



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

СТЕНОГРАММА

**заседания диссертационного совета Д 002.019.01
при ИБХ РАН**

28 мая 2014 года

Защита диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук **Ломакина Якова Анатольевича**
на тему:

**«Структурно-функциональный анализ моноклональных
антител, кроссреактивных к вирусным антигенам, при
рассеянном склерозе»**

по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Москва – 2014

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 28 мая 2014 года.

Зам. председателя диссертационного совета
член-корр. РАН

В.М. Липкин

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

На заседании Совета из 30 членов присутствует 23 человека, из них докторов по профилю диссертации – 6:

1. Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
2. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
3. Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
4. Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(03.01.06)
5. Академик РАН	Богданов Алексей Алексеевич	(03.01.03)
6. Член-корр. РАН	Габиров Александр Габирович	(03.01.06)
7. Член-корр. РАН	Деев Сергей Михайлович	(03.01.03)
8. Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(02.00.10)
9. Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
10. Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
11. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
12. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
13. Академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
14. Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
15. Д.х.н.	Молотковский Юлиан Георгиевич	(02.00.10)
16. Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
17. Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
18. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
19. Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
20. Д.х.н.	Формановский Андрей Альфредович	(02.00.10)
21. Член-корр. РАН	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
22. Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
23. Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)

Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Приступаем ко второму пункту нашей повестки дня. Речь идет о защите Ломакиным Яковом Анатольевичем диссертации по теме «структурно-функциональный анализ моноклональных антител, кроссреактивных к вирусным антигенам, при рассеянном склерозе» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «молекулярная биология». Владимир Александрович нам расскажет о материалах личного дела.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н. Олейников В.А.:

(Зачитывает документы, содержащиеся в личном деле соискателя. Отмечает, что материалы личного дела и документы предварительной экспертизы соответствуют требованиям Положения ВАК).

Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Спасибо. Слово диссертанту. Яков Анатольевич, 20 минут.

Ломакин Я.А.

(Излагает основные положения диссертационной работы.)

Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Спасибо. У кого есть вопросы? Пожалуйста.

Д.б.н. Шпаковский Г.В.

Не могли бы Вы охарактеризовать, что собой представляют гены зародышевой линии отобранных антител?

Ломакин Я.А.

Все гены зародышевой линии, к которым принадлежат отобранные нами антитела присутствуют в норме и у здоровых людей. На сегодняшний день нет данных, что какие-то определенные гены зародышевой линии преобладают у больных рассеянным склерозом или у здоровых людей. Хотя по некоторым одиночным данным есть сведения, что некоторые в том числе и из нами найденных генов зародышевой линии могут чаще встречаться у больных по сравнению со здоровыми людьми, но пока эти данные недостаточно масштабные и требуют дополнительного подтверждения.

Д.х.н., академик Богданов А.А.

Какое значение у Ваших результатов? Как их можно будет в дальнейшем использовать для выработки новой стратегии создания лекарственных средств при рассеянном склерозе?

Ломакин Я.А.

Как я уже говорил, структура патологических антител при рассеянном

склерозе на сегодняшний день изучена довольно плохо. А если знать структуру конкретных антител, участвующих в разрушении миелиновой оболочки, в дальнейшем можно будет создать специальные лиганды, связывающие именно эти антитела, и таким образом целенаправленно элиминировать именно патогенные антитела и В-клетки. Так же знания нуклеотидной и аминокислотной последовательности патогенных антител можно использовать в диагностике рассеянного склероза, например, по уровню экспрессии различных генов зародышевой линии у определенного круга лиц. Например, если у лиц, переболевших инфекционным мононуклеозом, у которых повышен риск развития рассеянного склероза, или у близких родственников больного рассеянным склерозом, у которых также повышен риск развития заболевания, наблюдается дополнительно и повышенный уровень экспрессии определенных генов зародышевой линии, значит существует ещё более повышенный риск развития рассеянного склероза.

К.б.н. Чудаков Д.М.

В данных, полученных с использованием технологии Luminex не обнаруживается связывание Imp1 моноклональным антителом E2, почему?

Ломакин Я.А.

Да, действительно с использованием технологии Luminex связывание с Imp1 детектировать не удалось. Это можно объяснить возможным изменением структуры антигена Imp1 при иммобилизации за карбоксильные группы на поверхности полистирольной микросферы. Из данного эксперимента видно, что связывание с Imp1 не детектируется ни для одной из исследуемых комбинаций, но мы дополнительно наряду с детекцией связывания Imp1 методом вестерн-блоттинга, провели прокариотическую экспрессию Imp1 в *E.coli* и при этом для ряда комбинаций удалось детектировать связывание с Imp1 методом ИФА. Таким образом, связывание Imp1 подтверждается несколькими независимыми экспериментами и отсутствие детекции с использованием технологии Luminex возможно объясняется нарушением структуры эпитопа связывания при ковалентной иммобилизации на микросферах.

К.б.н. Чудаков Д.М.

Было показано, что для лечения некоторых форм рассеянного склероза существуют лекарственные препараты, уничтожающие В-клетки, но при этом не затрагивающие плазматические клетки. В этом плане мне импонирует слайд, где обсуждалась роль В-клеток, кроме антитело-продуцирующей, антиген-презентирующая способность, а так же продукция интерлейкинов. Можете сказать Ваше мнение на этот счет?

Ломакин Я.А.

Действительно, если 10-20 лет назад считалось, что основная характеристика В-клеток – это способность к продукции иммуноглобулинов, то сейчас

показано, что они способны продуцировать провоспалительные интерлейкины, такие как ИЛ-6. А некоторые популяции В-клеток (не все, но некоторая их часть) способна к продукции и противовоспалительных интерлейкинов, например ИЛ-10. Таким образом, можно достоверно сказать, что участие В-клеток в развитие воспалительного ответа не сводится только к продукции антител. И исходя из всех этих фактов неудивительно, что элиминация патогенных В-клеток уменьшает развитие воспалительного ответа и развитие заболевания.

К.б.н. Чудаков Д.М.

Т.е. Вы не исключаете вовлечение специфического В-клеточного рецептора в формировании комплекса с антигеном при развитии заболевания.

Ломакин Я.А.

Да, конечно, не исключаю.

К.х.н. Василевский А.А.

Расскажите, существуют ли другие примеры такой кроссреактивности, когда антитела на какие-то патогены потом вызывают заболевания?

Ломакин Я.А.

На данный момент все-таки существует больше работ и данных по кроссреактивности у Т-клеток. Если рассматривать в частности рассеянный склероз, то известен ряд структур Т-клеточных рецепторов и МНС, которые способны образовывать комплекс с белками патогенов (например, вируса Эпштейна-Барр) и аутоантигенов (например, основного белка миелина) одновременно. Но с антителами пока кроссреактивность показывается в основном на поликлональных сыворотках, т.е. показывается, что у больных рассеянным склерозом наряду с повышенным титром антител к аутоантигенам миелиновой оболочки наблюдается повышенный титр антител к тем или иным белкам вирусной или бактериальной природы. Конкретного варианта кроссреактивного антитела, которое достоверно вызывает развитие заболевания на сегодняшний день неизвестно.

Д.х.н., проф. Дзантиев Б.Б.

У меня вопрос по сравнению констант диссоциации, померенных на приборе Вiasoge. На сколько отличается кинетика связывания одноцепочечных антител и их вариантов полноразмерных иммуноглобулинов?

Ломакин Я.А.

Кинетика связывания одноцепочечных и полноразмерных антител для некоторых моноклонов отличается достаточно сильно. Это можно объяснить возможным неправильным фолдингом одноцепочечных антител, поэтому для дальнейшего анализа мы и использовали полноразмерные антитела. Данные с одноцепочечными антителами являются предварительными и прикидочными. Более достоверными и надежными являются данные с полноразмерными

антителами.

Д.х.н., проф. Дзантиев Б.Б.

Мне показалось, что константы одноцепочечных и полноразмерных вариантов практически равны, это так?

Ломакин Я.А.

Для комбинаций, у которых наблюдается связывание, действительно константы имеют наномолярный порядок, но разница все равно ощутима, например для клона E2-E2 константа диссоциации у полноразмерного и одноцепочечного антитела отличается на пол-порядка ($8,8 \cdot 10^{-8}$ и $2 \cdot 10^{-9}$ соответственно).

Д.х.н., проф. Дзантиев Б.Б.

Спасибо, просто подобных данных немного и они являются очень интересными. Казалось бы, что полноразмерное антитело должно обладать лучшим связыванием....

Ломакин Я.А.

Из-за неправильного фолдинга одноцепочечное антитело может в какой-то мере неспецифически взаимодействовать с антигеном, что и увеличивает его кажущуюся константу аффинности.

Д.ф.-м.н., проф. Ефремов Р.Г.

Скажите, пожалуйста, на сколько по своей структуре близки детерминанты связывания в основном белке миелина и в вирусном белке. По физико-химическим свойствам, по структуре, по динамическим свойствам? Насколько специфично это связывание? Нет ли других конкурентов, которые могли бы связываться с теми же антителами?

Ломакин Я.А.

Если я понял правильно, то вопрос заключается в следующем – на сколько похожи между собой Ipr1 и основной белок миелина?

Д.ф.-м.н., проф. Ефремов Р.Г.

Да.

Ломакин Я.А.

По аминокислотной последовательности у них не было выявлено какой-то значимой схожести, потенциальные общие эпитопы содержали не более 2-3 одинаковых аминокислот. Физико-химические характеристики мы не считали. Структура неизвестна ни для основного белка миелина, ни для Ipr1. Мы предполагаем, что так как аминокислотная гомология отсутствует, кроссреактивность обусловлена скорее всего конформационной структурой, но конкретные эпитопы нам не известны на сегодняшний день.

Д.ф.-м.н., проф. Ефремов Р.Г.

Поясните, пожалуйста, как Вы делали кластеризацию на слайде с константами диссоциации. Что будет, если просто взять набор точек и сделать кластеризацию по какому-нибудь другому признаку? Например E2-V5 и F11-E2 в один кластер.

Ломакин Я.А.

Мы старались кластеризовать по общему параметру. Т.е. в один кластер группировались антитела с одинаковой тяжелой цепью или с одинаковой легкой цепью. Так, конечно, у каких-то антител могут совпадать, как константы диссоциации, так и константу ассоциации – ничего удивительного в этом нет. Но мы хотели выявить какую-нибудь закономерность во вкладе цепей на аффинные характеристики антитела.

Д.х.н., проф. Бовин Н.В.

Можно уточнить, что Вы вкладываете в термин полиспецифичность? Это для Вас более качественная характеристика или более количественная? Иными словами, если мы дадим некоторую отсечку в константе аффинности, то, например, антитело связывается с основным антигеном с хорошей константой, а с «побочными» антигенами условно на порядок слабее – это тогда будет полиспецифичное антитело, или нет? Где граница между полиспецифичностью и слабой аффинностью?

Ломакин Я.А.

Да, действительно, мы заметили, что у полиспецифичных антител константа аффинности падает. Это мы наблюдали и на Viacore. Вообще, по литературным данным по большому счету почти все антитела полиреактивны, у них есть какой-то антиген, который они связывают с наибольшей аффинностью, а остальные антигены с меньшей. Т.е. почти всегда можно найти антигены, которые или гомологично похожи или структурно и, таким образом, истинных моноспецифических антител в природе практически не существует. Отсечку по константе аффинности для полиреактивных антител мы в представленных экспериментах не делали. Хотя в литературе есть работы, которые показывают, какая необходима аффинность к антигенам, чтобы произошла активация В-клеток, эта аффинность должна быть не меньше 10^6 М, правда эти работы немногочисленны, даже единичны и требуют подтверждения.

Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Ещё вопросы? Двигаемся дальше. Переходим к заслушиванию отзывов. Отзыв ведущей организации.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Ведущая организация – это Институт молекулярной биологии РАН. Отзыв положительный.

(Зачитывает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается.)

В отзыве содержатся следующие замечания:

Данные, представленные на рисунке 12Б, находятся в некотором противоречии с заявленной стратегией "разрушения сетки положительных зарядов" (добиться максимального снижения фонового связывания при максимально возможном сохранении специфического взаимодействия): очевидно, что в точке 4 отношение сигнал/шум - существенно лучше, чем в точке 5, которая была использована при скрининге. Интересно, какие результаты дал бы биопэннинг на этом препарате. Из рисунка 15 совершенно неочевидно, где находится гидрофобный желобок молекулы одноцепочечного антитела B5V6, о котором идет речь в тексте. Кроме того, в целом методика моделирования пространственной структуры антител путем подгонки аминокислотной последовательности к известной структуре другого антитела является весьма ненадежной. В данных, представленных на рис.18, привлекает внимание комбинаторное антитело F11-e2, которое практически не реагирует ни с ОБМ, ни с одним из ОБМ пептидов, и вообще мало отличается от контрольных нерелевантных антител. Между тем это - комбинация из тяжелой и легкой цепей двух лучших антител, которые прекрасно связываются с ОБМ как сами по себе (F11-f11 и E2-e2), так и в обратном комбинаторном варианте E2-f11. Более того, антитело F11-e2 демонстрирует если не рекордные, то вполне измеримые константы связывания с ОБМ при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса (рис. 21 и табл. 5). На это несоответствие следовало обратить внимание и обсудить его возможные объяснения. На рис. 29, на котором представлены результаты по сравнительной встречаемости различных CDR3 легких цепей в обогащенных библиотеках, подозрительно выглядит клон e12, встречаемость CDR3 последовательности которого во всех библиотеках, в том числе и в исходной, на 1-2 порядка превышает встречаемость остальных клонов. Либо эта последовательность CDR3 необычно часто встречается в легких цепях антител у больных РС (что можно проверить глубоким секвенированием независимо полученной библиотеки), либо имеет место технический артефакт (что в процедуре, включающей ПЦР амплификацию сложной смеси матриц, случается, по не всегда понятным причинам). Координаты этой единственной точки на диаграмме критическим образом влияют на угол наклона регрессионной прямой, поэтому вопрос об их биологической релевантности не является праздным. Сходные соображения применимы и к встречаемости последовательностей CDR3 тяжелых цепей (рис. 28), к распределению длин CDR3 (рис. 30) и суммарного заряда (рис. 32). В какой степени эти наблюдения отражают общие черты, присущие кросс-реактивным аутоантителам при РС, а в какой - технические особенности конкретных библиотек, станет более понятно после нескольких независимых повторов проведенного скрининга. Рис. 31Б, демонстрирующий гистограмму частоты встречаемости IGHV сегментов в разных библиотеках и использующий необработанные данные глубокого секвенирования, неинформативен. Это связано с невозможностью достоверно отличить соматические мутации от ошибок ПЦР без повышения глубины покрытия и

применения специализированных алгоритмов обработки данных. Отмеченная выше чрезмерная лаконичность и недостаточная строгость в описании рисунков характерна не только для обзора литературы, но и для результатов и обсуждения. Например, в подписи к рис. 16 написано, что LMP1-связывающие последовательности отмечены курсивом, однако никакого курсива на рисунке нет. Ни в подписи к рис. 19, ни где-либо в работе нет внятных пояснений, что представляет собой лизат Нер-2. При описании рис. 23 весьма невнятно описан алгоритм (сам по себе, по-видимому, вполне разумный) биоинформатического анализа частоты соматических мутаций.

Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Яков Анатольевич, пожалуйста, отвечайте.

Ломакин Я.А.

По поводу грамматических ошибок – согласен. В будущем постараюсь учесть и исправиться. По поводу выбора степени гидролиза основного белка миелина – нашей целью было максимальное уменьшения неспецифического связывания с сохранением специфического. Из рисунка видно, что в точке 5 специфическое связывание основного белка миелина поликлональной сывороткой ещё сохраняется и даже можно предположить, что его падение обусловлено как раз уменьшением неспецифического связывания. К тому же в процессе биопэннинга возможно получить и малоаффинные антитела, если мы каким-то образом повредили при гидролизе эпитоп связывания. Так же из рисунка видно, что неспецифическое связывание в точке «5» уменьшено более чем в 2 раза, а в точке «4» менее, чем на 30%. Так же, чтобы не потерять какие-нибудь ОБМ-связывающие антитела кроме обогащения библиотеки на частично гидролизованный антиген основного белка миелина мы использовали и другие подходы с интактной молекулой ОБМ – добавляли гепарин и повышали ионную силу раствора при биопэннинге. Таким образом, можно предположить, что репертуар отобранных антител в итоге не должен значительно сократиться. По поводу второго вопроса – несоответствие результатов полученных с помощью технологии Lumipex и Viacore. Это вопрос уже был задан ранее, действительно, иммобилизация при Lumipex происходит за amino-группы на поверхности полистирольной микросферы, а при Viacore – за amino-группы на поверхности декстранного чипа. Таким образом, возможно предположить, что различная иммобилизация открывает разный доступ к эпитопам антигена для исследуемых антител. И конкретно для клона F11-E2 при иммобилизации на полистирольные микросферы доступ к эпитопу ОБМ закрывается. И мы использовали технологию Lumipex для предварительного анализа, данные по Viacore являются более надежными и достоверными. По поводу аномально высокой встречаемости клона e12. Он действительно встречается чаще других и в исходной библиотеке. Но его влияние на угол наклона регрессионной линии является очень незначительным, потому что при построении регрессионной линии учитывался вклад всех точек, где каждая точка имеет одинаковый удельный

вес, независимо от количества прочтений. Количество прочтений этого клона отображается только в координатах этой точки. Таким образом, если здесь встречается более нескольких сотен разных клонов, то один клон, даже и далекаястоящий, не может сильно отклонить угол наклона регрессионной прямой. По поводу зарядов – здесь, встречаемость всех клонов учитывается, но в данном случае мы не делаем вывод, что ситуация в исходной библиотеке отображает реальную ситуацию в организме больного. Мы говорим, что при обогащении на различные антигены изменяется распределение зарядов, таким образом это действительно обусловлено характером антигена, так как картина для всех антигенов наблюдается разная. По поводу рисунка, не представленного в презентации, но приведенного в диссертации – чтобы избавиться от ошибок пцр, мы объединяли в одну группу последовательности отличающиеся между собой на одну нуклеотидную последовательность, чтобы исключить соматические мутации и ошибки пцр. По поводу объяснения эксперимента с Нер-2 лизатом, действительно стоило объяснить подробнее – мы использовали коммерчески доступный препарат, где лизат клеток Нер-2 с дополнительными рекомбинантными белками после электрофоретического разделения был перенесен на нитроцеллюлозную мембрану, и далее мы инкубировали наши антитела с этими нитроцеллюлозными мембранами, и проявляли сигнал методом Вестерн-блоттинга с помощью вторичных антител к человеческим IgG1, конъюгированных с пероксидазой хрена. Вроде ответил на все вопросы ведущей организации.

Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Спасибо. Алексей Анатольевич, можете охарактеризовать диссертанта?

К.х.н. Белогуров А.А.

(даёт характеристику диссертанту, отзыв положительный)

Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Спасибо. Переходим к отзывам официальных оппонентов. Лагарькова Мария Андреевна, пожалуйста.

Д.б.н., проф. Лагарькова М.А.

(Излагает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается.)

В отзыве содержатся следующие замечания:

1) Расположение разделов не совсем традиционное – так, материалы и методы следуют за разделом «результаты», разделяя собой заключение и выводы, что не очень удобно для прочтения. 2) В разделе «обзор литературы» главы «рассеянный склероз» и «этиология рассеянного склероза» разнесены друг от друга на три главы, что представляется не очень логичным. Наверное, эти главы логичнее было расположить друг за другом, а уже потом писать о роли Т и В клеток в РС и о вирусах. 3) Текст обзора литературы и результатов

изобилует аббревиатурами, часть из них – русские, часть – английские. Диссертация, несмотря на то, что изложена логично, трудно читается именно из-за смеси русских и английских терминов. 4) На рис. 19 показано определение аутореактивности антител к ОБМ с помощью Вестерн-блот анализа лизата Нер2. Возможно, следовало бы не просто давать ссылку на статью, где был использован НЕР-2 тест, но и кратко объяснить, в чем он заключается. Сам рисунок, из-за недостаточного размера и разрешения, трудно понять, и объяснений в тексте нет, кроме перечисления белков, которые связываются комбинационными антителами. 5) Рисунки 20 и 21 (иммуноферментный анализ связывания антител с ОБМ и изменение аффинности при варьировании цепей) тоже «слепые», и подписаны более чем лаконично. Если с ИФА как-то можно разобраться, то человек, никогда не проводивший анализ на приборе BIACORE, в рисунке просто не разберется, потому что объяснения в тексте почти отсутствуют.

Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Спасибо большое. Яков Анатольевич, были замечания. Ваши ответы.

Ломакин Я.А.

Спасибо большое, Мария Андреевна, за такой развернутый отзыв и вдумчивое изучение работы. Да, действительно, по поводу англицизмов согласен, в будущем постараюсь исправиться. Так же по поводу структуры диссертации тоже согласен. По поводу литературного обзора – главы «рассеянный склероз» и «этиология рассеянного склероза» можно было объединить или поместить рядом, но я хотел ознакомить сначала читателя с молекулярными механизмами развития рассеянного склероза, чтобы потом, уже опираясь на роль клеток иммунной системы в развитии заболевания, объяснить возможные причины его этиологии. По поводу лаконичности подписи к рисункам я тоже согласен.

Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Мария Андреевна, у Вас есть вопросы ещё?

Д.б.н., проф. Лагарькова М.А.

Нет, спасибо.

Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Второй оппонент доктор биологических наук Тиллиб Сергей Владимирович.

Д.б.н., проф. Тиллиб С.В.

(Излагает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается.)

В отзыве содержатся следующие замечания:

1) Грамматические ошибки. 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. 2) 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. 3) 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-олигодендроглиального 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. 4) 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). 5) 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. 6) Суммарный рисунок 13 (стр.50) сложен для понимания. 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. 7) На рис. 14А не указаны концентрации использованных антител. Здесь было бы желательно сделать опыт с разными разведениями антител. 8) 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. 9) 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? 10) При описании методических процедур автор, порой, использует слишком много сленга и необязательных англицизмов. Например, на стр. 104: «Супернатант декантировали», «криовиал с клетками размораживали».

Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Спасибо. Яков Анатолевич, пожалуйста, ответьте на вопросы.

Ломакин Я.А.

Спасибо, Сергей Владимирович. Да, по поводу фразы про акул подразумевалось, что наряду с обычными антителами, содержащими и тяжелую, и лёгкие цепи, есть антитела, состоящие только из тяжелых цепей. По поводу недостаточного описания белков, используемых в работе: основной белок миелина мы использовали бычий, выделенный с помощью химической экстракции и последующей обращенно-фазовой хроматографии. Мы использовали бычий основной белок миелина, так как этот белок является высококонсервативным и на слайде показана его высокая гомология с человеческим вариантом – они практически идентичны. По поводу описания эксперимента вестерн-блоттинга с lmp1 – мы использовали иммунопреципитацию для детекции связывания с lmp1, потому что выделить и почистить lmp1 в необходимых количествах достаточно трудно. Для этого эксперимента мы иммунопреципитировали рекомбинантные антитела (наше антитело E2 и контрольное антитело) с лизатом клеток, экспрессирующих lmp1 и в качестве отрицательного контроля использовали лизат клеток, неэкспрессирующих lmp1. Далее очищали образовавшиеся комплексы с помощью аффинной смолы proteinA, и почищенные комплексы разделяли электрофоретически и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Связывание детектировали с помощью специфических антител к lmp1. Видно, что для антитела E2 lmp1 находится в элюате, а для контрольного антитела в проскоке. Таким образом, мы доказали связывание антитела E2 с lmp1. По поводу лаконичности рисунков – тоже согласен, следовало сделать подробнее. По поводу не очень хорошего качества рисунка с рестриктивным анализом, действительно его можно было не приводить, так как после первоначального ПДРФ-анализа мы просиквенировали последовательности 100 случайных клонов и там так же наблюдалась уникальность библиотеки.

Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Спасибо. Диссертация открыта для обсуждения. Кто хочет высказаться?

Д.б.н., академик Лукьянов С.А.

Уважаемые коллеги, хочу сказать, что представленная работа мне очень-очень понравилась. Все, что касается аутоиммунных заболеваний мне чрезвычайно интересно. Я знаю, насколько природа этих заболеваний и какие-то фактические гипотезы, протаптывающие тропинки, как все-таки такая болезнь возникает, все эти гипотезы на сегодняшний день очень зыбкие, очень теоретические, и в данной работе проявление очень четкой кроссреактивности между вирусными белками и основным белком миелина даёт надежду, по крайней мере я вижу следующие шаги, которые могут быть предприняты. По-моему работа и выполнена великолепно, и результаты обнадеживает. Я целиком поддерживаю, по-моему, у нас сегодня интересное серьезное заседание. Хочется пожелать, чтобы они и дальше проходили в том же ключе. Спасибо.

Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Спасибо. Может хочет кто-нибудь ещё выступить? Нет, не вижу. Я даю заключительно слово диссертанту для заключительных его благодарностей или комментариев.

Ломакин Я.А.

Прежде всего я хотел поблагодарить своих оппонентов – Сергея Владимировича и Марию Андреевну за внимательное изучение моей диссертации. Так же Купраша Дмитрия Владимировича и ведущую организацию за прочтение моей работы и составление отзыва. Ещё я хотел бы поблагодарить сотрудников лаборатории биокатализа, которые с самого начала помогали мне, и в особенности своего научного руководителя Белогурова Алексея Анатольевича, так же Александра Габибовича Габибова, Наталью Александровну Пономаренко и Марию Юрьевну Захарову, которые помогли мне на многих этапах. Так же я хочу высказать благодарность нашим коллегам из Новосибирска – это Нине Викторовне Тикуновой и Марселю Кабилову –за помощь в широкомасштабном секвенировании, и Александру Фаворову за помощь в анализе результатов широкомасштабного секвенирования. Спасибо всем собравшимся, что позволили ознакомить Вас с результатами моей работы. Спасибо.

Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Спасибо. Теперь, прежде чем перейти к голосованию, я предлагаю обсудить заключение по диссертации. Есть ли у кого какие замечания, предложения?

(Проходит голосование по проекту заключения. Заключение принимается единогласно).

Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Просьба перейти к голосованию.

(проходит голосование и подсчёт голосов)

Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Члены ученого совета, пожалуйста, садитесь.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н. Олейников В.А.:

(оглашает результаты голосования)

Ломакин Яков Анатольевич. Присутствовало на заседании - 23 член совета, роздано бюллетеней – 23, оказалось в урне бюллетеней – 23, «за» - 23, «против» - нет, недействительных – нет.

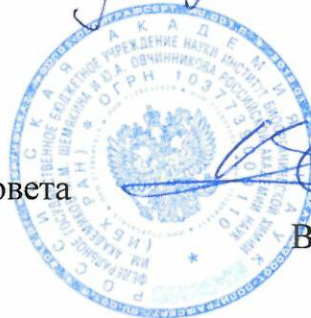
Зам. председателя диссертационного совета член-корр. РАН Липкин В.М.

Спасибо. Я прошу утвердить итоги голосования. Кто «за»? Есть ли воздержавшиеся? (Все «за»). Поздравляю.

Зам. председателя диссертационного совета
Член-корр. РАН

В.М. Липкин

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников