

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента доктора биологических наук, профессора  
Тарабыкина Виктора Степановича  
на диссертационную работу Протасовой Марии Сергеевны  
“Генетические факторы редких форм врождённых мозжечковых  
атаксий”,  
представленную на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика**

Диссертационная работа Протасовой Марии Сергеевны посвящена исследованию генетических причин редких мозжечковых атаксий с ранним началом с применением современных методов массового параллельного секвенирования, в данной работе предложен подход, позволяющий идентифицировать генетические факторы, связанные с мозжечковыми патологиями.

В последние годы развитие технологий геномного и экзомного секвенирования открыло новые перспективы для исследования редких генетических заболеваний, в то же время появилась большая необходимость развития и усовершенствования методов биоинформатического анализа и интерпретации получаемых данных. Готовые биоинформатические конвейеры, используемые в рутинной диагностике данных массового параллельного секвенирования, позволяют в короткие сроки определить известные патогенные варианты, связанные с конкретными наследственными заболеваниями. Однако стоит отметить, что более чем в 50-70% случаев мозжечковых атаксий не удаётся выявить патогенные варианты у пациентов. Поиск и идентификация новых генетических факторов редких патологий представляет сложный многоэтапный процесс, иногда требующий нетривиальных подходов. В связи с этим диссертационная работа Протасовой Марии Сергеевны является крайне актуальной.

В работе исследуются наиболее редкие формы мозжечковых патологий: мозжечковые атаксии без когнитивных нарушений и синдром мозжечковой атаксии, умственной отсталости и квадропедии; исследование которых представляет интерес как для практического применения в диагностических целях и персонализированной медицине, так и для фундаментальной области знаний, расширяя молекулярно-генетические



представления о вкладе отдельных генов в формирование моторных и когнитивных функций в мозжечке, нарушение которых лежит в основе патогенеза заболеваний.

Диссертационная работа построена традиционным образом и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы (490 лит. источника) и приложения. Работа представлена на 206 страницах и в общей сложности, включая приложения, содержит 29 таблиц и 44 рисунка.

Во введении актуальность данного исследования полностью обоснована, поставлена цель и определены задачи исследования, изложены научная новизна и практическое значение работы. Обзор литературы детально отражает состояние науки на настоящий момент. Большое внимание уделено генетике наследственных мозжечковых атаксий, составляющих обширную группу заболеваний, включающую многочисленные клинические фенотипы. Приведены различные статистические исследования о распространённости заболеваний, подробно рассмотрены известные гены, дефекты в которых связаны с патологиями мозжечка и биологические пути, в которые они вовлечены.

В разделе “Материалы исследования” приведено подробное описание пациентов из всех исследуемых семей, в приложении приведены сравнительные таблицы клинических симптомов исследуемых индивидов. Раздел “Методы генетического анализа ДНК” написан чётко и понятно, даёт исчерпывающую информацию об используемых в работе методах. Методы, используемые в диссертационной работе, соответствуют современному мировому уровню.

Глава “Результаты” включает подразделы, в которых отдельно для каждой семьи описан генетический анализ. Полученные результаты чётко изложены и проиллюстрированы. Все редкие варианты, выявленные у исследуемых пациентов, представлены в тексте работы и таблицах. Приведены рисунки с расположением кандидатных вариантов в генах и белках, а также проиллюстрирована эволюционная консервативность и экспрессия генов. Критерии на основе, которых были отобраны кандидатные гены, чётко сформулированы. Для оценки патогенности отобранных вариантов проведён всесторонний биоинформатический анализ, проанализированы опубликованные данные о функциях генов, предсказаны структуры белков и оценена экспрессия генов в различных отделах мозга. Более того разработан подход биоинформатического поиска кандидатных генов на основе интеграции данных геномного секвенирования и “пространственно-временной” экспрессии паралогичных генов.



В диссертационной работе Протасовой Марии Сергеевны показана гетерогенность редких форм мозжечковых атаксий и выявлены новые варианты в генах, ответственных за развитие мозжечка. Проведено детальное сравнение клинических картин пациентов в исследуемых семьях с ранее описанными случаями (приведено в виде таблиц приложения). Интересно, что клиническая картина исследуемых пациентов имеет некоторые отличия от ранее описанных заболеваний, связанных с дефектами в выявленных генах, что расширяет клинический спектр этих заболеваний и, несомненно, имеет практическое значение при диагностических исследованиях.

Все ранее выявленные мутации в гене *ABCB7* приводили к нарушению трансмембранных доменов кодируемого транспортёра и вызывали сидеробластную анемию и атаксии. В отличие от ранее опубликованных случаев, выявленный в бурятской семье вариант приводит к аминокислотной замене во внутримитохондриальном домене, по предсказанию биоинформатического анализа вызывая вращение в неподвижном сайте. Случай в большой бурятской семье может являться примером того, что несмотря на делецию в белок-кодирующей области гена *ATP7A* основная функция белка остаётся сохранена, однако, в сочетании с миссенс вариантом в гене *ABCB7* может влиять на клинический фенотип, описанный у пациентов из этой семьи. Случай в бурятской семье уникален также наличием естественного нокаута ретрогена *PGAM4* у пациентов. В работе удаётся показать, что данный ген не приводит к бесплодию пациентов.

Мутации в гене *GRM1* встречаются крайне редко и могут приводить к аутосомно-доминантной спиноцереbellлярной атаксии 44-го типа с поздним началом и аутосомно-рецессивной мозжечковой атаксией 13-го типа с ранним началом и тяжёлым течением заболевания. Найденный гомозиготный миссенс вариант в гене *GRM1* приводит к аминокислотной замене в области белка, ответственной за связывание с различными аллостерическими модуляторами, и является первым случаем более лёгкого течения мозжечковой атаксией с аутосомно-рецессивной формой наследования без выраженных симптомов умственной отсталости.

В Бразильской семье с уникальным синдромом мозжечковой атаксии, умственной отсталости и квадропедии (CAMRQ) была обнаружена делеция в новом локусе гена *GRID2*. Таким образом, в работе показана молекулярно-генетическая связь редкого синдрома CAMRQ с аутосомно-рецессивной мозжечковой атаксией 18-го типа. Исследование в бразильской семье дополнено эволюционным анализом гена *GRID2*. Примечательно, биоинформатически предсказано накопление эволюционных изменений в структуре РНК начиная от человекообразных обезьян вплоть до рода *Homo*.



Наиболее заслуживающим внимания результатом диссертационной работы Протасовой М.С., является идентификация новых миссенс вариантов в генах *LRCH2* и *CSMD1*, которые ранее не были связаны с какими-либо врождёнными заболеваниями, в том числе мозжечковыми атаксиями. Оба гена высоко консервативны и экспрессируются в мозжечке и других отделах мозга. Строгое соответствие заданным в данном исследовании критериям отбора кандидатных вариантов не позволило исключить данные варианты на первом этапе анализа. Дальнейший анализ структуры белков, показал расположение найденных вариантов в функциональных высоко консервативных доменах. Затем с помощью разработанного подход основанного на “пространственно-временной” экспрессии паралогических генов была выявлена статистически значимая высокая экспрессия генов *LRCH2* и *CSMD1* в мозжечке в период онтогенеза, соответствующего развитию заболеваний в исследуемых семьях.

В следующем разделе “Обсуждения” полученные результаты сопоставляются с ранее опубликованными данными и обсуждаются различия в клинических фенотипах. В приложении приведены подробные таблицы сравнения клинических данных пациентов и всех известных мутаций, выявленных в генах *ABCB7* и *GRID2* с семьями, исследуемыми в работе. Стоит отметить, что после опубликования исследования в бурятской семье, независимый генетический анализ у гватемальского пациента подтвердил связь выявленного варианта в гене *ABCB7* с гипоплазией мозжечка. А независимое исследование опубликованное параллельно с работой диссертанта, с другим дефектом в гене *CSMD1* у пациента с симптомами мозжечковой атаксии, независимо подтверждает полученные результаты.

В заключение можно сказать, что диссертационное исследование Протасовой М. С. представляет важное прикладное значение для молекулярно-диагностических исследований нарушений развития мозжечка, планирования семьи и пренатальной диагностики, а также для дальнейших научно-фундаментальных исследований. Результаты работы детально обоснованы и не вызывают сомнений. Варианты, выявленные в работе, размещены в общедоступной базе данных ClinVar и могут быть использованы для диагностических и научно-исследовательских целей. Выводы диссертации согласуются с полученными результатами и отвечают поставленной цели и задачам исследования. Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации. Основные положения и результаты диссертационной работы опубликованы в 7 научных публикациях, в том числе в 3 статьях в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК для защиты диссертаций.

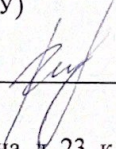


Диссертационная работа Протасовой Марии Сергеевны «Генетические факторы редких форм врождённых мозжечковых атаксий», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – «генетика», соответствует требованиям п. 9-14, установленным «Положением о порядке присуждения 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:

Директор научно-исследовательского института нейронаук  
Федерального государственного автономного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Национальный исследовательский Нижегородский  
государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (ННГУ)

профессор, доктор биологических наук

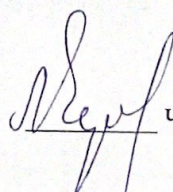
  
Тарабыкин В.С.

Адрес организации: 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, к. 7  
Телефон: 8 (831) 462-37-64  
e-mail: [info@neuro.nnov.ru](mailto:info@neuro.nnov.ru)

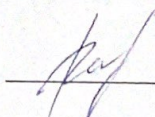
Подпись Тарабыкин В.С. заверяю:

Ученый секретарь



  
Черноморская Л.Ю.

Согласен 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.

  
Тарабыкин В.С.

4.04.2023