

О Т З Ы В

**официального оппонента доктора биологических наук Тиллиба С.В.
на диссертационную работу Ломакина Якова Анатольевича
«Структурно-функциональный анализ моноклональных антител, кроссреактивных
к вирусным антигенам, при рассеянном склерозе»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.03 –«молекулярная биология».**

Тема диссертационной работы Ломакина Якова Анатольевича «Структурно-функциональный анализ моноклональных антител, кроссреактивных к вирусным антигенам, при рассеянном склерозе» является очень актуальной и востребованной для современной биологии и медицины. Представленная работа посвящена структурно-функциональным исследованиям моноклональных аутоантител, выявляющихся в организме больных рассеянным склерозом. Рассеянный склероз (РС) – хроническое аутоиммунное заболевание, которое является весьма распространенным (в мире – более 2,5 млн., в России – более 200 тыс. пациентов) и весьма дорогостоящим в плане лечения. На сегодняшний день не существует способа полного излечения от РС. Патогенез заболевания обусловлен разрушением миелиновой оболочки нервных волокон, образованием (в результате замены нервной ткани на соединительную) очагов склероза, рассеянных по всей центральной нервной системе (ЦНС). При этом наблюдается активация клеток иммунной системы, увеличение их количества в ЦНС, а также образование патологических аутореактивных антител, участвующих в демиелинизации нервного волокна. Несмотря на многочисленные проводимые исследования и множество полученных данных и выдвинутых гипотез, молекулярный механизм развития РС остается слабо изученным. В частности, недостаточно полно изучены причины и особенности возникающих аутоиммунных антител. Данная работа была выполнена в коллективе, известном своими пионерскими исследованиями в области структуры и функции антител. Не удивительно, что, используя имеющийся в лаборатории опыт и экспериментальные заделы, автору удалось весьма эффективно провести исследования возникающих при РС аутоиммунных антител и получить новые важные результаты. Так, используя ранее созданную в лаборатории комбинаторную библиотеку одноцепочечных рекомбинантных антител на основе иммуноглобулиновых РНК из лимфоцитов периферической крови 8 доноров – больных рассеянным склерозом, автору методом фагового дисплея удалось отобрать клоны антител, специфически связывающихся с

основным белком миелина (ОБМ). [Позднее были также отобраны однодоменные антитела, связывающиеся с миелин-олигодендроцитарным гликопротеином (МОГ) и с мембранным белком LMP1 вируса Эпштейна-Барра.] Физико-химические свойства полученных одноцепочечных антител и соответствующих им полноразмерных моноклональных антител были проанализированы. Одним из наиболее важных результатов работы явилась демонстрация *in vitro* кроссреактивности полученного моноклонального аутореактивного антитела по отношению к аутоантигену миелиновой оболочки (ОБМ) и к антигену вирусной инфекции, мембранному белку LMP1 вируса Эпштейна-Барра. Эти и другие полученные данные относительно кросс- и полиреактивности отобранных антител являются весомым аргументом в пользу гипотезы о непосредственном участии вирусов (возможно, и иных патогенов) в индукции РС путем механизма «молекулярной мимикрии». Согласно этому механизму, антитело-секретирующие клетки, активированные еще на периферии в лимфатических узлах (в ответ на вирусную инфекцию), могут мигрировать через поврежденный гемато-энцефалический барьер. Таким образом, первичные антитела к вирусным антигенам, обладающие соответствующей кроссреактивностью, могут начать взаимодействовать с собственными кроссреактивными аутоантигенами в ЦНС, вызывая локальные воспаления и способствуя развитию заболевания.

В работе также получен большой массив новых данных об особенностях и возможном происхождении аутореактивных антител с помощью использования новых высокопродуктивных технологий (одновременное исследование множественных взаимодействий белков с помощью технологии Luminex, широкомасштабное секвенирование с помощью прибора Illumina MiSeq последовательностей тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов из полученных библиотек).

Работа построена по традиционному плану и состоит из оглавления, списка сокращений, раздела «актуальность проблемы» в качестве введения, обзора литературы, экспериментальной части, описания материалов и методов, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 119 страницах машинописного текста, включает 33 рисунка, 8 таблиц, и список литературы, включающий 224 наименования.

Во введении довольно четко и сжато изложены основные направления иммунологических исследований, связанных с РС, и указана логически связанная основная цель данной работы. Эта цель: выявление и анализ структур антител к аутоантигенам при РС, которыми являются белки миелиновой оболочки, и в первую очередь, основной белок миелина.

Литературный обзор изложен на 37 страницах, хорошо проиллюстрирован, вполне отражает современное положение дел в данной области науки, изложен логично и последовательно. В частности, в нем даны современные представления о рассеянном склерозе, о роли Т- и В-клеток иммунной системы в развитии и патологии РС, о проблеме кроссреактивности антител. Особое внимание уделено литературным данным о влиянии различных типов вирусов на развитие РС. Меньшая часть обзора посвящена описанию работы с комбинаторными фаговыми библиотеками антиген-узнающих фрагментов антител человека. В качестве небольших замечаний укажу на некоторые систематические грамматические ошибки, такие, как написание «так же» всегда раздельно, частое отсутствие выделения вводных слов запятой, относительно редко встречающиеся несогласования и неудачные словосочетания, например, на стр. 16 и 28 « у больных ... по сравнению со здоровыми контролями»... Отмечу неточность формулировки на странице 18, где написано следующее. «Существуют данные, что некоторые виды (верблюды и усатые акулы) не имеют легких цепей в принципе и используют только тяжелую цепь для узнавания антигена». Правильнее было бы уточнить, что у этих видов наряду с антителами традиционной структуры также присутствуют и особые антитела, состоящие из димера укороченной цепи иммуноглобулина при полном отсутствии легких цепей.

Раздел «Экспериментальная часть» идет сразу после обзора литературы и представляет собой описание полученных результатов. В конце этого раздела имеется короткий подраздел «Заключение», после которого помещен раздел «Материалы и методы». На мой взгляд, стоило бы дополнить работу еще одним разделом «Обсуждение результатов», где несколько подробнее остановиться на сути полученных результатов и потенциально возможном их практическом использовании для создания улучшенных методов диагностики и направленной терапии РС. Экспериментальная часть состоит из 7 разделов, в которых весьма обстоятельно описана проделанная работа, представлены и проанализированы полученные результаты. Несмотря на высокую оценку работы в целом, отмечу ряд замечаний к этой объединенной экспериментальной части работы.

В работе нет данных об использованных антигенах, в частности, основного белка миелина. Полноразмерный ли белок, какого он происхождения? На стр. 96-97 описана процедура выделения и очистки рекомбинантных бактериальных белков. Дана ссылка на получение рекомбинантного внеклеточного домена миелин-олигодендроцитарного гликопротеина и сказано, что «остальные белки... выделяли как тельца включения». Здесь было бы уместнее дать перечисление этих «остальных белков» или их доменов с ссылками на то, как их получали, с указанием аминокислот и номера соответствующей последовательности в базах данных.

На рисунке 11 (стр. 46), где показан рестриктивный анализ девятнадцати случайных индивидуальных проклонированных антиген-связывающих последовательностей из полученной библиотеки, представлена фотография низкого качества. При этом упомянуты данные анализа этой библиотеки методом широкомасштабного секвенирования, которые не оставляют сомнений в высоком качестве используемой библиотеки. Хорошо было бы представить в этом месте какие-то подтверждения этого секвенирования (хотя подобные данные приводятся в последующих разделах работы).

На странице 49 при определении общего количества фаговых частиц методом «сэндвич-ИФА» следует указать, что для сорбции фаговых частиц и для их детекции использовали антитела к разным белкам вирусной оболочки.

Суммарный рисунок 13 (стр.50) сложен для понимания. На мой взгляд, лучше было бы разбить его на две последовательные части и представить в более традиционном виде сигнал/концентрация с доверительными интервалами (как результат воспроизведения/повторения ИФА). Трудно судить о достоверности без указания повторности экспериментов и без соответствующих контролей.

На рис. 14А не указаны концентрации использованных антител. Здесь было бы желательно сделать опыт с разными разведениями антител.

Слишком сжато описаны результаты, представленные на рис. 14Б.

Вообще, хотелось бы видеть более подробные подписи к рисункам. Например, на рис. 17 (стр. 59) представлено много данных, но их интерпретация затруднительна из-за весьма схематичных подписей и отсутствия более обстоятельного разъяснения в тексте.

Приходится с трудом угадывать, что именно было сделано. На рис.17 есть подрисунки А, Б, В, Г и Е (почему-то пропущено Д), а в подписи нет ничего о подрисунке Е. В подрисунке Г показаны данные иммунопреципитации, но ни в тексте, ни в материалах и методах нет описания деталей этой процедуры иммунопреципитации.

На рис. 18 (стр. 62) представлены данные о кросс-реактивности полученных комбинированных антител. Вызывает вопрос, почему в данном случае не детектируется взаимодействие E2-e2 антител с LMP1, что было продемонстрировано в предыдущих опытах. Связано ли такое различие с особенностями технологии Luminex?

При описании методических процедур автор, порой, использует слишком много сленга и необязательных англицизмов. Например, на стр. 104: «супернатант декантировали», «криовиал с клетками размораживали».

Все приведенные выше мелкие замечания не снижают общую высокую оценку этой очень востребованной, интересной и весьма перспективной работы. Результаты диссертации были опубликованы в 3 статьях в известных журналах и были представлены

на пяти российских и международных конференциях. Содержание автореферата отражает основные результаты и выводы диссертации. Выводы сформулированы корректно и отражают основные результаты работы.

По актуальности, новизне, практической ценности результатов, объему, методическому уровню проведенных исследований работа Ломакина Якова Анатольевича полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно п.9 “Положения о присуждении ученых степеней”, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а сам автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

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

Сергей Владимирович Тиллиб

Рабочий адрес:

119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

Тел.: (499)135-2201

Эл. почта: tillib@genebiology.ru

12 мая 2014 г.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ	
Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)	
Подпись лица	<i>С.В. Тиллиба</i>
заверяю	
Ученый секретарь	
Института	<i>Г.В. Мансурова</i>

