

«УТВЕРЖДАЮ»



Директор
ФГВНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта»,
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор

 Коган И.Ю.

«26» сентября 2022г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта» о научно-практической ценности диссертации Лопаткиной Марии Евгеньевны «Распространенность и транскриптомные эффекты хромосомных микроделений и микродупликаций, затрагивающих ген *cntn6*», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика (медицинские науки).

Актуальность темы выполненной работы

Исследование фенотипических особенностей и эффектов микроделений и микродупликаций представляет большую ценность для развития научных знаний и методических подходов в медицинской генетике.

Известно, что генетический дисбаланс может проявиться на всех этапах онтогенеза, начиная от нарушений на ранних стадиях эмбриогенеза и заканчивая нарушениями репродукции во взрослом возрасте. Большое число микроструктурных хромосомных aberrаций, или вариаций в числе копий участков ДНК (CNV), выявляется различными современными технологиями (матричной сравнительной геномной гибридизация (aCGH), секвенированием экзома (WES) и генома (WGS)).

Известны патогенетически значимые хромосомные aberrации, которые нередко выделяют в самостоятельные микроделеционные и микродупликационные синдромы, как, например, синдром Ди Джорджи, Прадера-Вилли, Ангельмана, Вильямса-Бойрена, Смит-Магенис, Потоки-Лупски, Кулена де Ври, Вольфа-Хиршхорна и многие другие. Однако все больше накапливается информации, касающейся вариантов с неясной патогенетической значимостью (потенциально патогенные вариации).

Микроструктурные aberrации составляют значимую долю среди генетических причин задержки развития и интеллектуальных расстройств. Для многих заболеваний, связанных с нарушением нервно-психического развития характерно наличие микроструктурных перестроек в одних и тех же регионах хромосом, что указывает на общность затронутых перестройкой биологических процессов и молекулярных путей. Функциональные исследования показывают, что как редкие, так и распространенные варианты, связанные с нарушением нервно-психического развития (не только патогенные, но и не ясного клинического значения), влияют на гены, продукты которых вовлечены в общие консервативные молекулярные пути, связанные с процессами синтеза белка, транскрипционной или эпигенетической регуляцией и синаптической передачей сигналов. Однако многие аспекты патогенеза данных состояний до сих пор остаются неясными.

На современном этапе развития науки ни цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови, ни использование животных моделей не подходят для интерпретации клинических эффектов и оценки патогенетической значимости вновь обнаруженных хромосомных вариаций. Выходом из сложившейся ситуации является разработка и внедрение в практику методики получения и изучения персонифицированных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) от пациентов с уникальными микроструктурными aberrациями хромосом и интеллектуальными нарушениями. Создание модельных систем на основе нейронов, полученных из ИПСК пациентов с хромосомными мутациями, позволяет изучить патогенез заболевания на

молекулярном уровне, включая анализ транскрипционной активности генов с помощью определения количества их мРНК.

Одну из удобных модельных систем для изучения механизмов патогенеза хромосомных болезней на клеточном и молекулярном уровне представляет хромосомная абберация (микроделеция или микродупликация) в регионе 3p26.3, затрагивающая единственный ген *CNTN6*, продукт которого экспрессируется преимущественно в ЦНС и вовлечен в процессы развития нейронов, формирования синапсов и миелинизации аксонов. В ряде последних работ показана потенциальная роль CNV, затрагивающих ген *CNTN6*, в патогенезе умственной отсталости, РАС, шизофрении, синдрома Туретта, БАР, СДВГ и других болезней.

Таким образом, оценка распространенности CNV, затрагивающих ген *CNTN6*, и характеристика молекулярных эффектов вариабельности числа копий *CNTN6* в нейронах на транскриптомном уровне, безусловно, является актуальной, а диссертационная работа Лопаткиной М.Е. является востребованной научной работой, представляющей высокую научно-практическую ценность.

Научная новизна работы

Работа обладает высокой степенью научной, методической и методологической новизны. В частности, с использованием технологий репрограммирования соматических клеток впервые получены пациент-специфичные ИПСК от индивидов с интеллектуальными расстройствами и уникальными реципрокными хромосомными мутациями в субсегменте 3p26.3, линия ИПСК - от условно здорового индивида, являющегося носителем микродупликации гена *CNTN6*. С помощью методов редактирования генома получена линия ИПСК с функциональной нуллисомией по данному гену.

Для нейрональных клеток с реципрокными моногенными CNV впервые показаны глобальные транскрипционные изменения по всему геному — продемонстрировано изменение экспрессии большого числа генов, непосредственно не вовлеченных в хромосомную перестройку. Сравнение списков дифференциально экспрессирующихся генов позволило выявить гены,

однонаправленно изменяющие свою экспрессию вне зависимости от типа хромосомной мутации (микроделеции или микродупликации).

Теоретическая и научно-практическая значимость работы

Теоретическая значимость результатов исследования заключается в получении новых фундаментальных знаний о механизмах реализации эффектов реципрокных CNV и фенотипических эффектах хромосомных мутаций и в возникновении нового направления использования линий ИПСК - для детекции низкоуровневого мозаицизма у пациентов с хромосомной патологией.

Практическая значимость работы связана с созданием уникальной коллекции линий ИПСК, созданием базы данных «Клинические и молекулярно-генетические характеристики больных шизофренией», внедрением новой медицинской технологии «Алгоритм молекулярно-цитогенетической диагностики микроструктурных хромосомных aberrаций в сегменте 3p26.3 у детей с недифференцированной умственной отсталостью» в лечебно-диагностический процесс Медико-генетического центра (Генетической клиники) НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, а также с перспективами использования стратегии получения культур персонифицированных ИПСК от пациентов с уникальными хромосомными мутациями в расшифровке патогенетических механизмов иных хромосомных болезней и в разработке новых мишеней лекарственных средств и таргетных препаратов для таких пациентов.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Диссертационная работа Лопаткиной М.Е. состоит из двух частей: «классического» исследования распространенности микроделеций и микродупликаций, затрагивающих ген *CNTN6*, в выборке пациентов с нервно-психическими заболеваниями, и «новаторского» - в создании разнообразных линий ИПСК с дальнейшей дифференцировкой клеток этих линий в нейроны с целью проведения транскриптомного анализа на микрочипах и функциональной аннотации полученных ДЭГ. Обе части работы выполнены на достаточном биологическом материале.

Работу отличает четкий, лаконичный и структурированный дизайн исследования, высокий методический уровень выполнения поставленных задач, полученные результаты соответствуют поставленной цели, представленные результаты сравнительного анализа приведены в полном объеме.

Применен широкий спектр методов исследования, начиная от выделения ДНК и РНК, молекулярно-генетического и молекулярно-цитогенетического анализа (секвенирование следующего поколения - NGS, сравнительная геномная гибридизация – aCGH, полимеразная цепная реакция в реальном времени), до культивирования фибробластов кожи пациентов, репрограммирования соматических клеток с получением ИПСК, оценки плюрипотентности линий методами ОТ-ПЦР, иммунофлуоресцентного анализа и метода получения тератом у иммунодефицитных мышей линии SCID с последующим гистологическим анализом тератом, создания нокаута гена *CNTN6* методом геномного редактирования с помощью системы CRISPR/Cas9, дифференцировки ИПСК с помощью системы лентивирусных векторов и других.

В работе использованы современные методы биоинформатического и статистического анализа. В частности, применен пакет *limma*, *treemap* и ресурс WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit.

Все выводы и положения, выносимые на защиту, основаны на статистически достоверных результатах. Результаты работы представлены на всероссийских и международных конференциях, а также опубликованы в 19-ти научных работах, среди которых 7 статей в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, из них 5 статей в журналах, реферируемых в базе данных Web of Science и Scopus, и 2 статьи в журнале, индексируемом в базе данных РИНЦ. 12 публикаций представлены статьями в сборниках и тезисами научных конференций.

Структура работы

Диссертационная работа в объеме 233 страницы построена по традиционной схеме и включает введение, основные главы (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты и обсуждение), выводы, список

литературы и 4 приложения. Работа иллюстрирована 52 рисунками, 28 таблицами. Библиография включает 336 источников, из них 22 источника отечественной и 308 источников зарубежной литературы, а также 6 интернет-ресурсов.

Во «**Введении**» автором подробно, но недостаточно четко изложены основные данные, которые обосновывают актуальность проведения диссертационного исследования и позволяют судить о научном заделе в данном направлении. Стоит отметить излишнюю детализацию научной новизны исследования. Несмотря на это, цели и задачи работы сформулированы в соответствии с освещенной проблематикой.

«**Обзор литературы**» отражает современное представление о хромосомных мутациях как этиологическом факторе нарушения нервно-психического развития. Подробно описаны вариации числа копий участков ДНК и их вклад в нарушения нервно-психического развития, подчеркнуты сложности в оценке фенотипических проявлений хромосомного дисбаланса. Автор отдельное внимание уделит молекулам межклеточной адгезии, их классификации, структуре и функции. Подробно описаны белки - контактины и их роль в процессах роста и развития нейронов, клеточной выживаемости, ветвления нейритов, аксонального наведения и формирования синаптических контактов. Уделено внимание молекулярным механизмам действия одного из них - CNTN6. Описаны клинические эффекты мутаций, затрагивающих ген, кодируемый этот белок. Особое внимание уделено данным, указывающих на значимость мутаций гена *CNTN6* для развития состояний, характеризующихся как нарушением нервно-психического развития, так и другими фенотипическими проявлениями. Отдельная подглава посвящена модельным системам на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Описан транскриптомный анализ.

«**Материалы и методы**» включают дизайн исследования, подробное описание задач и соответствующих им материалов и методов исследования. Описание методов приведено в полном объеме и является достаточным для понимания их сущности с точки зрения обоснованности подбора в соответствии с выполняемыми задачами.

В главе «**Результаты и обсуждение**» представлены результаты и их последовательное обсуждение, которые разделены на ряд подглав в соответствии с дизайном исследования, а именно: проанализирована частота микроделеций и микродупликаций гена *CNTN6* в выборке пациентов с нарушением нервно-психического развития, описано получение линий ИПСК с различным числом копий гена *CNTN6* и направленная дифференцировка ИПСК в нейроны, приведен сравнительный анализ экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с умственной отсталостью и здоровых доноров. Данные подкреплены иллюстрациями и таблицами, их обсуждение опирается на мировой и отечественный опыт.

В «**Заключении**» работы подведены основные итоги исследования. В частности, результаты исследования свидетельствуют о глобальном характере нарушений транскрипционных процессов в клетках с хромосомной мутацией. Изменения в экспрессионных профилях ИПСК и нейронов касались не только генов из области перестройки, но также и генов, локализованных в других областях генома.

«**Выводы**» отражают основные результаты диссертационного исследования и полностью соответствуют поставленным задачам.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

Существенных замечаний к работе Лопаткиной М.Е. нет. Среди незначительных нужно отметить отсутствие даты и номера решения Этического Комитета, разрешившего данное исследование. Однако есть следующие вопросы:

1. Что является преобладающим в группе пациентов с нарушениями нервно-психического развития, имеющих микроструктурные перестройки с вовлечением гена *CNTN6*: изолированная умственная отсталость или сочетание умственной отсталости с микроаномалиями и пороками развития или психические нарушения (аутистические проявления, шизофрения)?
2. На сколько велика дисперсия между экспрессией генов в разных репликах одной и той же линии ИПСК по сравнению с дисперсией между линиями?

3. Почему количество ДЭГов в нокауте было на порядок меньше, чем в других линиях, и как это соотносится с данными литературы?
4. Было бы интересно сравнить те изменения в ДЭГ, которые были выявлены при изучении клеток отца и сына, с экспрессией генов в других клеточных линиях. На сколько они были близки тем генами, экспрессия которых однонаправленно менялась у сибсов?
5. По какому критерию были отобраны для валидации результатов микрочипового анализа 6 генов: *CNTN6*, *CBLN2*, *OXR1*, *PEG3*, *CHL1* и *NOTCH1*?

Заключение

Диссертация Лопаткиной Марии Евгеньевны «Распространенность и транскриптомные эффекты хромосомных микроделений и микродупликаций, затрагивающих ген *cntn6*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика (медицинские науки), является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, которая содержит решение актуальной проблемы – оценке роли микрохромосомных вариаций в патогенезе заболеваний человека.

По своей актуальности, научной новизне, практической ценности полученных результатов, методическому уровню и объему проведенных исследований представленная диссертационная работа полностью соответствует критериям, установленным пунктом 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства РФ от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539), предъявляемых к кандидатским диссертациям, а ее автор - Лопаткина Мария Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика (медицинские науки).

Отзыв на диссертацию Лопаткиной Марии Евгеньевны «Распространенность и транскриптомные эффекты хромосомных

микроделений и микродупликаций, затрагивающих ген *cntnb*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика (медицинские науки) заслушан, обсужден и одобрен на заседании Учёного совета ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» (протокол № 7 от 20 сентября 2022 г.).

Составители отзыва

Руководитель отдела геномной медицины

ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта»

доктор биологических наук

Глотов Андрей Сергеевич

врач-генетик медико-генетического центра

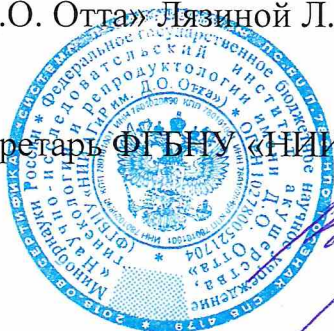
кандидат медицинских наук

Лязина Лидия Викторовна

Подпись руки д.б.н., руководителя отдела геномной медицины, ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» Глотова А.С. и к.м.н., врача-генетика МГЦ, ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» Лязиной Л.В. заверяю:

Учёный секретарь ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта»

д.м.н.



Капустин Роман Викторович

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»

199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.3

Телефон – +7 (812) 679-55-51

e-mail – iagmail@ott.ru