

Отзыв официального оппонента

На диссертационную работу Гоглевой Анны Анатольевны **«Исследование CRISPR-систем прокариотического иммунитета методами сравнительной геномики»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – «математическая биология, биоинформатика»

Диссертационная работа А.А. Гоглевой решает задачи, связанные с оценкой многообразия CRISPR-систем бактерий, входящих в состав микробиоты кишечника человека. Объектом исследования в данной работе являются общедоступные данные трех метагеномных проектов, представленные в виде сборки (контигов) первичных чтений нуклеотидной последовательности ДНК. Стоит отметить, что с развитием технологий высокопроизводительного секвенирования в исследованиях природных биотопов человека – кожи, слизистых дыхательных путей, урогенитального тракта, кишечника, преобладают метагеномные подходы, основанные на единовременном считывании всей совокупности генетической информации, представленной в образце, с последующим её анализом. Адекватная обработка данных, получаемых в ходе метагеномных проектов, требует разработки специализированных алгоритмов и подходов, позволяющих извлекать биологически значимую информацию, что свидетельствует об актуальности поставленных в рамках диссертационной работы задач. Стоит отметить также актуальность объекта исследования - CRISPR-CAS системы, которая по своей биологической функции являются своего рода «иммунной» системой бактерий, и модификации которой сейчас активно используют для редактирования генома.

Диссертационная работа А.А. Гоглевой придерживается привычного глазу академического стиля изложения и содержит главы «Введение», «Обзор литературы», методическую часть «Данные и алгоритмы», «Результаты и обсуждение». В отдельную главу «Гипотезы и перспективы» автор вынесла обсуждение собственных, подчас спекулятивных находок, в свете сегодняшнего состояния мировой науки в области анализа метагеномных данных, вообще, и поиска в них фрагментов CRISPR-Cas систем бактерий, в частности. Надо сказать, что прочитала я эту главу с большим удовольствием, хотя не увидела смысла отрывать её от общего обсуждения полученных в исследовании результатов. Вся рукопись изложена очень лаконично, она представлена на 101 странице, иллюстрирована 17 рисунками и 7 таблицами, список цитируемых источников содержит ссылки на 162 печатные работы.

Во введении автор дает оценку актуальности объекта исследования, степени проработанности выбранной тематики мировым научным сообществом, формулирует цель и задачи собственной диссертационной работы, научную новизну и практическую значимость достигнутых результатов, а также положения, выносимые на защиту. Здесь сразу отмечу несколько неудачных формулировок - «исследование динамики спейсеров» и «контиги отнесены к типу Firmicutes», интерпретацию которых хочется услышать от автора.

Обзор литературы написан хорошим языком и легко читается. Порадовало то, что он совершенно не перегружен лишней информацией. В первой части обзора достаточно полно суммированы накопленные на сегодняшний день знания о структуре и функции CRISPR-Cas системы бактерий, включая описание подтверждающих экспериментов. Порадовал спокойный стиль изложения материала, без излишней эмоциональности. Вторая часть обзора посвящена исследованиям микробиома человека, в первую очередь методами метагеномного анализа. Здесь не обошлось без

эффектных утверждений, что «человек – это суперорганизм и конгломерат» и что «изучить истинное видовое разнообразие микробиома стало возможно только с развитием метагеномного подхода и техник высокопроизводительного секвенирования», но в остальном автор была максимально корректна и постаралась полно отобразить основные подходы и направления научной мысли в исследованиях природных биотопов человека. Последняя часть литературного обзора является объединяющей два направления, логично подводя к решаемым в рамках диссертационной работы задачам.

Традиционная глава «материалы и методы» в работе А.А. Гоглевой носит название «Данные и алгоритмы», что, несомненно, значительно более точно отражает суть процесса. В этой главе дана исчерпывающая характеристика объектов исследования, коими являются открытые данные метагеномных проектов, и программных продуктов, используемых в диссертационной работе для их анализа. Из замечаний стоит отметить, что разделы 2.2.1 «Идентификация CRISPR-кассет, процедура фильтрации» и 2.2.4 «Определение происхождения спейсеров (поиск протоспейсеров)» содержат избыточную информацию, касающуюся уже полученных автором результатов, что отвлекает читателя от бесстрастного понимания применяемых алгоритмов поиска.

Фактические достижения диссертационной работы и их место в мировой науке изложены в главах «Результаты и обсуждение» и «Гипотезы и перспективы». Как я уже говорила выше, для меня не очевидна логика именно такой компоновки, но общему пониманию объема проделанной работы это не мешает. Хочу сразу отметить, что мне совершенно не знакомы тонкости работы используемых для отбора CRISPR-кассет алгоритмов, и, думаю, постичь я их не сумею. С позиции здравого смысла, примененный автором подход к формированию списка надежно предсказанных кассет выглядит адекватным. Уникальность набора кассет внутри каждого

метагеномного проекта также не вызывает удивления. Несколько смущает факт тотального доминирования уникальных последовательностей спейсоров как в метагеномных проектах, так и в индивидуальных метагеномах, их составляющих. Особенно, в свете сходного таксономического состава бактерий-носителей CRISPR-кассет, что кажется мне важной находкой этого исследования. С биологической точки зрения интересен отмеченный автором диссертационной работы факт, что в метагеномном проекте по тестированию здоровых японцев распределение основных таксономических категорий контигов, содержащих CRISPR-кассеты, отличается от распределения основных таксономических категорий всех контигов по данным анализа генов 16S рРНК тех же метагеномных данных. Хотя в выводы автор вынесла данные по двум другим метагеномным проектам, в которых эти категории совпали.

Проведенные в дальнейшем автором типирование обнаруженных CRISPR-Cas систем, поиск протоспейсоров и анализ их встречаемости в метагеномах еще больше продемонстрировали недостаточность современных знаний о формировании бактериального и вирусного разнообразия микробиома человека. Наблюдаемое небольшое число общих спейсоров между индивидами, даже принадлежащими к одной семье, свидетельствует об уникальности цепи событий, приводящих к формированию набора спейсоров в CRISPR-кассете, индивидуального для каждого конкретного микробиома.

В целом, результаты диссертационной работы А.А. Гоглевой, решая конкретные задачи, раскрывают огромные пласты неисследованных процессов, давая пищу для последующих изысканий, что прекрасно изложено автором в главе «Гипотезы и перспективы».

Сделанные на основании полученных данных выводы обоснованы и согласуются с поставленными задачами.

Существенных замечаний к работе у меня нет, скорее комментарий. Как причину наблюдаемых отличий таксонов, доминирующих по содержанию CRISPR кассет, от таковых, рассчитанных на основании представленности генов 16S рНК, автор приводит два источника счетных ошибок: различия в копийности гена 16S рНК (число копий гена может варьировать от 1 до 15 в зависимости от вида) и разная эффективность амплификации генов 16S рНК разных таксонов при использовании универсальных праймеров. Последний аргумент не применим в настоящем исследовании, поскольку в работе использовались данные метагеномных проектов, полученные shotgun секвенированием.

Таким образом, диссертационная работа Гоглевой А. А. актуальна, проведена на большом объеме фактического материала и представляет статистически достоверные результаты. Очевидно, что биоинформатическая часть диссертационной работы выполнена автором самостоятельно, на высоком профессиональном и научном уровне с использованием современных аналитических алгоритмов. Достоверность и новизна результатов подтверждена статьями, опубликованными в российских и международных рецензируемых научных журналах. Полученные результаты и выводы хорошо обоснованы, достаточно четко и ясно изложены. Рисунки и таблицы аккуратно оформлены и служат хорошим иллюстративным материалом. Таким образом, научная ценность диссертационной работы и квалификация автора как исследователя не вызывает сомнения.

Диссертационная работа Гоглевой А.А. «Исследование CRISPR-систем прокариотического иммунитета методами сравнительной геномики», является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, которая по своей актуальности, научной новизне, практической значимости и методическому уровню полностью удовлетворяет требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября

2013 г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016 г., №478 от 02.08.2016 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Гоглева А.А., несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 «математическая биология, биоинформатика».

Ильина Елена Николаевна,

30.01.2018

доктор биологических наук, профессор РАН,

заместитель генерального директора по научной работе

ФГБУ ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА России

119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а;

тел. +7(499)2450471

ilinaen@gmail.com

Подпись Ильиной Е.Н. заверяю

ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России,

к.б.н.



Васильева Л. Л.