

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Степановой Анастасии Валерьевны «НАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ АНТИТЕЛ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КОМБИНАТОРНЫХ БИБЛИОТЕК ГЕНОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ»

**на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.03 – молекулярная биология**

Диссертационная работа А.В. Степановой посвящена разработке и апробации алгоритма предсказания аминокислотных замен, необходимых для получения каталитических антител заданной специфичности. Актуальность работы связана с тем, что антитела, вследствие присущей им вариабельности, являются хорошим материалом для создания биокатализаторов для реакций, не имеющих природных катализаторов. В связи с этим разработка гибридных методов направленного отбора на заданное свойство, сочетающих компьютерный анализ и селекцию *in vitro*, является крайне важной и значимой задачей как с теоретической, так и с практической точки зрения.

Основные научные результаты диссертации опубликованы в отечественных и зарубежных журналах, докладывались на российских и международных конференциях.

В работе Степановой А.В. поставлено несколько глобальных задач: подробное изучение механизма реакции гидролиза фосфорорганического пестицида параоксон каталитическим антителом A17 методами КМ/ММ, идентификация аминокислотных остатков, важных для протекания реакции и определение их роли в механизме реакции, проведение мутагенеза выбранных остатков и изучение каталитических характеристик полученных мутантов, а также выявление особенностей каталитического механизма мутантных абзимов. В первой части автореферата описано создание виртуальной библиотеки мутантных антител для *in silico* скрининга: приведены условия, которым должна удовлетворять библиотека, и, чтобы скрининг стал возможным, автором наложены обоснованные ограничения на свойства заменяющих аминокислотных остатков для уменьшения представительности библиотеки. Изучив абзимы с выбранными заменами с помощью алгоритма ММ Монте-Карло, автору удалось сократить размер библиотеки до 375 мутантов, которые были подвергнуты моделированию КМ/ММ с целью идентификации замен, приводящих к максимальному ускорению образования переходного состояния. Для выбранных 9 мутантов с помощью расчетов на суперкомпьютерах методами молекулярной динамики изучен путь реакции и эффективность позиционирования параоксона в реакционном центре. На основании полученных данных сделан вывод о том, что наиболее эффективно связывать параоксон

должно антитело с заменой L-S35R. Во второй части работы осуществлено экспериментальное подтверждение расчетных данных: выполнен сайт-направленный мутагенез антитела A17 и проведен функциональный анализ полученных мутантов. Обнаружено, что экспериментальные данные хорошо согласуются с теоретически рассчитанными, и антитело с заменой L-S35R показывает 170-кратное увеличение эффективности взаимодействия с параоксоном, по сравнению с исходным антителом A17. Ковалентная модификация остатка тирозина активного центра подтверждена данными МАЛДИ масс-спектрометрии. Изучение предстационарной кинетики взаимодействия антитела A17 и его мутантов (L-S35R и L-S35H) с параоксоном позволило детализировать механизм катализа и доказать, что реализуется механизм индуцированного соответствия. В заключительной части работы получены и проанализированы данные рентгеноструктурного анализа мутантного антитела с заменой L-S35R и его комплекса с параоксоном. Результаты подтверждают образование ковалентного аддукта параоксона с тирозином реакционного центра, а также подтверждено, что введение аргинина в 35 положение легкой цепи улучшает позиционирование параоксона в каталитическом центре и усиливает электрофильность атома фосфора за счет образования водородной связи между гуанидо-группой аргинина и фосфорильным атомом кислорода параоксона. В результате проделанной работы делается обоснованный вывод, что предложенный алгоритм предсказания мутантных форм антител позволяет определить позицию и тип аминокислотного остатка для проведения мутагенеза.

В изложении материала в автореферате имеется ряд мелких недочетов и погрешностей. Так, например:

1. На странице 10 указано, что стояла задача по «перепрограммированию реакционного механизма», что противоречит первому из условий, которым должна удовлетворять библиотека мутантов: механизм реакции должен остаться без изменений.

2. На странице 12 указано, что в результате виртуального скрининга было отобрано 9 мутантов, в то время как в таблице 1 их только восемь.

3. В тексте автореферата есть неисправленные опечатки и стилистические погрешности.

Однако указанные неточности ни в коей мере не умаляют ценность представленной работы. Работа в целом производит очень хорошее впечатление, и проведенное исследование выполнено на высоком экспериментальном уровне, что свидетельствует о свободном владении диссертантом современными методами аналитической биохимии и молекулярной биологии.

Материал, изложенный в автореферате, по своему объему и значимости соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Степанова Анастасия Валерьевна, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Зам. заведующего кафедрой
химии природных соединений
Химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова,
кандидат химических наук, доцент

119234, Россия, Москва, Ленинские Горы д.1., стр.3
Тел 84959395529, email: anbach@genebee.msu.ru

Бачева

/А.В. Бачева/

