

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Лопаткиной Марии Евгеньевны на тему «Распространенность и транскриптомные эффекты хромосомных микроделеций и микродупликаций, затрагивающих ген *CNTN6*», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. – Генетика

Актуальность выполненного исследования. Значительные достижения последних десятилетий в области медицинской генетики способствовали развитию лабораторных технологий, которые широко используются для решения фундаментальных и прикладных задач медицины. Большой прогресс в изучении наследственных заболеваний сделан благодаря достижениям молекулярной цитогенетики и молекулярной генетики, которые расширили наши представления о природе многих заболеваний. Это в значительной степени относится к хромосомным болезням, характеризующимся врожденными пороками развития в сочетании с нарушением интеллектуального развития. Благодаря активному внедрению в клиническую практику современных полногеномных технологий установлено, что причинами таких заболеваний, наряду с количественными и крупными структурными нарушениями хромосом, являются микроструктурные хромосомные перестройки и вариации числа копий участков ДНК (CNV). В то же время механизмы развития фенотипических проявлений при микроструктурных хромосомных нарушениях не ясны. Стоит отметить, что при разных заболеваниях, связанных с нарушением нервно-психического развития, выявляются микроструктурные перестройки в одних и тех же регионах генома, что, вероятно, указывает на пересечение затронутых перестройкой биологических процессов и молекулярных путей и, соответственно, на общность патогенеза данных состояний. Тем не менее, клинический полиморфизм заболевания, наличие неспецифических симптомов у пациентов с различными хромосомными синдромами, неполная пенетрантность CNV, наличие протяженной хромосомной перестройки, затрагивающей одновременно широкий спектр генов с различными функциями, осложняют интерпретацию клинической значимости выявляемых хромосомных aberrаций.

В последнее время широкое применение находят методы получения целевого типа клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) от пациентов с различными хромосомными и геномными мутациями. Очевидно, что ИПСК представляют собой перспективную модельную систему для изучения патогенеза хромосомных и других наследственных болезней на клеточном и молекулярном уровне. Вышеперечисленные обстоятельства определяют актуальность диссертационной работы Лопаткиной Марии

Евгеньевны, которое посвящено изучению молекулярных механизмов, лежащих в основе патологического эффекта хромосомных микроделечий и микродупликаций в модельной системе нейронов, дифференцированных из ИПСК пациентов с интеллектуальными нарушениями и изменением числа копий участков ДНК.

Научная новизна исследования заключается в том, что автором впервые получены данные об особенностях экспрессии генов в нейронах, несущих моногенные делеции и дупликации в регионе 3p26.3. В ходе проведения диссертационной работы получены пациент-специфичные ИПСК от индивидов с интеллектуальными расстройствами и хромосомными перестройками, затрагивающими единственный ген *CNTN6*, ИПСК от условно здорового индивида, являющегося носителем микродупликации *CNTN6*, и линия ИПСК с функциональной нуллисомией по данному гену. Впервые исследованы особенности дифференциальной экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК с различным числом копий гена *CNTN6* и выявлены глобальные транскрипционные изменения по всему геному. Показано, что белковые продукты генов, снижающих свою экспрессию в нейронах с различным числом копий *CNTN6*, участвуют в значимых для развития мозга биологических процессах. Также впервые установлены особенности экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК бессимптомного носителя хромосомной дупликации, затрагивающей единственный ген *CNTN6*.

Научная и практическая значимость проведенного диссертационного исследования заключается в получении новых фундаментальных знаний о молекулярных механизмах реализации эффектов хромосомных перестроек. Разработанные стратегии получения культур персонифицированных ИПСК от пациентов с хромосомными мутациями и их дальнейшая дифференцировка в определенные типы клеток могут представлять интерес для проведения фундаментальных исследований, направленных на расшифровку патогенетических механизмов хромосомных болезней, а также на выявление новых мишеней лекарственных средств. Также стоит отметить, что в ходе выполнения исследования разработан алгоритм молекулярно-цитогенетической диагностики микроструктурных хромосомных aberrаций в сегменте 3p26.3 у детей с недифференцированной умственной отсталостью, внедренный в лечебно-диагностический процесс Медико-генетического центра НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Достоверность полученных результатов и выводов не вызывает сомнений, поскольку диссертационное исследование выполнено с применением современных клеточных технологий репрограммирования соматических клеток, валидацией результатов, использованием молекулярно-цитогенетических, молекулярно-генетических и

биоинформатических методов исследования с верификацией полученных данных, а также адекватной статистической обработкой полученных результатов.

Оценка содержания диссертационного исследования. Представленная к защите диссертационная работа написана в традиционной форме, изложена на 233 страницах машинописного текста, иллюстрирована 52 рисунками и 28 таблицами и включает следующие разделы: Введение, основные главы (Обзор литературы, Материал и методы исследования, Результаты и обсуждение), Выводы, Список литературы и 4 приложения. Библиографический указатель включает 336 источников литературы, из них 22 – отечественных и 308 – зарубежных, а также 6 интернет-ресурсов.

Во **Введении** автор обосновывает актуальность поставленной цели исследования, аргументирует необходимость изучения случаев хромосомных микроделений и микродупликаций, выявляемых у пациентов с нарушением нервно-психического развития и здоровых родственников без фенотипического проявления хромосомной мутации, с помощью современных клеточных и молекулярно-генетических технологий. В данном разделе определена степень научной разработанности темы исследования, сформулированы цель, задачи и основные положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

В **Обзоре литературы** освещены актуальные проблемы изучения хромосомных болезней, установления гено-фенотипических корреляций и раскрытия механизмов реализации патологического эффекта хромосомной мутации. Автор акцентирует внимание на сложностях изучения моногенных и внутригенных микроделений и микродупликаций, связях микроструктурных aberrаций хромосом с нарушением нервно-психического развития. В обзоре изложены данные о связи мутаций в генах, кодирующих молекулы межклеточной адгезии, с развитием интеллектуальных и психических нарушений, в частности, представлена информация о возможной роли микроделений и микродупликаций в субсегменте 3p26.3, затрагивающих ген *CNTN6*, с развитием умственной отсталости, расстройств аутистического спектра, шизофрении. Большое внимание уделено применению технологий репрограммирования соматических клеток пациентов с различными хромосомными мутациями для создания клеточных моделей, изучения патогенеза заболевания и разработки терапевтической стратегии. Обзор литературы написан хорошим языком, не вызывает принципиальных замечаний.

Глава «**Материал и методы исследования**» включает план проведенного исследования, структуру и объем анализируемого материала (пациенты с нарушением нервно-психического развития и шизофренией, участвовавших в скрининге на носительство микроструктурных aberrаций), краткое описание пробандов с

микроделецией и микродупликацией 3p26.3, характеристика созданных линий ИПСК с различным числом копий гена *CNTN6*. Исследование проведено с применением самых современных и адекватных поставленным задачам лабораторных методов (технологии репрограммирования и направленной дифференцировки клеток, молекулярно-генетические методы и статистическая обработка данных), которые подробно описаны в данной главе.

Глава «**Результаты и обсуждение**» включает несколько разделов в соответствии с поставленными задачами диссертационного исследования. В первом разделе данной главы «Частота микроделений и микродупликаций гена *CNTN6* в выборке пациентов с нарушением нервно-психического развития» подробно описаны результаты скрининга на носительство микроструктурных aberrаций в регионе 3p26.3. На основании анализа литературы и собственных данных в группе пациентов была определена частота CNV, затрагивающих *CNTN6*. Важным наблюдением является тот факт, что микроделеции и микродупликации *CNTN6* встречались и у здоровых индивидов с сопоставимой частотой, при этом среди здоровых носителей статистически значимо чаще были выявлены случаи микродупликации *CNTN6* в сравнении с группой пациентов с нарушением нервно-психического развития, что может указывать на неполную пенетрантность хромосомной дупликации и должно приниматься во внимание при проведении медико-генетического консультирования.

Во втором разделе «Получение линий ИПСК с различным числом копий гена *CNTN6*» автор приводит результаты создания линии ИПСК с варьирующим числом копий гена *CNTN6* и соответствующего хромосомного региона в ряду от нуллисомии (нокаута гена) к моносомии, дисомии (норма) и трисомии. В третьем подразделе приводятся результаты дифференцировки данных линий в нейрональном направлении. В четвертом разделе «Анализ экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с умственной отсталостью и здоровых доноров» приведены результаты проведенного транскриптомного анализа и последующей биоинформатической обработки первичных данных, позволившей определить дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ). Для нейронов, полученных из ИПСК пробандов с микроделецией и микродупликацией *CNTN6*, обозначены общие ДЭГ, продукты которых участвуют в регуляции образования синапсов и синаптической передаче, развитии и дифференцировке нейронов, регуляции цикла синаптических везикул, локализации рецепторов в синапсах и везикулярном транспорте. Идентификация общих ДЭГ и обогащенных категорий биологических процессов может указывать на общность затронутых перестройкой молекулярных путей, что в свою очередь, может объяснять схожесть фенотипических проявлений как хромосомных микроделений,

так и микродупликаций в регионе 3p26.3, в частности умственной отсталости, расстройств аутистического спектра и др.

В четвертом разделе также приводятся данные об изменении экспрессии генов в нейронах с микродупликацией *CNTN6*, дифференцированных из ИПСК пробанда с интеллектуальными нарушениями и его условно здорового отца. Несмотря на схожее число общих ДЭГ, характер изменения экспрессии в нейронах пробанда и его отца относительно уровня экспрессии генов в клетках без хромосомной мутации существенно отличался: для нейронов пробанда прослеживалась тенденция к снижению экспрессии подавляющего большинства выявленных ДЭГ (89%).

В **Заключении** в краткой форме подведены основные итоги исследования. **Выводы** соответствуют поставленной цели и задачам исследования, отражают полученные результаты диссертационной работы.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации. Автореферат диссертации полностью отражает основные положения диссертации.

По содержанию и оформлению диссертации принципиальных замечаний нет.

Результаты исследования были широко представлены на различных научных конференциях, в том числе международных, и опубликованы в рецензируемых научных изданиях, соответствующих критериям ВАК РФ для публикации результатов квалификационных диссертационных работ на соискание ученой степени.

Научно-исследовательская работа Лопаткиной Марии Евгеньевны на тему «Распространенность и транскриптомные эффекты хромосомных микроделечий и микродупликаций, затрагивающих ген *CNTN6*» соответствует специальности 1.5.7. – Генетика.

Заключение. Диссертационная работа Лопаткиной Марии Евгеньевны на тему «Распространенность и транскриптомные эффекты хромосомных микроделечий и микродупликаций, затрагивающих ген *CNTN6*» является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научно-практическая задача по изучению молекулярных механизмов, лежащих в основе патологического эффекта хромосомных мутаций в регионе 3p26.3 в модельной системе нейронов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с недифференцированными формами умственной отсталости.

Диссертация Лопаткиной Марии Евгеньевны полностью соответствует п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакциях от 21.04.2016 г. № 335; от 02.08.2016 г. № 748; от 01.10.2018 г. № 1168), предъявляемых к диссертациям на

