

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.077.04
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА ПРОБЛЕМ ПЕРЕДАЧИ
ИНФОРМАЦИИ ИМ. А.А. ХАРКЕВИЧА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета
от 16 октября 2017, протокол № 12

о присуждении Шмакову Сергею Анатольевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Разработка биоинформатического подхода для поиска новых CRISPR-Cas систем» по специальности 03.01.09 – Математическая биология, биоинформатика, принята к защите 24 июля 2017 года, протокол № 8 диссертационным советом Д 002.077.04 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук (127051, г. Москва, Большой Каретный переулок, д. 19, стр. 1., приказ о создании № 978/нк от 16 декабря 2013 года).

Соискатель Сергей Анатольевич Шмаков, гражданин Российской Федерации, 1984 года рождения, в 2008 году окончил факультет «Информатика и вычислительная техника» Московского государственного технического университета им. Н.Э. Баумана, по специальности «Информационное и программное обеспечение вычислительных систем».

Диссертация выполнена в Центре по системной биомедицине и биотехнологии автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий».

Научные руководители

Константин Викторович Северинов, доктор биологических наук, профессор, директор «Центра по системной биомедицине и биотехнологии» автономной

некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий».

Евгений Викторович Кунин, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Национального центра биотехнологической информации Национальной медицинской библиотеки Национальных институтов здравоохранения США.

Официальные оппоненты:

1. Ольга Николаевна Озолинь, гражданка РФ, доктор биологических наук, заведующая лабораторией функциональной геномики и клеточного стресса Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биофизики клетки» Российской академии наук;
2. Илья Валерьевич Кубланов, гражданин РФ, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией метаболизма экстермофильных прокариот Федерального государственного учреждения Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Институт химической биологии и фундаментальной медицины” Сибирского отделения Российской академии наук – дала **положительное** заключение, подписанное кандидатом химических наук Павлом Ефимовичем Пестряковым, учёным секретарём ИХБФМ СО РАН. В отзыве содержится высокая оценка научного уровня выполненной работы.

Указывается, что в диссертации описаны шесть новых CRISPR-Cas систем. Предложены различные варианты биотехнологического применения открытых CRISPR-Cas систем, в том числе при работе с молекулами РНК. Описано разнообразие CRISPR-Cas систем в прокариотах: показано доминирование II типа среди второго класса CRISPR-Cas систем, показано почти полное отсутствие второго класса CRISPR-Cas систем в археях, описана роль горизонтального переноса в распространении этих систем.

Предложена обновлённая классификация CRISPR-Cas систем второго класса, включающая шесть открытых в работе подтипов. Предложена гипотеза независимого происхождения CRISPR-Cas систем из мобильных элементов и описаны эволюционные сценарии возникновения II, V, VI типов CRISPR-Cas Систем.

Важным достижением этой работы является то, что полученные результаты могут быть использованы для развития биотехнологий, что подтверждается использованием данных диссертации другими авторами, описывающими применение найденных CRISPR-Cas систем для задач высокоспецифичного детектирования РНК, специфического контроля экспрессии генов и специфичного слежения и визуализации РНК в живых клетках. Кроме того, результаты работы могут стать основанием для дальнейших исследований защитных систем прокариот, в том числе исследований по эволюции данных систем. Отдельный интерес представляют открытые системы, которые были проклассифицированы автором как тип V-U, вследствие того, что их изучение может дать данные о эволюционном развитии CRISPR-Cas систем.

Соискатель имеет 12 статей в международных рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК, из них **4 статьи** по теме диссертации, общим объемом 90 страниц.

Статьи по теме диссертации:

1. **Shmakov S**, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Makarova KS, Wolf YI, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. Diversity and evolution of Class 2 CRISPR-Cas systems. // Nature Reviews Microbiology. – 2017. – Т. 15. – № 3. – С. 169-182.
2. Smargon AA, Cox DB, Pyzocha NK, Zheng K, Slaymaker IM, Gootenberg JS, Abudayyeh OA, Essletzbichler P, **Shmakov S**, Makarova KS, Koonin EV, Zhang F. Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28. // Molecular cell. – 2017. – Т. 65. – № 4. – С. 618-630.
3. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DB, **Shmakov S**, Makarova KS, Semenova E, Minakhin L, Severinov K, Regev A, Lander ES, Koonin EV, Zhang F. C2c2 is a

single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. // Science. – 2016. – Т. 353. – С. 6299.

4. **Shmakov S**, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. // Molecular Cell – 2015. – Т. 60. – № 3. – С. 385-97.

Вклад диссертанта в опубликованные работы по теме диссертации состоит в непосредственном планировании исследований, участии в формулировках задач, теоретической разработке и практической реализации методов, сборе, обработке и анализе данных. В двух журнальных публикациях по теме диссертации диссертант является первым автором.

На диссертацию поступило 6 отзывов, из них 3 отзыва на автореферат, все **отзывы положительные**. В отзывах указывается, что не вызывает сомнений актуальность темы рассматриваемой диссертации, а также научная и практическая ценность работы. Диссертация является законченной квалификационной работой, выполненной автором самостоятельно на высоком научном уровне.

Исследования являлись новыми на момент публикации, их достоверность подтверждена последующими работами. Результаты, полученные автором, являются новыми научными знаниями по специальности «03.01.09 – математическая биология, биоинформатика».

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что за последние годы ими было опубликовано большое количество научных работ по молекулярной биологии прокариот, в том числе с применением биоинформатических методов.

В отзыве оппонента Озолинь Ольги Николаевны, доктора биологических наук, заведующей лабораторией функциональной геномики и клеточного стресса Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биофизики клетки» Российской академии наук отмечены достоинства диссертации, а также отмечен ряд недочетов.

1. В обзоре литературы отсутствует раздел, посвящённого анализу биоинформатических методов, используемых для поиска CRISPR-Cas систем, перспективам дальнейшего поиска и

закономерно возникающих при этих проблемах. Это является недочётом в связи с тем, что биоинформатический поиск и анализ являются главными составляющими данной работы.

2. Имеется недочёт в методе поиска, а именно отсеивание белков, содержащих трансмембранные домены. В обоснование указано на наличие белков с трансмембранным доменом в системах VI-V1. Таким образом, необоснованно сужено пространство поиска.
3. Наличествует большое число текстуальных погрешностей и приводятся примеры. Указано, что это затрудняет понимание текста диссертации.

В отзыве говорится, что Шмаков Сергей Анатольевич заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – "Математическая биология, биоинформатика".

В отзыве оппонента Кубланова Ильи Валерьевича, кандидата биологических наук, заведующего лабораторией метаболизма экстремофильных прокариот Федерального государственного учреждения Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук имеется ряд общих замечаний:

1. Главное замечание – это стиль изложения и многочисленные орфографические и пунктуационные ошибки, которые приводят к трудностям понимания диссертации. В отзыве приведены конкретные примеры.
2. Приведены примеры некорректного использования терминов в диссертации.
3. Указано, что автор недостаточно четко разделил свою часть и последующие работы, а именно, то, что экспериментальная проверка не является частью этой работы.
4. В ряде мест автор неоднозначно или без разъяснения приводит свои наблюдения, вследствие чего сложно понять, что имеется в виду.
5. Описание эволюционных сценариев происхождения CRISPR-Cas систем второго класса излишне категорично.

Несмотря на длинный ряд замечаний, в отзыве говорится, что “все вышеперечисленные вопросы и замечания не снижают научного значения данного исследования”, а также, что “нет никаких сомнений, что диссертационная работа Шмакова С.А. на тему «Разработка биоинформатического подхода для поиска новых CRISPR-Cas систем» является актуальной и содержит новые научные результаты. Диссертация представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития не только биоинформатики, но и многих других областей биологии, таких как микробиология, эволюционная биология, молекулярная биология, а также медицины и биотехнологии. Диссертация соответствует требованиям, изложенным в действующем «Положении о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013), а ее автор, Шмаков Сергей Анатольевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика.”

В отзыве на автореферат Дмитрия Иосифовича Фришмана, кандидата биологических наук, профессора Технического Университета Мюнхена (Германия) отмечено, что «актуальность работы, представленной в автореферате, подтверждается интересом со стороны научного сообщества: на данный момент три из шести систем экспериментально охарактеризованы, для двух белков сделана кристаллическая структура и для типа VI-A экспериментально представлены практические подходы для использования её в качестве детектора или регулятора РНК молекул. Автореферат детально излагает полученные результаты используя большое количество графических пояснений.». Дана положительная оценка работе: «Описанные методы и результаты не вызывают сомнений. Высокое качество работы подтверждается четырьмя публикациями в ведущих международных журналах (суммарный импакт-фактор 90), из которых в двух соискатель является первым автором».

В отзыве на автореферат Сергея Юрьевича Нечаева, кандидата биологических наук, профессора Медицинской Школы Университета Северной Дакоты (США) перечислен ряд замечаний: “Несмотря на высокий

уровень работы, нельзя не упомянуть несколько замечаний. В частности, одним из выводов работы является предложение вариантов применения открытых CRISPR/Cas систем. Я считаю, что выводом собственно работы это можно считать лишь с натяжкой, так как это является только лишь элементом дискуссии, хотя и, без сомнения, интересным... Другой недостаток данной работы или, по крайней мере, автореферата, это то, что в тексте присутствуют стилистические ошибки и погрешности.” В целом работе дана положительная оценка: “Указанные замечания ни в коей мере не снижают общей ценности диссертационной работы и не влияют на теоретические и практические её результаты. Ознакомившись с работой, я был бы рад видеть кандидата такого высокого уровня в моей лаборатории.”

В отзыве на автореферат Елизаветы Александровны Бонч-Осмоловской, доктора биологических наук, заведующей лабораторией гипертермофильных микробных сообществ и заместитель директора Института микробиологии РАН не указано значимых замечаний и дана высокая оценка работе.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработан и применён метод поиска новых CRISPR-Cas систем второго класса:

впервые показаны и описаны шесть новых подтипов CRISPR-Cas систем второго класса, не являющиеся подсемействами открытых ранее комплексов:

изучено разнообразие CRISPR-Cas систем второго класса и **показано** доминирование второго типа CRISPR-Cas систем во втором классе, практическое отсутствие второго класса систем в археях, роль горизонтального переноса в распространении CRISPR-Cas систем второго класса:

предложены обновлённая классификация CRISPR-Cas систем второго класса, обновлённая гипотеза независимого происхождения CRISPR-Cas систем второго класса, а также предлагаются варианты применения новых систем в биотехнологических задачах.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

впервые был проведён анализ частично собранных геномов и метагеномов с целью поиска новых CRISPR-Cas систем и были **открыты** новые варианты CRISPR-Cas систем;

показано и изучено распространение CRISPR-Cas систем в прокариотах и роль горизонтального переноса в этом распространении;

предложена обновлённая классификация CRISPR-Cas систем второго класса и систематические наименования генов эффекторных комплексов;

предложены гипотезы эволюционных сценариев развития CRISPR-Cas систем второго класса предполагающие независимое происхождение этих систем из мобильных элементов.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

открыты новые белки CRISPR-Cas, которые могут быть использованы для биотехнологических задач, были предложены варианты применения открытых белков. Белки и предложения по применению были использованы и опубликованы независимыми лабораториями на практике и подтверждено предложенное применение Cas13 для высокоспецифичной детекции РНК молекул, специфичного контроля экспрессии РНК молекул в клетках эукариот, специфичной локализации РНК молекул в живых клетках.

Свидетельства достоверности результатов исследования:

- в работе дано детальное описание найденных белков новых CRISPR-Cas систем, включая доменную архитектуру;

- три из шести комплексов были экспериментально подтверждены независимыми лабораториями и было показано, что они являются полноценными CRISPR-Cas системами;

- кристаллическая структура для двух открытых комплексов была разрешена независимыми лабораториями;

- представлены данные о разнообразии CRISPR-Cas систем второго класса.

Личный вклад соискателя состоит в планировании исследований, участии в постановке задач, теоретической разработке и практической реализации методов, анализе данных и написании статей. Результаты, описанные в диссертации, получены автором самостоятельно. В диссертации

решены задачи, имеющие значение для развития исследований функционирования и эволюции защитных систем прокариот и предложены методы развития биотехнологической отрасли. По своему содержанию диссертация отвечает паспорту специальности 03.01.09 – Математическая биология, биоинформатика.

Диссертационный совет пришёл к выводу о том, что диссертация представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, имеющую теоретическое и практическое значение для медицины и биотехнологии. По актуальности, новизне, практической значимости диссертация соответствует требованиям, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2014 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

На заседании 16 октября 2017 года диссертационный совет принял решение присудить Шмакову Сергею Анатольевичу ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – Математическая биология, биоинформатика.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 10 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, проголосовали за - 17, против - 0, недействительных бюллетеней - 0

Председатель

диссертационного совета Д 002.077.04

д.б.н., профессор



М.С. Гельфанд

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 002.077.04

д.б.н., профессор

Рожкова

Г.И. Рожкова

16 октября 2017 г.