

"Утверждаю"

Зам. директора ИМБ РАН

д.б.н., профессор

В.Л.Карпов

2014 г.



ОТЗЫВ

о диссертационной работе Ломакина Я.А. «Структурно-функциональный анализ моноклональных антител, кроссреактивных к вирусным антигенам, при рассеянном склерозе», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Рассеянный склероз (РС) - это хроническое воспалительное нейродегенеративное заболевание аутоиммунной природы с неизвестной этиологией. Среди причин развития заболевания выделяют генетическую предрасположенность, климатические условия местности, а также вирусные или бактериальные инфекции. Патогенез данного заболевания включает в себя повреждение миелиновой оболочки нервных волокон, что приводит к постепенной утрате ряда функций центральной нервной системы, связанных с физическим и психоэмоциональным состоянием больного. По данным Международной Федерации Рассеянного Склероза (MSIF), количество диагностированных больных с данной патологией в мире увеличилось с 2.1 миллионов в 2008 году до 2.3 миллионов в 2013 году; более 150 тысяч больных - граждане Российской Федерации.

Основную роль в процессе демиелинизации аксонов отводят Т- и В-лимфоцитам, специфичным к компонентам миелиновой оболочки. Список потенциальных аутоантигенов постоянно расширяется и включает в себя различные белки, ассоциированные с мембраной олигодендроцитов. Многочисленные данные указывают на то, что аутоантитела, вырабатываемые на мажорный компонент миелиновой оболочки – основной белок миелина (ОБМ) – являются одним из важных патогенных факторов, влияющих на деградацию нервных волокон в центральной нервной системе при РС. Аутореактивные лимфоциты совместно с макрофагами проникают через гематоэнцефалический барьер и индуцируют процессы воспалительной демиелинизации в ЦНС. При этом В-клетки продуцируют патогенные аутоантитела и являются активными участниками развития патологии, а именно презентуют миелиновые антигены и продуцируют ряд цитокинов. Стоит отметить, что несмотря на длительность и интенсивность изучения данного заболевания, на сегодняшний день не

существует препарата, способного полностью остановить патологические процессы при РС. Таким образом, структурно-функциональные исследования патогенных аутоантител могут оказаться весьма перспективными как с точки зрения понимания механизмов развития заболевания, разработки новых подходов к терапии и диагностики, так и для решения фундаментальных вопросов молекулярной иммунологии. Дальнейшее совершенствование существующих подходов или же разработка новых перспективных методов терапии РС является задачей первостепенной важности. Учитывая вышесказанное, актуальность темы представленной диссертационной работы сомнений не вызывает.

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов. Автор представил обзор литературы, состоящий из двух основных частей. Первая часть посвящена характеристике аутоиммунного заболевания рассеянный склероз, как с молекулярно-биологической, так и клинической точек зрения, с акцентами на вкладе Т- и В-клеток в развитие и патологию рассеянного склероза и на причинах развития заболевания (включая возможное влияние вирусов). Менее объемная вторая часть обзора посвящена технологии комбинаторных фаговых библиотек в применении к изучению репертуара антител человека. К достоинствам обзор следует отнести четкость изложения, лаконичность и хорошие иллюстрации, часть из которых взяты из зарубежных журналов (с указанием источников), при этом все надписи на рисунках переведены на русский язык. К сожалению, лаконичность местами идет во вред полноте изложения: не все элементы, присутствующие на иллюстрациях, отражены и обсуждены в тексте, что несколько усложняет восприятие материала биологами, не знакомыми близко с данной областью исследований. Тем не менее, в целом обзор хорошо подготавливает читателя к пониманию выполненной работы. К русскому языку претензий нет, кроме небольшого количества неудачных грамматических конструкций, явно возникших при переводе сведений из англоязычной литературы, и хронического раздельного написания союза "также".

Наибольший интерес представляет глава результаты и обсуждение. В первой части работы диссертантом проверена фаг-дисплейная библиотека одноцепочечных антител больных РС, подобраны условия её обогащения и проведено несколько раундов биоэппинга на ОБМ, по результатам которого удалось получить 13 моноклональных антител, специфичных к этому белку. При этом анализ антител происходил как в виде рекомбинантных одноцепочечных антител, экспонированных на поверхности бактериофагов, так и в виде индивидуальных полипептидов. Показана высокая гомология с рядом антител из cerebro-спинальной жидкости больных РС. Особо автор отмечает гомологию с антителами, специфичными к белку LMP1

вируса Эпштейна-Барр, так как, исходя из литературных данных, этот вирус является одним из вероятных кандидатов на место в списке индукторов РС.

Вторая часть работы посвящена доказательству функциональности отобранных антител в виде полноразмерных IgG человека, а также доказательству *in vitro* кроссреактивности одного из антител с ОБМ и LMP1. Автором проведено изучение раздельного влияния тяжелой и легкой цепей на узнавание антигена и изменение аффинности антитела. В данном разделе показана полиреактивная природа аутоантител, специфичных к ОБМ, и приведены соображения, позволяющие частично объяснить эту полиреактивность распределением заряда на поверхности антигена.

Далее диссертант провел дополнительные раунды обогащения фаг-дисплейной библиотеки одноцепочечных антител больных РС на миелин-олигодендроглиальный протеин и LMP1 и с помощью глубокого секвенирования проанализировал нуклеотидные последовательности, кодирующие отобранные антитела. В результате были определены гены зародышевой линии, продукты экспрессии которой, вероятно, и формируют спектр аутоантител при РС. Также показана высокая гомология многих из отобранных антител с провирусными и противобактериальными антителами, что является косвенным подтверждением триггерной роли вирусов и бактерий в индукции РС. В финальной части автором на основе литературных данных и собственных экспериментов представлена гипотетическая схема индукции РС и участия антител в этом процессе.

При изучении диссертационной работы были сделаны следующие замечания:

1. 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 биопэппинг на этом препарате.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

Следует сказать, что перечисленные замечания не влияют на сделанные выводы и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Заключение

Диссертация Ломакина Якова Анатольевича «Структурно-функциональный анализ моноклональных антител, кроссреактивных к вирусным антигенам, при рассеянном склерозе» выполнена на высоком методическом уровне и в целом является завершенным фундаментальным исследованием. В рамках работы над диссертацией Яков Анатольевич, используя метод комбинаторных фаг-дисплейных библиотек, получил ряд моноклональных антител человека, специфичных к белкам миелиновой оболочки, и, возможно, играющих важную роль в развитии заболевания. На основе лучших клонов были созданы полноразмерные IgG в эукариотической системе экспрессии. Был проведен структурно-функциональный анализ этих антител, включающий измерение констант диссоциации при взаимодействии с ОБМ, картирование эпитопов, компьютерное моделирование и другие современные подходы. Была подтверждена гипотеза триггерной роли вируса Эпштейна-Барр в развитии заболевания с помощью механизма молекулярной мимикрии. Не менее интересен тот факт, что Ломакиным Я.А. была показана полиреактивная природа моноклональных антител больных РС с применением двух подходов: с помощью изучения ряда аутоантител, связывающих ОБМ, в виде полноразмерных IgG, и с помощью глубокого секвенирования генов, кодирующих антитела, последовательно обогащенные на основные белки миелиновой оболочки и белок LMP1 вируса Эпштейна-Барр.

Данные результаты докладывались на российских и международных конференциях и опубликованы в рецензируемых научных журналах и могут быть использованы научными группами ряда ведущих институтов РАН.

Диссертационная работа Ломакина Якова Анатольевича соответствует требованиям п.9 "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 -Молекулярная биология.

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре Лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии 30 апреля 2014 г.



Д.В.Купраш

доктор биологических наук, профессор

зав. лаб. передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ИМБ РАН

Подпись Я.А. Ломакина
удостоверен
Ученой секретарь
К.Х.Н.
А.Д. Прицон

