



МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»  
(БФУ им. И. Канта)

«02» февраля 2017 г.

г. Калининград

№ 01/23-152

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор ФГАОУ ВО «БФУ им.И.Канта»

д.полит.н., проф. А.П.Клемешев



## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности диссертации Гоглевой Анны Анатольевны на тему «Исследование CRISPR-систем прокариотического иммунитета методами сравнительной геномики», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика.

Состав микробиоты кишечника человека, а также взаимоотношения между различными группами микроорганизмов и их вирусами оказывают серьезнейшее влияние на здоровье человека и качество жизни. В течение первой декады XXI столетия, в результате огромного технологического прорыва, связанного с появлением систем высокопроизводительного секвенирования, мировое научное сообщество в полной мере оценило масштаб таксономического и метаболического разнообразия некультивируемой фракции микробных сообществ кишечника. Помимо прокариотических и эукариотических микроорганизмов огромный вклад в функционал микробиоты кишечника вносят вирусы, контролирующие баланс численности отдельных таксонов. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук А.А.Гоглевой

посвящена исследованию CRISPR-систем прокариотического иммунитета микробиоты кишечника человека, позволяющих микробам «узнавать» повторную вирусную инфекцию. Целью работы А.А.Гоглевой является получение новой информации об эволюционной динамике CRISPR-систем микробиоты кишечника человека.

Используя в качестве объекта исследования три метагеномные коллекции кишечника человека (две из которых анализируются впервые) для достижения поставленной цели автор решает следующие задачи: идентификация, определение типа и таксономической принадлежности CRISPR-кассет, определение источника спейсеров (поиск протоспейсеров) и сравнение CRISPR-кассет, повторов и спейсеров между разными индивидуальными метагеномами и целыми метагеномными коллекциями микробиомов человека.

Цели и задачи диссертации сформулированы четко и в полной мере отражают тему работы.

Диссертационная работа построена по традиционному плану, содержит введение, четыре главы (обзор литературы, данные и алгоритмы, результаты и обсуждение, гипотезы и перспективы), заключение и выводы. Общий объем рукописи составляет 101 страницу. Работа иллюстрирована 17 рисунками и 7 таблицами. Библиографический список содержит 162 наименования.

Обзор литературы разделен на две части. В первой автором рассмотрены основные принципы классификации CRISPR-кассет, молекулярные механизмы, лежащие в основе работы CRISPR-систем, и их функционал. Вторая часть обзора посвящена выбранному объекту исследования – микробным сообществам кишечника человека, в частности, их видовому составу, взаимосвязи вариаций видового состава с возрастом и различными заболеваниями, функции генов микробиома. Отдельный подраздел посвящен имеющимся в литературе данным по исследованию CRISPR-систем микробиома человека.



Раздел «Данные и алгоритмы» во многом соответствует классическому разделу «Материалы и методы». Он включает описание используемых в работе массивов данных, в частности, источник биоматериала, описание проектов, в рамках которых проводилось секвенирование, технологию секвенирования и сборки метагеномных контигов. Подраздел «Идентификация и анализ CRISPR-кассет» включает детальное обоснование выбора используемых алгоритмов, методику фильтрации ложноположительных результатов, статистические методы анализа полученных результатов.

Раздел «Результаты и обсуждение» включает подразделы, соответствующие задачам исследования.

Основные результаты диссертации изложены в семи печатных работах, из них три – статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и четыре — тезисы в материалах конференций. Основные положения, выносимые на защиту, сформулированы четко.

В диссертационной работе проанализирован значительный массив экспериментальных данных. Проанализировано 139 индивидуальных «полных» метагеномов и 9 индивидуальных виромов, суммарной длиной контигов 4531 и 383 м.п.н., соответственно. Использование автором нескольких альтернативных алгоритмов поиска CRISPR-кассет, а также строгие параметры фильтрации результатов как на этапе идентификации CRISPR кассет, так и на этапе определения их таксономической принадлежности дают основания утверждать, что полученные результаты являются достоверными.

**Актуальность.** Иммунные системы прокариот CRISPR в настоящее время являются не только интереснейшим объектом фундаментальных исследований, но также лежат в основе создания одних из самых востребованных биоинженерных решений – систем редактирования генома. В этом контексте особый интерес представляет исследование CRISPR-систем некультивируемых

микробных сообществ, в частности – микробиоты кишечника человека. Разнообразие микробного сообщества кишечника очень велико и составляет не менее 600 родов. Весьма вероятно, что значительный вклад в поддержание баланса между различными таксономическими группами сообщества кишечника осуществляется за счет вирусов бактерий, препятствующих бесконтрольному размножению отдельных видов-оппортунистов. В свою очередь, размножению вирусов препятствуют в том числе системы адаптивного прокариотического иммунитета CRISPR-Cas. В составе CRISPR-кассет отдельный интерес представляют последовательности спейсеров, представляющие собой «отпечаток» более ранних вирусных инфекций микроорганизма. Имея данные о порядке и последовательности спейсеров, можно смоделировать эволюционную динамику состава микробиоты кишечника человека. В диссертационной работе А.А.Гоглевой на основе детального анализа CRISPR-кассет, идентифицированных в метагеномных контигах делаются достоверные выводы о ретроспективной динамике вирусных инфекций микроорганизмов, населяющих кишечник человека. Полученные данные имеют не только фундаментальный интерес, но также могут иметь значения для разработки и оптимизации протоколов фаготерапии кишечных инфекций.

Исходя из этого можно заключить, что и методическая составляющая, и полученные результаты в диссертационной работе А.А.Гоглевой являются актуальными и имеют перспективу для практического применения.

**Научная новизна и значимость полученных результатов.** В диссертационной работе А.А.Гоглевой проанализирован состав CRISPR-кассет трёх метагеномных коллекций кишечника человека, двух из них — впервые. Была предпринята попытка определить таксономическое положение и тип CRISPR-Cas систем. Для 40% кассет не удалось определить таксономию и тип системы, что говорит об уникальности идентифицированных систем. Полученный результат, несомненно, имеет важное прикладное значение. В настоящее время на основе CRISPR-



системы II типа разработаны эффективные технология внесения направленных модификаций в геномы широкого спектра организмов, как прокариот, так и эукариот. Тем не менее, мировым научным сообществом постоянно предпринимаются попытки повысить эффективность таких систем, в первую очередь, используя новые, как правило, скудно описанные варианты *crispr-associated* белков. Потенциально, те кассеты, для которых не удалось определить тип системы, являются кандидатами на тестирование в плане их применимости в системах редактирования генома.

Также автором диссертационной работы проанализировано распределение спейсеров и протоспейсеров по индивидуальным метагеномам, и исследована динамика функционально важных классов спейсеров. Показано, что наибольшее количество «общих» спейсеров обнаружено в «детских» микробных сообществах: для пар индивидов F2X-F2Y (брат и сестра из одной семьи) и F2X-INM (не связанные между собой мальчик трех лет и девочка четырех месяцев), тогда как с повышением возраста индивидов «общих» спейсеров становилось все меньше. Это, а также описанный автором «эффект отталкивания» спейсеров и протоспейсеров свидетельствует, прежде всего, о крайне высокой динамике включения и исключения новых спейсеров в кассету. Более того, автор делает предположение о возможности использования состава CRISPR-кассет как нового инструмента для идентификации личности в криминалистических целях.

**Рекомендации по использованию результатов диссертации.** Полученные результаты могут быть использованы при чтении спецкурсов на биологических и биоинформатических факультетах ВУЗов, на курсах повышения квалификации биологов и/или медицинских работников. Также, полученные автором результаты и отработанные методические подходы могут служить базисом для проведения последующих исследований по динамике взаимодействий между вирусами и микробами, населяющими кишечник человека. Несомненно, отдельный интерес представляют дополнительные структурно-функциональные

исследования новых CRISPR-ассоциированных белков, идентифицированных автором в составе CRISPR-кассет. Исследования такого рода проводятся в Институте биологии гена РАН, Институте молекулярной генетики РАН, Институте молекулярной биологии РАН, Институте общей генетики РАН, ФИЦ «Биоинженерия» РАН, а также в научных подразделениях многих федеральных университетов.

**Общие замечания.** В качестве замечания можно отметить недостаточно подробные подписи к рисункам и таблицам. Так, практически все рисунки раздела «Обзор литературы» не содержат дополнительных пояснений, хотя в целом в научной литературе принято давать подробные подписи к рисункам вне зависимости от их наглядности. В Таблице 1, «характеристика проанализированных наборов метагеномных данных», отсутствуют ссылки на сами массивы данных, так и на метагеномные сборщики (несмотря на то, что, как и в предыдущем случае, эта информация имеется в тексте).

Кроме того, в рукописи присутствуют некоторые стилистические огрехи, связанные, как правило с не общепринятым переводом английских терминов. Так, к примеру, английский термин sequencing read, как правило, переводится на русский как «прочтение». Используемый автором термин «чтение» практически не встречается в русскоязычной литературе.

Также стоит отметить, что автор в своей работе не учитывает покрытия (coverage) используемых им контигов для того, чтобы установить взаимосвязь типа кассет и/или спейсеров с относительной представленностью (abundance) их хозяина. Анализ такой взаимосвязи был бы весьма интересен. Однако не исключено, что отсутствие такого анализа связано с тем, что информация о покрытии не присутствовала в используемых автором массивах данных.

Тем не менее, сделанные замечания ни коим образом не снижают научной ценности диссертационной работы А.А.Гоглевой.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Анны Анатольевны Гоглевой на тему «Исследование CRISPR-систем прокариотического иммунитета методами сравнительной геномики» является законченной научно-исследовательской работой, выполненной на высоком научном уровне, сделанные выводы обоснованы, базируются на большом экспериментальном материале, который был корректно интерпретирован. Автореферат в полной мере отражает основные положения диссертации. По актуальности темы, научному уровню и теоретической значимости результатов диссертация отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика.

Отзыв обсужден на заседании научного семинара лаборатории геномики микроорганизмов Института Живых Систем БФУ им. Иммануила Канта (Протокол №26-01-17 от «26» января 2017 г.).

### *Отзыв подготовил:*

Зав. лабораторией геномики микроорганизмов ИЖС БФУ им.И.Канта

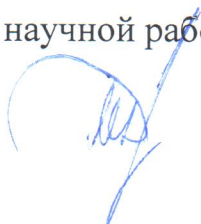
к.б.н.



С.В.Гошаков

***Подпись заведующего лабораторией геномики микроорганизмов ИЖС БФУ им.И.Канта, кандидата биологических наук Степана Владимировича Тошакова заверяю***

Директор департамента по научной работе БФУ им.И.Канта



М.В.Демин