

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу 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 темы выполненной работы

Диссертационная работа Лопаткиной Марии Евгеньевны посвящена изучению патогенеза нарушений интеллектуального развития (НИР), ассоциированных с изменением числа копий (CNV) гена *CNTN6*. Благодаря развитию молекулярно-генетических методов диагностики у пациентов с НИР зачастую обнаруживают микроструктурные aberrации хромосом, что в большинстве случаев и является причиной заболевания. Одними из таких хромосомных нарушений являются микроделеции и микродупликации локуса 3p26.3, затрагивающего ген *CNTN6*. Однако CNV гена *CNTN6* обнаруживают и у здоровых людей, поэтому крайне актуально провести исследование патогенеза обнаруживаемых перестроек.

Модельной системой для изучения влияния CNV гена *CNTN6* на внутриклеточные пути была выбрана система нейрональных клеток, дифференцированных из пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с необходимым числом независимых контролей. Соискатель логично предположил, что CNV гена *CNTN6* могут приводить к активации или ингибированию ряда факторов, вовлеченных в жизнедеятельность клеток нервной системы, поэтому для изучения патогенеза был выбран транскриптомный анализ.

Таким образом, в рамках диссертационной работы Марии Евгеньевны исследуются актуальные вопросы изучения хромосомного дисбаланса в модельной клеточной системе для усовершенствования диагностики нарушений интеллектуального развития.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

В ходе работы были сформулированы научные положения, рекомендации и выводы, основанные на большом объеме фактического материала с применением актуальных методов. Был проведен тщательный статистический анализ. Достоверность результатов работы сомнений не вызывает.

Научная новизна

Научная новизна диссертационной работы Лопаткиной Марии Евгеньевны обусловлена использованием пациент-специфичных ИПСК от индивидов с интеллектуальными расстройствами и уникальными реципрокными хромосомными мутациями в субсегменте 3p26.3. Впервые для нейрональных клеток с реципрокными моногенными CNV показаны глобальные транскрипционные изменения генов, непосредственно не вовлеченных в хромосомную перестройку локуса 3p26.3. Соискатель продемонстрировал, что это гены, белковые продукты которых участвуют в значимых для развития мозга биологических процессах.

Проведенное исследование показывает, что вне зависимости от типа хромосомной мутации (микроделеции или микродупликации) CNV гена *CNTN6* однонаправленно изменяет экспрессию одних и тех же генов, что может объяснять общность патогенеза НИР, ассоциированных с изменением числа копий этого гена.

Значимость выводов и рекомендаций, полученных в диссертации, для науки и практики

Результаты диссертационной работы Марии Евгеньевны не только описывают возможный механизм развития нарушений интеллектуального развития, ассоциированных с изменением числа копий гена *CNTN6*, но и закладывают фундамент для проведения такого рода исследований и для других заболеваний, связанных с CNV, а также на выявление новых мишеней лекарственных средств и синтез новых таргетных препаратов.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Лопаткиной Марии Евгеньевны включает 234 страницы печатного текста. Работа содержит 52 рисунка, 15 таблиц и 4 приложения. Библиографический указатель состоит из 336 наименований, среди которых 22 отечественных источника и 314 зарубежных. Работа построена по традиционной схеме: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список использованной литературы, список иллюстративного материала, приложения.

В разделе «Введение» описана степень разработанности темы исследования и его актуальность, изложены его задачи и цель. Также здесь отображено личное участие автора, приведена информация о публикациях и апробации.

В обзоре литературы приведена вся необходимая информация о тематике проводимого исследования. Описаны хромосомные мутации как этиологический фактор нарушений нервно-психического развития, подробно рассмотрены CNV. Широко освещены основные молекулы межклеточной адгезии, одной из которых является контактин *CNTN6* – предмет изучения соискателя. Достаточно подробно рассмотрены механизмы реализации действия молекулы *CNTN6*, клинические эффекты мутаций, затрагивающих ген *CNTN6*, ассоциация мутаций гена *CNTN6* с процессами, не

связанными с функциями ЦНС. Отдельно соискатель описывает возможность использования модельных систем на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для изучения наследственных заболеваний, а также транскриптомный анализ как инструмент изучения патогенеза хромосомных болезней.

Раздел «Материалы и методы» включает описание методов и объектов исследования. Этот раздел написан очень подробно и понятно. Отдельно хотелось бы обратить внимание на схему исследования, приведенную на рисунке 8 – она очень наглядна. Сначала соискатель кратко описывает схему всего исследования, а затем приводит детальные протоколы отдельных ее частей.

Глава «Результаты и обсуждение» включает четыре подраздела. В первом из них представлены частоты микроделений и микродупликаций гена *CNTN6* в выборке пациентов с нарушением нервно-психического развития. Затем следует описание процесса и результатов получения линий ИПСК с различным числом копий гена *CNTN6*. В третьем подразделе приведены результаты направленной дифференцировки ИПСК в нейроны, а затем описан анализ экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с умственной отсталостью и здоровых доноров.

В «Заключении» и «Выводах» подводится итог работы. Представленные выводы диссертации и основные положения, выносимые на защиту, обоснованы, логичны, соответствуют поставленным задачам, в полной мере отражают результат диссертационной работы.

Рекомендации по использованию результатов и выводов

Результаты диссертационной работы значимы как с фундаментальной точки зрения (разработанные стратегии получения культур персонифицированных ИПСК от пациентов с уникальными хромосомными мутациями и их дальнейшая дифференцировка могут быть использованы для изучения патогенеза ряда наследственных заболеваний), так и с практической точки зрения (усовершенствование диагностики микроструктурных хромосомных aberrаций в сегменте 3p26.3 у детей с недифференцированной умственной отсталостью).

Результаты работы Лопаткиной Марии Евгеньевны внедрены в лечебно-диагностический процесс Медико-генетического центра (Генетической клиники) НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Сведения о полноте опубликованных научных работ

Результаты исследования полностью опубликованы в 19 печатных работах соискателя, из которых 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для соискателей ученой степени кандидата медицинских наук (5 из них в Web of Science и Scopus).

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации Лопаткиной Марии Евгеньевны полностью соответствует основным положениям диссертации. В автореферате отражены актуальность исследования, степень разработанности темы, цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, основные положения, выносимые на защиту и полученные результаты.

Общие вопросы и замечания по работе

1. Исследование транскриптома в линиях ИПСК, полученных с помощью лентивирусных векторов, не самое удачное решение. Лентивирус – интегрирующий вектор, место интеграции которого случайно. При этом каждый трансген, доставляемый лентивирусом, нес собственный промотор. Интеграция могла привести к усилению экспрессии каких-то случайных генов из-за встраивания промотора. Та же история и с дифференцировкой ИПСК в нейрональном направлении – она тоже сделана с помощью лентивирусной трансдукции, последствия в отношении случайной активации разных генов здесь такие же. Уверен ли соискатель, что изменения в экспрессии генов, полученных в работе, обусловлены именно разной дозой гена *CNTN6*?

2. Не очень понятно, почему в работе число аллелей в локусе 3p26.3 было оценено с помощью qPCR. Разве ХМА не является золотым стандартом для оценки количества аллелей? Более того, к самому протоколу qPCR есть ряд вопросов, не уверена, что в таком исполнении этот метод обладает необходимой точностью для того, чтобы подтверждать или опровергать находки после ХМА. Между тем, в работе именно qPCR считается эталоном. Просьба прояснить этот момент.

3. Как соискатель может объяснить снижение экспрессии *CNTN6* (вместо отсутствия) в нейральных производных нуллисомной линии ИПСК человека?

4. Считает ли соискатель достаточным использовать всего один ген нормализатор и всего две повторности для изучения экспрессии при использовании интеркалирующего красителя?

5. Неясна история с нокаутированием *CNTN6*. В материалах и методах указано, что встраивали *GFP* в место разрыва (в район старт-кодона гена *CNTN6*), но на рисунке 30 представлено, что возникает индел. Просьба прояснить этот момент.

Указанные замечания и комментарии не носят принципиального характера и не умаляют научную ценность и практическую значимость диссертационного исследования Лопаткиной Марии Евгеньевны.

Заключение

Диссертационная работа Лопаткиной Марии Евгеньевны на тему «Распространенность и транскриптомные эффекты хромосомных микроделений и микродупликаций, затрагивающих ген *CNTN6*», выполненная под руководством доктора биологических наук, профессора РАН Лебедева Игоря Николаевича и доктора медицинских наук, профессора Ивановой Светланы Александровны, является

законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития медицинской генетики.

Диссертационная работа Лопаткиной Марии Евгеньевны на тему «Распространенность и транскриптомные эффекты хромосомных микроделений и микродупликаций, затрагивающих ген *CNTN6*» полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 11.09.2021 N 1539), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присвоения степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. – Генетика (медицинские науки).

Официальный оппонент:

Заведующая лабораторией редактирования генома

Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»

к.м.н.

 Смирнихина Светлана Анатольевна

Сведения об учреждении, где работает оппонент:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»

115478, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

Тел.: 8 (499) 612-86-07

E-mail.: mgnc@med-gen.ru

Сайт организации: <https://www.med-gen.ru/>

Личную подпись к.м.н. Смирнихиной С.А. заверяю:

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»

к.м.н.





Воронина Екатерина Сергеевна

22.09.2022