

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 энзимологии, а именно разработке новых методов поиска биокатализаторов с улучшенными функциональными свойствами, в частности, созданию эффективных антител-антидотов, метаболизирующих фосфорорганические токсины.

В своей работе автор использует целый набор современных методов молекулярной биологии, энзимологии и биоинформатики. Сочетание этих методов позволило получить новые фундаментальные знания о природе механизма взаимодействия каталитического антитела A17 с фосфорорганическим пестицидом параоксон. Очевидно и возможное прикладное применение результатов работы в направлении создания эффективных и безопасных антидотов против отравления фосфорорганическими пестицидами.

Работа А.В. Степановой изложена на 111 страницах и построена по традиционному принципу: содержит список сокращений, введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, насчитывающий 124 наименования. Работа проиллюстрирована 37 рисунками, включает в себя 7 таблиц.

Обзор литературы суммирует последние данные, посвященные современным методам и подходам направленной модификации биокатализаторов и антител. Он состоит из трех частей: первая из них посвящена направленной эволюции ферментов, вторая – методам рационального дизайна, как средству улучшения каталитической эффективности и третья – получению антител, нейтрализующих фосфорорганические токсины. Обзор написан хорошим языком, помогает читателю оценить сложности, стоявшие перед диссертантом при выполнении диссертационной работы, и читается с большим интересом, несмотря на имеющиеся опечатки и стилистические неточности.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробное описание методологической части проведенных исследований. Хорошо описаны биоинформатические методы, представлены все необходимые программные ресурсы, критерии и процедуры проведения расчетов. Представлены генно-инженерные и микробиологические методы работы с культурами клеток *E.coli* и дрожжей *Pichia Pastoris*. Подробно описаны процедуры

кинетических исследований. Отдельно представлены методы получения белковых препаратов для кристаллизации, и последующего рентгено-структурного анализа.

Экспериментальная часть работы, представленная в разделе «Результаты и обсуждения», состоит из четырех разделов. В первом разделе проводится детализация механизма реакции антитела A17 с параоксоном. На данном этапе исследований устанавливаются ключевые этапы процесса образования ковалентного интермедиата. Установлено, что реакция проходит по S_N2 -механизму и ключевым этапом в реакции является перенос протона от нуклеофильного тирозина на фосфорильный атом кислорода.

В следующем разделе представлена методология создания виртуальной библиотеки для скрининга *in silico*. Проведен поиск стартового положения субстрата в активном центре антитела, на основании которого были определены позиции аминокислотных остатков для мутагенеза. С помощью разработанного алгоритма были получены 9 вариантов для последующей экспериментальной проверки, из которых вариант L-S35R обладал наилучшими характеристиками по скорости и вероятности образования переходного состояния, а также наименьшему коэффициенту диффузии. Для всех отобранных вариантов были получены генетические конструкции для дрожжевой экспрессии в виде Fab-фрагментов. После наработки, выделения и очистки этих Fab-фрагментов были проведены исследования кинетических характеристик мутантов в режимах стационарной и пред-стационарной кинетики. Было установлено, что антитело L-S35R обладает увеличением бимолекулярной константы скорости реакции взаимодействия с параоксоном в 170 раз по сравнению с исходным антителом A17. Для подтверждения полученных результатов был проведен кристаллографический анализ структур антитела L-S35R в интактном и модифицированном параоксоном состояниях. Полученные результаты явились основой для публикации в журнале Science Advances.

Таким образом, в данной диссертационной работе был предложен алгоритм предсказания мутантных форм антител заданной специфичности, позволяющий определить позицию и тип аминокислотного остатка для проведения мутагенеза.

В ходе изучения работы Степановой А.В. возникли замечания. Из представленных результатов следует, что расчетные мутанты потеряли способность осуществлять полный каталитический цикл. Не вполне ясно, являлось ли это запрограммированным событием? Связано ли это с алгоритмом расчета и можно ли предсказывать мутанты с полным каталитическим циклом? В работе, на мой взгляд, недостаточно внимания уделено обсуждению проблемы универсальности предложенного метода и в каких случаях его можно использовать для «улучшения» структуры антител и, возможно, ферментов. Известно, что многие ферменты, гидролизующие фосфаты, являются металл-зависимыми,

и ключевую роль в катализе играет именно ион металла. Есть ли примеры ферментов в природе, которые имеют механизм взаимодействия с фосфорорганическим субстратом аналогичный с описанными в диссертации антителами? Отмечу также некоторые недостатки в оформлении диссертации: нежелательные интервалы между словами и знаками препинания, интервалы между буквами в словах, необязательное разбивание таблиц на 2 страницы, разбивание подписи к рисунку на 2 страницы.

В заключение следует отметить, что, несмотря на представленные замечания, работа А.В. Степановой представляет собой интересное научное исследование, выполненное самыми современными методами и, безусловно, вносящее существенный вклад в дальнейшее развитие методов эволюции биокаталитической активности. Полученные результаты являются убедительными, а сделанные выводы не вызывают сомнений. Автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации.

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.

Заведующий лабораторией молекулярных биотехнологий
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии гена Российской академии наук,
доктор биологических наук



С.В. Тиллиб

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН),
Почтовый адрес: ул. Вавилова, д. 34/5, 119334, Москва, Россия
Телефон: (499)135-22-01. Адрес электронной почты: tillib@genebiology.ru

Подпись руки С.В. Тиллиба заверяю
Ученый секретарь ИБГ РАН, к.б.н.
«21» февраля 2017 г



Мансурова Г.В.