

## ОТЗЫВ

**официального оппонента доктора биологических наук Пчелиной Софьи Николаевны на диссертационную работу Протасовой Марии Сергеевны «Генетические факторы редких форм врождённых мозжечковых атаксий», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. генетика**

### Актуальность темы исследования

Диссертационное исследование Протасовой Марии Сергеевны посвящено изучению генетических основ развития врожденных форм мозжечковых атаксий. Наследственные атаксии – гетерогенная группа заболеваний, характеризующаяся нарушениями движений. Имеет как аутосомно-доминантный, так и аутосомно-рецессивный, в том числе X-сцепленный доминантный, X-сцепленные рецессивный и митохондриальный типы наследования. Сегодня известно около 500 генов, мутации в которых являются причиной развития заболевания. При этом описаны случаи, когда различные мутации в одном и том же гене являлись причиной развития наследственных атаксий как с аутосомно-доминантным типом, так и с аутосомно-рецессивным. При этом как правило формы с доминантным типом наследования развиваются в более позднем возрасте, в то время как рецессивные формы начинаются в младенчестве и имеют более тяжелое течение.

Развитие геномных технологий, в первую очередь технологии массового параллельного секвенирования дают новые возможности для изучения основ развития в первую очередь гетерогенных наследственных заболеваний, при которых сходный фенотип может быть обусловлен мутациями в различных генах. Все наследственные атаксии являются редкими заболеваниями, при которых, как правило расстройства движения сочетаются с когнитивными нарушениями. Однако, в настоящее время для некоторых из них, наиболее частых, аутосомно-доминантные спиноцеребеллярные атаксии (SCA1, 2, 3, 6, 7, 12 и 17), аутосомно-рецессивная атаксия Фридрейха, синдром мозжечковой атаксии, нейропатии и вестибулярной арефлексии (CANVAS) и синдром ломкой X-хромосомы с тремором/атаксией (FXTAS) известны генетические причины их развития, а гены заболевания включены в существующие диагностические панели. В основном это атаксии, обусловленные динамическими мутациями и именно для них разрабатываются в настоящее время подходы к лечению. В тоже время молекулярные основы развития редких врожденных форм мозжечковых атаксий остаются неизвестными. Геномное секвенирование

позволяет выявить молекулярные основы развития заболевания примерно в 30% случаев, что говорит о необходимости разработки новых подходов к анализу геномных данных.

Настоящее исследование посвящено поиску генетических основ развития редких врожденных мозжечковых атаксий, которые фенотипически проявляются нарушениями движений при отсутствии когнитивных нарушений, а также разработке подхода биоинформатического анализа данных массового параллельного секвенирования при отсутствии больших родословных.

Следует отметить, что в настоящее время не существует подходов к лечению наследственных атаксий. В этой связи крайне очевидной фундаментальной значимости выявления механизма развития врожденных мозжечковых атаксий, результаты исследования имеют и прикладную значимость и важны для медико-генетического консультирования, на предмет постановки диагноза и исключения назначения неэффективной, часто имеющей побочные эффекты терапии.

### **Научная новизна исследования**

Основной новизной диссертационной работы Протасовой М.С., является новый расширенный подход при анализе редкой геномной вариантностью условно патогенной или предположительно патогенной значимости примененный на примере поиска генетических основ развития врожденных мозжечковых атаксий при интерпретации данных, полученных в результате геномного или экзомного секвенирования. Данный подход может иметь актуальность при поиске генетических основ развития заболевания в малых семьях и/или при спорадических случаях и других заболеваниях, в том числе болезнях мозга. Он основан на анализе экспрессий генов и их паралогов в различных областях мозга в процессе пренатального и постнатального развития. В результате данного подхода во всех 6 семьях, включенных в исследование, были описаны предположительные генетические причины их развития. Причем мутации были выявлены в двух генах *LRCH2* и *CSMD1*, роль которых ранее в работе мозга не обсуждалась. В гене *GRID2* обнаружена новая делеция, приводящая к редкому синдрому мозжечковой атаксии, умственной отсталости и квадропедии.

### **Теоретическая и научно-практическая значимость исследования**

Результаты диссертационного исследования Протасовой М.С. существенно расширяют представления о наследственных основах развития

врожденных мозжечковых атаксий, а также на примере алгоритма выявления генов данной группы заболеваний представляют новый подход для поиска значимых в этиологии заболевания вариантов генома человека. Данный подход заключается в том, что при оценке патогенности выявленных вариантов генома используется не только обычные алгоритмы, а именно, программы, предсказывающие влияние данных вариантов на структуру белка, и оценка распространенности данного варианта, и его консервативности в эволюционном ряду, но и биоинформатическую оценку тканеспецифичной экспрессии генов-кандидатов, а также их паралогов в пренатальном и постнатальном развитии.

С практической точки зрения автором получены новые данные о генетических основах развития мозжечковых атаксий. А именно показано, что мутации в генах *LRCH2* и *CSMD1* могут приводить к развитию заболевания. Выявленные гены могут быть добавлены в диагностические панели для диагностики наследственных неврологических заболеваний, а полученные знания использованы при проведении медико-генетического консультирования для подтверждения диагноза.

### **Обоснованность и достоверность результатов исследования**

Диссертационная работа Протасовой М.С. выполнена на высоком методическом уровне. Высокая степень достоверности и обоснованности выводов, а также основных результатов диссертационной работы обусловлена разнообразием и адекватностью использованных подходов как для валидации результатов массового параллельного секвенирования, так и расширением подходов для оценки патогенности выявленных генетических вариантов, и оценки их сегрегации с заболеванием в разветвленной семье. Полученные выводы полностью соответствует поставленной цели и задачам исследования.

### **Структура и содержание диссертационной работы**

Диссертационная работа Протасовой М.С. изложена на 206 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы, благодарности, список литературы и приложения. Иллюстративный материал диссертации представлен в виде 9 таблиц и 22 рисунков, приложение содержит 20 таблиц и 22 рисунка. Список литературы включает 490 литературных источников, из которых 476 источников зарубежной литературы. Во введении автором обозначена актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Сформулированные автором задачи исследования адекватны и соответствуют поставленной цели.

Обзор литературы составлен логично и широко освещает состояние изучаемой проблемы: современные представления о молекулярно-генетических, нейробиологических аспектах мозжечковых атаксий. Отдельно разбирается патогенез мозжечковых атаксий без когнитивных нарушений и атаксий с умственной отсталостью. Автором проанализирован большой объем работ в основном зарубежных авторов.

В главе «Материалы и методы исследования» подробно описаны все экспериментальные методы исследования. Образцы ДНК пробандов в исследуемых семьях с наследственными атаксиями были секвенированы с использованием метода массового параллельного секвенирования. В исследовании включен биоматериал (образцы ДНК) от членов 6 семей: бурятской семьи, 4х малых семей (3 малых семьи и спорадический пациент) московского и кавказского происхождения и одной бразильской семьи с мозжечковой атаксией, умственной отсталостью и нарушением речи (семья с синдромом мозжечковой атаксии с проявлениями умственной отсталости и квадропедии (SAMRO)).

При этом в различных семьях использовался различный подход к проведению секвенирования. Для двух пациентов из бурятской семьи (АХ), также как и для пациента из бразильской семьи, проведено геномное секвенирование, в то время как пробандам из московских семей AI-IV было проведено полноэкзомное секвенирование. Важно отметить, что автор лично участвовал в подготовке библиотек для геномного секвенирования, которое проводилось в Институте общей генетики в лаборатории Эволюционной геномики. Также автор лично проводил биоинформатический анализ, а именно, аннотацию вариантов, анализ выявленных вариантов в популяциях (по проекту 1000 геномов). Адекватно и широко использованы современные программы для предсказания патогенности выявленных генетических вариантов.

Проверка наличия отобранных вариантов, однонуклеотидных замен, в геноме пробандов проводилась методом прямого секвенирования по Сэнгеру, а структурных перестроек, как например, делеция в гене АТР7А и гене GRID2, была разработана система праймеров, в том числе фланкирующих границы делетированного фрагмента ДНК. Верификация осуществлялась с использованием ПЦР и электрофоретического разделения ПЦР фрагментов. Таким образом, в исследовании использован широкий спектр современных молекулярно-генетических методов. Полученные при использовании метода

массового параллельного секвенирования результаты подтверждены адекватными методами и не вызывают сомнений.

В главе «Результаты» приводится подробное описание результатов, а именно приводится подробно и качественно иллюстрированный алгоритм поиска патогенных вариантов в геноме, являющихся причиной развития мозжечковых атаксий в семьях. Так, в семье бразильского происхождения АХ были последовательно отобраны редкие варианты, исключены условно патогенные, с учетом их встречаемости в популяции, а также, что важно учитывалась экспрессия анализируемых генов в пренатальном периоде. Также оценивалось влияние выбранных редких вариантов на сплайсинг и на изменение пространственной структуры белка. Были отобраны варианты, приводящий к замене глицина на серин в положении 682 (Gly682Ser) в митохондриальном АТФ-связывающем транспорте (ген *ATCB7*), консервативный в эволюционном ряду и по анализу *in silico* влияющий на пространственную структуру белка, и вариант делеция второго экзона гена *ATP7A*, кодирующего АТФазу, участвующую в транспорте меди. При анализе автор учел, что оба гена экспрессируются в мозжечке в период пренатального развития и расположены в локусе гомозиготности (брак между двоюродными братом и сестрой).

При отборе редких вариантов возможно патогенной значимости в других семьях с врожденной атаксией был применен анализ оценки экспрессии их паралога. Была разработана программа, учитывающая могут ли паралоги отобранных генов – кандидатов компенсировать потерю экспрессии мажорной изоформы дикого типа. Представленный подход интересен, и может в ряде случаев быть дополнительным в оценке патогенности отобранных вариантов, поскольку выбор генетических факторов развития заболевания при ряде патологий в процессе интерпретации данных геномного и экзомного секвенирования является нерешенной и в ряде случаев достаточно сложной задачей особенно при спорадических случаях заболевания или поиска основ заболевания в малых семьях. Используя такой комбинированный подход учета экспрессии генов на ранних этапах развития головного мозга, а также экспрессии их паралога и их компенсаторный потенциал, в исследовании выявлены новые гены, мутации в которых приводят к редкой форме аутосомно – и X-сцепленной рецессивной спинномозжечковой атаксии, а именно гены *LRCH2* и *CSMD1*, мутации в которых ранее не были ассоциированы с заболеваниями мозга.

В «Заключении» автор в краткой форме подводит итог всех исследований и резюмирует ключевые положения диссертационной работы.

Выводы диссертационного исследования четко сформулированы и соответствуют поставленным целям и задачам.

Автореферат отражает основные результаты выполненной диссертационной работы.

### **Сведения о полноте опубликованных научных результатов**

Результаты исследования представлены в 7 научных публикациях, в том числе в 3 статьях в ведущих научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science и рекомендованных ВАК для защиты диссертаций. Промежуточные результаты доложены на региональных, всероссийских и международных конференциях, симпозиумах и съездах.

### **Общие вопросы и замечания по работе**

Существенных недостатков в работе не обнаружено, однако имеются отдельные вопросы и замечания:

1. Представляется не совсем корректно сформулированной первая задача  
1 Массовое параллельное секвенирование – это технология, которая может быть применима к одному локусу в том числе. Корректнее было бы сформулировать геномное или экзомное секвенирование.
2. В исследовании молекулярные основы развития атаксий выявлены в 6 семьях из 6 семей, включенных в исследование (100% против обычных 30%). Чем это объяснить? Применением расширенного алгоритма биоинформатической обработки? Или же в работу не включены другие семьи, где не удалось установить причину развития заболевания?
3. Из текста диссертации не совсем понятен алгоритм обследования семей с врожденными мозжечковыми атаксиями. Было ли изначально проведено обследование семей с использованием диагностических панелей методом таргетного секвенирования? Почему в одних случаях было выполнено секвенирование экзонов, в других полногеномное секвенирование?
4. Хотелось бы узнать также мнение автора о практическом применении полученных результатов. Выявлены новые гены, для которых предполагается их участие в развитии структуры мозжечка. Следует ли включать эти гены в существующие диагностические панели? И каков по мнению автора должен быть алгоритм обследования пациентов с такой гетерогенной по этиологии и фенотипам группы заболеваний

как наследственные атаксии? Это диагностические панели? Экзомное секвенирование?

5. В работе убедительно продемонстрирована патогенность выявленных генетических вариантов методами *in silico*. Каков мог бы быть дальнейший этап в подтверждении значимости данных вариантов в патогенезе заболевания. Какие функциональные исследования в дальнейшем было бы целесообразно провести для подтверждения полученных результатов?

Представленная работа имеет четкое построение, логично изложена, написана хорошим языком, полно иллюстрирована и представляет собой законченное исследование. Данные замечания в целом не противоречат положительной оценке работы и не снижают её научно-практической ценности.

### **Заключение**

Диссертационная работа Протасовой Марии Сергеевны «Генетические факторы редких форм врождённых мозжечковых атаксий», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика, является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи, имеющей важное значение для биологической науки в целом, генетики неврологических заболеваний, а именно, мозжечковых атаксий и развития медико-генетического консультирования. Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9-14, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09. 2013 г. № 842 (в редакции с изменениями и дополнениями от 30 июля 2014 г., 21 апреля, 2 августа 2016 г., 29 мая, 28 августа 2017 г., 1 октября 2018 г., 20 марта, 11 сентября 2021 г.) а ее автор – Протасова Мария Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика, биологические науки.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией молекулярной генетики человека Отдела молекулярной и радиационной биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский

институт», г. Санкт-Петербург, доктор биологических наук (специальность 03.02.07 «генетика»)

Мел Пчелина Софья Николаевна

«28» марта 2023 года

Подпись Пчелиной С.Н. заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»



Воробьев Воробьев Сергей Иванович

«28» марта 2023 года

Согласна на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных при работе диссертационного совета 24.1.088.01 по диссертационной работе Протасовой Марии Сергеевны «Генетические факторы редких форм врождённых мозжечковых атаксий», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. генетика.

Мел Пчелина Софья Николаевна

Пчелина Софья Николаевна

Адрес места работы: 177350, Ленинградская область, г. Гатчина, Орлова роща, дом 1, ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Должность: заведующий лабораторией молекулярной генетики человека

E-mail оппонента: sorchelina@hotmail.com

Тел.: +7 (813) 7146093

Сайт института: <http://www.pnpi.nrcki.ru/>