

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
ИНСТИТУТА БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА И
Ю.А. ОВЧИННИКОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИБХ РАН) ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 28 мая 2014 г. № 6

О присуждении **Ломакину Якову Анатольевичу**, гражданину РФ ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Структурно-функциональный анализ моноклональных антител, кроссреактивных к вирусным антигенам, при рассеянном склерозе» по специальности «молекулярная биология» (03.01.03) принята к защите 19.03.2014 г., протокол №2 диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (адрес: Российская Федерация, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; Приказ Минобрнауки России от 15 февраля 2013 г. № 75/нк).

Соискатель Ломакин Яков Анатольевич 1987 года рождения. В 2009 году соискатель окончил Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова по специальности «биохимия». В 2012 году окончил аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. В настоящее время (и в период подготовки диссертации) работает научным сотрудником в лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Диссертация выполнена в лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель – кандидат химических наук Белогуров Алексей Анатольевич, старший научный сотрудник лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Лагарькова Мария Андреевна, доктор биологических наук, заведующий лабораторией генетических основ клеточных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Тиллиб Сергей Владимирович, доктор биологических наук, руководитель лаборатории

молекулярных биотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва (ИМБ РАН) в своем положительном заключении, подписанном д.б.н., профессором Купрашом Д.В., заведующим лабораторией передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ИМБ РАН, указала, что 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.

Соискатель имеет 8 опубликованных работ, из них по теме диссертации 3 работы общим объемом 2 печатных листа, в том числе 1 статья в научном журнале, который включен в перечень российских рецензируемых научных журналов, а так же 2 работы в зарубежных научных изданиях, входящих в базу Web of Science.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации, в которые автор внес основной или существенный вклад:

1. Gabibov A.G., Belogurov A.A. Jr., **Lomakin Y.A.**, Zakharova M.Y., Avakyan M.E., Dubrovskaya V.V., Smirnov I.V., Ivanov A.S., Molnar A.A., Gurtsevitch V.E., Diduk S.V., Smirnova K.V., Avalle B., Sharanova S.N., Tramontano A., Friboulet A., Boyko A.N., Ponomarenko N.A., Tikunova N.V.. Combinatorial antibody library from multiple sclerosis patients reveals antibodies that cross-react with myelin basic protein and EBV antigen. *FASEB J.* 2011 Dec;25(12):4211-21.

2. **Я.А. Ломакин**, М.Ю. Захарова, А.А. Белогуров, Н.А. Быкова, М.А. Дронина, А.Е. Тупикин, В.Д. Кнорре, А.Н. Бойко, А.В. Фаворов, М.Р. Кабилов, Н.А. Пономаренко, А.Г. Габибов. Полиреактивные аутоантитела при рассеянном склерозе: функциональный отбор из фаг-дисплейной библиотеки в сочетании с методом широкомасштабного секвенирования. *ACTA NATURAE*, том 5, №4 (19) 2013, 104-115

3. **Y.A. Lomakin**, M.Y. Zakharova, A.V. Stepanov, M.A. Dronina, I.V. Smirnov, T.V. Bobik, A.Y. Pyrkov, N.V. Tikunova, S.N. Sharanova, V.M. Boitsov, S.Y. Vyazmin, M.R. Kabilov, A.E. Tupikin, A.N. Krasnov, N.A. Bykova, Y.A. Medvedeva, M.V. Fridman, A.V. Favorov, N.A. Ponomarenko, M.V. Dubina, A.N. Boyko, V.V. Vlassov, A.A. Belogurov Jr. and A.G. Gabibov. Heavy–light chain interrelations of MS-associated immunoglobulins probed by deep sequencing and rational variation. *Mol. Immunol.* 2014 Feb 14

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н. Лагарьковой М.А. Отзыв положительный. Содержит 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 ВІАСОРЕ, в рисунке просто не разберется, потому что объяснения в тексте почти отсутствуют.

Отзыв официального оппонента д.б.н. Тиллиба С.В. Отзыв положительный. Содержит 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-олигодендрогликопротеина 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».

Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный. Содержит 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 биопэннинг 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 встречаемостиIGHV 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.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их достижениями в иммунологии, молекулярной и клеточной биологии, наличием большого количества публикаций в высокоцитируемых российских и зарубежных журналах. Их высокая квалификация позволяет объективно оценить научную и практическую ценность настоящей диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании, выполненных соискателем, исследований обоснована гипотетическая модель развития рассеянного склероза у человека по механизму молекулярной мимикрии и вирусной индукции с вовлечением полиреактивных антител. Доказана кроссреактивность белков миелиновой оболочки с вирусными белками.

Определена аминокислотная последовательность ряда патологических антител при рассеянном склерозе.

Теоретическая значимость исследования обоснована фактом, что диссертационная работа имеет чётко выраженный фундаментальный характер и вносит существенный вклад в прояснение этиологии и патогенеза рассеянного склероза. Детальное изучение данной проблемы позволит в дальнейшем использовать полученные данные для создания новых методов диагностики рассеянного склероза, а так же создания лекарственных препаратов, направленных на селективную элиминацию патогенных клеток иммунной системы.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что экспериментальные результаты получены на современном сертифицированном оборудовании. Показана воспроизводимость результатов исследования. Кроссреактивность одноцепочечных антител также подтверждена на примере полноразмерных IgG человека. Предложенная гипотеза индукции рассеянного склероза построена на известных фактах и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации. Идея вирусной этиологии базируется на обобщении фактов по развитию рассеянного склероза с данными по функциональности В-клеток и жизненным циклом ряда вирусов. Используются сравнения авторских данных и данных, полученных ранее по сходным направлениям, и установлено качественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике в тех случаях, когда такое сравнение является обоснованным. Используются современные методы анализа и обработки исходной информации.

Личный вклад соискателя состоит в выборе направления исследований, разработке экспериментальных подходов и обобщении полученных результатов. Основные экспериментальные данные получены соискателем лично за исключением широкомасштабного секвенирования, выполненного совместно с коллегами из Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск Тупикиным А.Е. и Кабиловым М.Р, а так же получения клонов одноцепочечных антител NT5, NT12 и NT18 выполненного при сотрудничестве с Н.В. Тикуновой. Подготовка основных публикаций по выполненной работе выполнялась лично или при непосредственном участии автора.

На заседании 28 мая 2014 г. диссертационный совет принял решение присудить Ломакину Я.А. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 6 докторов наук по профилю диссертации (специальность 03.01.03 – молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовал: за - 23, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Зам. председателя
диссертационного совета

Ученый секретарь
диссертационного совета

член-корр. РАН Липкин В.М.

д.физ.-мат.н. Олейников В.А.