

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию Зыцарь Марины Вячеславовны «Аллельное разнообразие гена *GJB2* у населения ряда регионов Сибири», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

28 мая 2020 г.

Актуальность Особенностью «генетической глухоты» является уникально высокая гетерогенность ее генетического контроля – множество генов ассоциировано с возникновением этой патологии. Тем не менее, рецессивные мутации в гене *GJB2* (*gap junction protein, beta 2*, 13q11-q12), кодирующем трансмембранный белок коннексин 26 (Cx26), являются основной генетической причиной потери слуха в большинстве регионов мира. Для мутационного спектра гена *GJB2* характерна выраженная этногеографическая вариабельность: определенные мутантные аллели могут превалировать в том или ином регионе, а некоторые из них являются высокоспецифичными для определенных популяций. Анализ распространенности мутантных аллелей гена *GJB2* в разных регионах мира является актуальной задачей как для постановки генетического диагноза больным с потерей слуха, так и для решения фундаментальных научных проблем, связанных с изучением механизмов и закономерностей распространенности редких моногенных заболеваний человека. Различия в частотах редких мутантных аллелей исключительно полезны для характеристики эволюционно-исторических особенностей генофондов различных популяций.

Диссертация Зыцарь Марины Вячеславовны посвящена изучению аллельного разнообразия гена *GJB2* и выяснению механизмов распространенности этноспецифических мажорных мутаций этого гена у населения ряда регионов Сибири.

Научная новизна Ряд важных результатов был получен автором впервые:

- Оценена частота гетерозиготного носительства рецессивной мутации с.35delG у здоровых индивидуумов (преимущественно русских) из Новосибирской области. Получены свидетельства в пользу общности происхождения мутации с.35delG на территории России и в Восточной Европе.
- Получены грубые оценки «возраста» аллелей с.-23+1G>A и с.35delG, не противоречащие ранее опубликованным данным по другим популяциям; оценка времени возникновения мутации с.516G>C проведена впервые;
- На основании анализа нуклеотидных последовательностей гена *GJB2* у ряда тувинских больных установлено, что потеря слуха у этих пациентов не связана с геном *GJB2*, а обусловлена другими (генетическими или негенетическими) причинами, и эти больные являются случайными носителями мутантных аллелей этого гена.
- Впервые проведена верификация *cis*-положения вариантов с.79G>A и с.341A>G гена *GJB2* (аллель с.[79G>A;341A>G]) и получены свидетельства отсутствия его с глухотой.
- Впервые выполнен сравнительный анализ аллельного разнообразия гена *GJB2* в выборках глухих и здоровых индивидуумов из Тувы и Алтая в сравнении с с мировыми популяциями, представленными в проекте «1000 геномов»

Структура диссертации.

Диссертационная работа Зыцарь М.В. состоит из традиционных разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы, который включает 121 источник. Общий объем работы составляет 110 страниц. В работе 13 таблиц, 22 рисунка и 10 приложений.

Введение : в краткой форме изложено состояние проблемы, изучению которой посвящена диссертация, определены актуальность исследования, цель, задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Приводятся основные положения, выносимые на защиту, имеется информация об апробации и публикациях результатов исследования, личном вкладе автора.

Обзоре литературы содержит 5 глав. В нем представлена характеристика гена *GJB2*: его структура и современные данные о его аллельном разнообразии и распространенности мажорных мутаций в различных регионах мира (главы 1, 2). Глава 3 посвящена обзору литературных данных об использовании полиморфных STR- и SNP-маркеров в генетических исследованиях. В главе 4 кратко охарактеризован патогенетический вклад мутаций гена *GJB2* в этиологию потери слуха в разных регионах мира. Определенное внимание уделено проблеме диагностики в случаях, когда у пациента с нарушениями слуха выявляется только один мутантный рецессивный аллель в гене *GJB2*. В главе 5 кратко изложены основные результаты проведенных ранее исследований, направленных на определение роли мутаций гена *GJB2* в этиологии потери слуха у глухих больных и оценку частоты их гетерозиготного носительства для некоторых этнических групп Сибири, в результате которых были выявлены мажорные рецессивные мутации с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC у коренного тюркоязычного населения Южной Сибири (алтайцы и тувинцы) и мутация с.35delG - у русского населения этих регионов.

Диссертационная работа Зыцарь М.В. является логическим продолжением этих исследований, поскольку она направлена на детальное изучение распространенности мажорных рецессивных мутаций гена *GJB2* в популяциях Сибири. В работе также выясняется ассоциация некоторых вариантов последовательности гена *GJB2* с потерей слуха и проведен сравнительный анализ аллельного разнообразия гена *GJB2* в ряде популяций.

Материалы и методы . В этом разделе приводится характеристика исследуемой выборки пациентов (гомозиготы по мутациям с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC и с.35delG) и контрольных выборок. Детально описан широкий спектр современных экспериментальных молекулярно-генетических (ПЦР, аллель-специфическая ПЦР, ПЦР-ПДФ-анализ, фрагментный анализ, молекулярное клонирование, секвенирование по Сэнгеру), статистических и аналитических методов, примененных в работе.

Результаты и обсуждение состоит из 9 подразделов, в которых приводятся основные результаты, полученные в работе. Впервые для коренных жителей Тувы и Алтая и русских, проживающих на территории Сибири, получены данные о частотах аллелей ряда генетических маркеров (STRs и SNPs), окружающих ген *GJB2*, у глухих носителей мажорных мутаций с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC, с.35delG и у здоровых индивидуумов без этих мутаций. Это позволило выявить гаплотипы, специфичные для той или иной исследуемой мутации, что свидетельствует об их происхождении от предковых основателей и существенной роли эффекта основателя в широкой распространенности этих мутаций на территории Сибири. С использованием метода «молекулярных часов» был оценён возраст существования ближайшего общего предка всех носителей мутантных аллелей с.516G>C, с.-23+1G>A и с.35delG на территории Сибири.

Автором получены интересные результаты, связанные с проблемами генетического тестирования гена *GJB2* у глухих пациентов. У пациентов, имеющих только один рецессивный мутантный аллель в областях гена *GJB2*, изучаемых при рутинном анализе, при более детальном исследовании этого гена не было обнаружено дополнительных патогенетических вариантов, то есть причина потери слуха у таких пациентов не связана с геном *GJB2*. Кроме того, в работе было показано, что два варианта последовательности гена *GJB2* (с.79G>A и с.341A>G), находясь в *cis*-положении, не ассоциированы с потерей слуха. Ранее в литературе имелись противоречивые данные об ассоциации этих вариантов гена *GJB2* с глухотой. В результате детального анализа последовательности гена *GJB2* в работе впервые получены данные о частотах аллелей 69 внутригенных SNPs у тувинцев и алтайцев, а проведённый сравнительный анализ этих данных с популяциями из проекта 1000 геномов показал, что изученные выборки коренных жителей южной Сибири входят в Восточно-Азиатский кластер популяций. Эти новые данные вносят существенный вклад в характеристику эволюционно-исторических особенностей генофондов различных популяций.

Замечания

Должен отметить ряд недостатков диссертации М.В.Зыцарь:

1. Для диссертации характерно весьма вольное обращение с терминами? включая самые базовые. Возможно, это связано с традициями в узкой области? где работает автор, однако систематическое использование «мутация» вместо «мутантный аллель» приводит к появлению выражений вроде "диаллельная мутация". Если вспомнить, что мутация – это событие, в мутантный аллель - объект, возникающий вследствие мутации, то выражение "возраст мутации" становится двусмысленным и приводит к неясным рассуждениям (см. замечание 2) или "общность происхождения мутации";
2. весьма интересная часть работы, касающаяся истории появления и распространения мутантных аллелей, оказалась запутанной, поскольку расстояние (в поколениях) до ближайшего общего предка (рассчитывавшееся в работе) - это не то же самое, что и расстояние до организма, в котором эта мутация произошла
3. В разделе "Материалы и методы"(стр. 37 диссертации) в заключительном параграфе встречается без пояснений выражение "Матрица дистанций /// представлена евклидовыми расстояниями дистанции и евклидовы расстояния - между чем и чем? и как их вычисляли?"

Высказанные замечания носят в основном редакционный характер и не умаляют научного значения представленной работы.

Заключение

Диссертационная работа Зыцарь М.В. является законченным исследованием, выполненным на высоком научном и методическом уровне. Результаты диссертационной работы, существенная часть которых получена впервые, были представлены на различных конференциях и съездах, в том числе и международных, и опубликованы в рецензируемых журналах из списка ВАК, что свидетельствует о достоверности полученных автором данных. Заключение и выводы, сделанные по результатам работы, обоснованы и полностью соответствуют задачам, поставленным в исследовании. Автореферат соответствует основному содержанию диссертации. Научно-практическая значимость диссертационной работы не вызывает сомнений, поскольку данные об аллельном разнообразии гена *GJB2* в популяциях коренного населения ряда регионов Сибири вносят существенный

вклад в характеристику их генетической структуры, а информация о накоплении определенных мутаций гена *GJB2* у коренного населения Сибири актуальна для разработки специфичной ДНК-диагностики наследуемой глухоты в этом регионе. Исходя из всего вышеизложенного, я считаю, что диссертационная работа Зыцарь М.В. «Аллельное разнообразие гена *GJB2* у населения ряда регионов Сибири», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.07 – генетика», полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Зыцарь Марина Вячеславовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.07. – генетика».

Официальный оппонент
заведующий лабораторией геносистематики
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Лимнологического института
Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН)

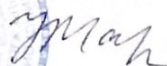
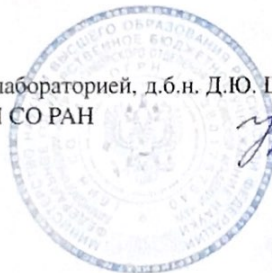
доктор биологических наук



Щербаков Дмитрий Юрьевич

640033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел. +79248330122
E-mail: sherb@lin.irk.ru

Подпись заведующего лабораторией, д.б.н. Д.Ю. Щербакова
Ученый секретарь ЛИН СО РАН



ЗАВЕРЯЮ.
к.б.н. Максимова Н.В.