каждого раздела диссертационной работы дополняют и логически развивают положения, установленные автором ранее. Используемый при обработке экспериментальных данных математический аппарат обеспечивает достоверность интерпретации результатов исследования. Описываемые эффекты и закономерности подтверждены корректно спланированными контрольными экспериментами. Формулируемые выводы обоснованы, логично вытекают из экспериментальных данных, полностью соответствуют целям и задачам исследования. Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнения.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания.

1. Автор использует в работе пакеты программ для молекулярного моделирования и КМ/ММ. Но не приводит при этом, например параметры квантово-химических расчетов и в каком базисе они проводились. Не обсуждается также выбор силовых полей, термостатов, длины траекторий и др. В качестве выбора температуры указана «температура человеческого тела». Эта величина, как известно, варьируется на несколько градусов.
2. На рисунках, где цветом определяется величина энергии состояний (рис. 22, 25, 27) не указана цветовая шкала значений энергии, что затрудняет их анализ.

Вышеизложенные соображения имеют частный характер, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту диссертации, и не снижают ее общую положительную оценку.

Результаты работы представлены научному сообществу на шести международных и российских конференциях; основные положения и выводы опубликованы в пяти статьях в журналах, рекомендованных ВАК РФ. В виде публикаций и докладов представлены все

результаты диссертации. Содержание диссертационной работы в полной мере соответствует специальности 03.01.03. – молекулярная биология. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертационной работы, полно и адекватно отражает результаты выполненного исследования.

Диссертационная работа Степановой А.В. имеет четко выраженный фундаментальный характер и вносит существенный вклад в разработку новых методов поиска белков с улучшенными свойствами, в частности для разработки эффективных биокатализаторов деградации фосфорорганических токсинов.

Диссертация А.В. Степановой «Направленное изменение функциональных свойств антител, полученных из комбинаторных библиотек генов иммуноглобулинов» по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов является законченной работой высокого теоретического и экспериментального уровня. Диссертационная работа А.В. Степановой полностью соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03. – молекулярная биология.

Доктор физико-математических наук,
профессор кафедры биоинженерии Биологического
факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

К.В. Шайтан

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
Москва 119991, Ленинские горы дом 1.
Адрес электронной почты: shaytan49@yandex.ru

Подпись руки К.В. Шайтана заверяю:

Декан биологического факультета МГУ,
академик

«22» февраля 2017 г

