

**ОТЗЫВ официального оппонента**  
**на диссертацию на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук Хорошкина Матвея Сергеевича**  
**на тему: «Реконструкция регулонов метаболических путей в бактериях**  
**микробиоты кишечника человека»**  
**по специальности 03.01.09 – «математическая биология, биоинформатика»**

Особенностью современной биологии является стремительный рост объема геномных данных, отражающих популяционный состав природных сообществ микроорганизмов и функциональный потенциал каждого из них, а, с другой стороны, не менее бурное развитие биоинформатических методов их анализа, обеспечивающих извлечение информации из результатов, полученных с помощью различных «омиксных» технологий. Это уникальное сочетание доступности «больших данных» и инструментов их анализа позволяет выявлять не только ожидаемые, но и трудно прогнозируемые закономерности. Чрезвычайно востребованной уже давно стала характеристика метаболического потенциала природных микробных сообществ, направленная на поиск полезных для практического использования ферментативных активностей, а реконструкция регуляторных геномных сетей, контролирующих разные метаболические пути открывает новые перспективы для промышленной биотехнологии. Работа Матвея Сергеевича представляет собой яркий пример такого исследования, выполненного в трёх проекциях. Во-первых, изучены механизмы регуляции генной экспрессии факторами транскрипции одного, но наиболее распространённого семейства LacI. Во-вторых, реконструированы регулоны многих факторов транскрипции, контролирующих метаболизм углеводов, но только для бифидобактерий, представители которых входят в состав большинства пробиотиков. В-третьих, изучена одна группа метаболических путей, отвечающих за синтез витаминов группы В, но у многих бактерий микробиома кишечника.

Диссертационная работа содержит Введение, Обзор литературы, три главы, отражающие результаты биоинформатического анализа в трёх проекциях, Выводы, список опубликованных по теме диссертации статей, а также списки использованных сокращений и использованной литературы. Кроме этого, в диссертации есть три объёмных Приложения, содержащих использованную информацию о метаболических путях биосинтеза витаминов и распределение фенотипов по витаминам группы В для представителей кишечного микробиома. Каждая из результативных глав включает описание использованных для анализа методов, а также разделы «Результаты» и «Обсуждение». Работа изложена на 149 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы и иллюстрирована 22 рисунками (не считая рисунки, помещённые в Приложения). В Списке процитированной литературы указано 230 ссылок.

Во **Введении** отражена **Актуальность** изучения метаболических путей и регуляторных систем у бактерий кишечного микробиома человека, отмечена перспективность таких исследований для коррекции естественных дисбалансов, возникающих в кишечной микрофлоре и обсуждены достоинства методов сравнительной геномики, позволяющие относительно быстро получить ценную информацию. Во Введении адекватно отражена

степень разработанности темы диссертационного исследования, сформулированы его цели и задачи, а также научная новизна полученных результатов и их практическая значимость. Некоторое недоумение вызывает перечень выносимых на защиту положений. Он включает 11 утверждений, из которых только 6 представляют собой выводы из анализа полученных данных, одно утверждение сформулировано в виде предположения, а 4 являются констатацией проделанной работы, отражающей её масштабность и комплексность.

Основной акцент в **Обзоре литературы** сделан на презентации функциональной геномики, как мощного инструмента для изучения фенотипических свойств биологических объектов на основе их генетической информации и обсуждении «регуломики», как инструмента, необходимого для моделирования путей реализации геномного потенциала в разных условиях. В соответствии с этим, большая часть обзора посвящена обсуждению методов вычислительной биологии и сравнительной геномики, эффективно используемых для реконструкции регуляторных генных сетей и клеточных метаболических путей. Кроме этого, первый раздел содержит базовую информацию о процессе бактериальной транскрипции, как таковом, и о способах его регуляции факторами транскрипции. В конце обзора есть разделы, кратко суммирующие информацию о биологии бифидобактерий, включая их углеводный метаболизм и практику использования этих бактерий в качестве пробиотиков. В двух последних разделах обсуждается происхождение семейства транскрипционных факторов LacI и роль метаболизма витаминов группы В в формировании структуры микробиома. Обзор соответствует сути диссертационной работы, информативен и свидетельствует не только о владении автором актуальной информацией о состоянии дел в предметной области, но и о множестве факторов, учёт которых необходим для получения достоверных результатов. Три последние раздела обзора использованы автором для того, чтобы обосновать выбор объектов исследования и круг решаемых в работе задач.

#### **Замечания к Обзору:**

1. Встречаются утверждения с утраченной логикой (12, 16). Так, на Стр. 12 есть утверждение «... если данный ТФ действует как индуцируемый репрессор, молекулы ТФ могут быть связаны с регуляторными областями соответствующих генов в отсутствие матаболита, таким образом блокируя транскрипцию» (Стр. 12) В случае «индуцируемого репрессора», наоборот, связывание с лигандом приводит к ингибированию экспрессии регулируемого гена.
2. Смешанное использование названия регуляторных элементов «промотор» - правильный перевод на русский язык и «промотор» -транслитерация с английского.

Первая результативная глава диссертации посвящена изучению транскрипционной регуляции путей утилизации углеводов у бифидобактерий. Для этого были выбраны 10 неблизкородственных штаммов с полностью прочитанными геномами. Выбор факторов транскрипции, потенциально участвующих в регуляции сахарного метаболизма бифидобактерий был осуществлён по гомологии с доменами любого из 6 известных семейств, члены которых участвуют в регуляции углеводного обмена. На основании

позиционных данных, позже к ним были добавлены некоторые регуляторы семейства TetR. В результате был получен набор, содержащий 308 белков. Для каждого семейства были построены филогенетические деревья и выявлено 55 ортологичных групп вместе с 33 одиночными регуляторами. Используя эту информацию, а также данные о взаимной локализации генов, кодирующих факторы транскрипции, и их потенциальных мишеней, в регуляторных областях были идентифицированы пере-представленные мотивы нуклеотидных последовательностей. Весовые матрицы, построенные по их выравниваниям, позволили идентифицировать регулоны для 48 ортологичных групп и для 16 одиночных регуляторов, которые, после тщательной фильтрации с использованием нескольких критериев, были помещены в базу данных RegPrecise, что очень ценно.

Наименее формализуемой частью этого раздела была реконструкция метаболических путей, регулируемых факторами транскрипции. Для каждого гена из 64 обнаруженных регулонов был осуществлён поиск потенциальных функций, а для каждого из регуляторов - потенциальных эффекторов. В результате, метаболические пути были предсказаны для 46 из 64 регулонов. Их анализ позволил автору выявить ряд важных закономерностей. Как и ожидалось, большинство исследованных регуляторов оказались локальными, контролирующими гены ферментов специфических метаболических путей. Ожидаемым можно считать и то, что 35 из 46 реконструированных регулонов включают гены гликозил гидролаз, которые необходимы для катаболизма сложных сахаров, входящих в пищевой рацион бифидобактерий. Не удивительно также и то, что 48 регулонов содержат гены углеводных транспортеров. Менее ожидаемым было обнаружение нескольких путей утилизации углеводов, контролируемых более чем одним фактором транскрипции. Такие случаи «избыточной» регуляции были проанализированы более детально на примере рибозных/нуклеозидных регулонов и путей утилизации мальтозы и мальтодекстрина. Этот анализ свидетельствует о возможности появления «избыточной» регуляции в результате неортологичного замещения регуляторных белков для одного и того же метаболического пути в разных организмах (RbsR регулоны), или в результате формирования альтернативных вариантов одного и того же пути, выполняемых паралогами, контролируемые разными регуляторами (регулоны MalR1-MalR5).

Участие регуляторов семейства TetR в регуляции генов сахарного метаболизма совсем неожиданно и достоинством авторов является то, что они не проигнорировали ко-локализацию их генов и генов, участвующих в катаболизме сахаров. Для более детального анализа, было построено филогенетическое дерево для ортологов семейства TetR из разных таксономических групп, которое показало, что все регуляторы, ко-локализирующиеся на хромосоме с генами катаболизма сахаров, формируют единую кладу. Анализ этого дерева и геномного контекста позволил автору выявить 8 ортологичных групп для этих белков (BgrT1-BgrT8). Для каждой из них был предсказан потенциально узнаваемый мотив нуклеотидной последовательности и выявлены регулоны. Оказалось, что они, действительно, содержат гены утилизации  $\beta$ -глюкозидов или  $\beta$ -галактозидов, причём, регулоны 6 из 8 факторов транскрипции были найдены в геномах нескольких видов, а в геномах *B. dentium* и *B. adolescentis* их оказалось более одного. Эти

приоритетные данные, а также то, что сайт связывания BgrT2 был найден в промоторе *bgrT4*, свидетельствует о сложной регуляции катаболизма углеводов у бифидобактерий.

Не менее значимым является обнаружение нового фактора транскрипции из семейства LacI, названного araQ. Он регулирует гены катаболизма арабинозы, некоторые гены регулонов MalR, гены утилизации L-ксилоноата и даже гены центральных гликолитических путей. Такой охват, по-видимому, является общим свойством регулонов AraQ у бифидобактерий, включая еще одного представителя семейства *Bifidobacteriaceae* - *Gardnerella vaginalis*, но не типичен для других таксонов. На основании этого автором высказано предположение, что локальные регуляторы генов утилизации арабинозы, функционировавшие у общего предка *Actinomycetales*, со временем приобрели способность контролировать гены центрального углеводного метаболизма и это сохранилось в эволюции, а необходимость участия в регуляции экспрессии арабинозного оперона во многих геномах семейства *Bifidobacteriaceae* снизилась.

На основании данных этого раздела сформулировано три первых вывода, но только второй и третий из них являются настоящими выводами из анализа полученных данных, причём второй вывод мог бы быть сформулирован более предметно.

#### Другие замечания к разделу

1. В тексте указано что первоначальный выбор факторов транскрипции, был осуществлён по гомологии с регуляторами любого из 6 семейств, содержащих регуляторы генов сахарного метаболизма, но перечислено 7 семейств (а на стр. 31 даже 8). Не понятно также, почему для факторов семейств LacI и RpiR указаны общие идентификаторы семейств (PF00356 и PF01418, соответственно), а также идентификаторы подсемейства (PF00532 и PF01380, соответственно) но не указаны другие аналогичные подсемейства (PF04198 и PF13580, соответственно). Гомология с ними не учитывалась?
2. В тексте указано (стр. 30), что сайты связывания регуляторов искали в диапазоне «от -350 до +50 нуклеотидов относительно предполагаемого сайта начала транскрипции». Так ли это, ведь задача поиска промоторов в работе не ставилась, а в геномах бифидобактерий они картированы только для малого числа генов. Если же -350/+50 относится к иницирующему кодону репликации, то почему выбрана такая правая граница (+50)?
3. Важным результатом работы является информация о потенциальных эффекторах исследованных регуляторов. В тексте указано, что она получена из «доступных экспериментальных данных» (стр. 31), ссылки на которые не приведены.
4. В Таблице 1. видовые обозначения указаны не полностью и не для всех штаммов. Кроме того, есть несоответствие между представленными в ней количествами ортологов и информацией, помещённой авторами на сайт RegPrecise. Так, например, в Таблице указано, что проанализированы регуляторы семейства GntR из 7 геномов, включая *B. adolescentis*, *B. bifidum* и *B. dentium* но в RegPrecise

регуляторы этого семейства в этих геномах отсутствуют ([http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/genome.jsp?genome\\_id=80](http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/genome.jsp?genome_id=80), [id=541](http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/genome.jsp?genome_id=541) и [id=1605](http://regprecise.lbl.gov/RegPrecise/genome.jsp?genome_id=1605)).

Следующий раздел посвящён изучению эволюции регулонов факторов транскрипции семейства LacI. Используемая для этого стратегия была аналогичной предыдущей, хотя для анализа, не ограниченного одним родом, потребовался выбор таксономических групп родственных друг другу бактерий и выбор геномов, представляющих каждую из них. Зато у автора была возможность использовать ранее полученную информацию о некоторых регулонах. В результате, был сформирован набор из 344 геномов, представляющих 39 таксономических групп. В результате, было исследовано 2572 фактора транскрипции. Очень любопытно, что в 35 отобранных геномах не удалось найти гены, кодирующие факторы транскрипции семейства LacI.

Было сформировано 190 ортологичных групп, предсказаны сайты связывания для 1303 из 2572 факторов транскрипции в 272 бактериальных геномах и получено 332 регулога. Оказалось, что 125 из 190 ортологичных групп содержат факторы транскрипции только одного регулога; 37 групп имеют 2 регулога, а в геномах остальные 28 групп есть от 3 до 10 регулогов. Для числа регулируемых генов этот диапазон был ещё шире: от 1 до 20. Любопытно, что возможность авторегуляции была обнаружена только для 72% факторов транскрипции. 125 регулонов содержали более 15 регулируемых генов, находящихся в составе хотя бы 7 оперонов, и контролировали несколько разных метаболических путей. Они были классифицированы как глобальные. В их число вошли регулоны ортологов CsrA из генома *B. subtilis* (сахарный метаболизм), пуринового репрессора PurR из *E. coli*, а также FruR (*Enterobacteriales*), PckR (*Rhizobiales*), и GapR (*Rhodobacteriales*).

Вполне ожидаемо, что мотивы всех сайтов связывания для регуляторов семейства LacI оказались палиндромами, менее ожидаемым является то, что абсолютное большинство из них – это четные палиндромы с характерным присутствием динуклеотида CG в центре. Вполне ожидаемо, что большинство сайтов связывания удалены от иницирующих кодонов на 30 - 140 н.п. от иницирующего кодона, но преимущественное расположение парных сайтов на расстоянии двух витков спирали менее ожидаемо и интересно. Если расстояния считались между центрами сайтов связывания, что не указано в тексте, это предполагает склонность к кооперативному взаимодействию. Есть некоторая проблема с пониманием предпочтительного расстояния между сайтами в 13 нп, но для этого совсем не обязательно предполагать какой-то особый механизм взаимодействия, возможно они связываются с регулятором по альтернативному принципу.

Для 182 групп факторов транскрипции удалось предсказать метаболические пути, хотя для генов/оперонов сахарного метаболизма не всегда удалось установить конкретные субстраты/интермедиаты. Потенциальные лиганды предсказаны для 108 ортологичных групп. Это ценно, т.к. формирует ориентиры для исследователей, изучающих конкретные метаболические пути. Больше всего эффекторов было предсказано для регуляторов углеводного обмена и важно, что среди них моносахаридов гораздо больше, чем сложных углеводов. Особое внимание было обращено на пути, контролируемые двумя или более неортологичными регуляторами. В некоторых случаях это позволяет предположить

конвергентную эволюцию, когда «специфичность к одному и тому же лиганду развивалась независимо множество раз».

В завершение этого раздела, автором приведены результаты полного функционального анализа регулонов четырех глобальных регуляторов у протеобактерий. К ним относятся FruR(Cra), PckR, GapR и GluR. Возможно, самым значимым результатом этого анализа стало то, что факторы транскрипции, являющиеся глобальными регуляторами в одних таксонах, могут быть локальными регуляторами в других, а размеры регулонов имеют тенденцию соответствовать филогенетической истории. Важно, что многие особенности функционирования, предсказанные автором для PckR и GapR, нашли экспериментальное подтверждение в работах других авторов. Для PckR это двойной тип регуляторного воздействия, контекст мотива связывания и зависимость от фосфоенолпирувата у *Sinorhizobium meliloti*. Для GapR это тоже контекст мотива связывания и тип эффектора, а также данные дифференциального экспрессионного анализа, полученные для дикого штамма *Rhodobacter sphaeroides* и его делеционного мутанта по *gapR*, которые выявили изменения в уровнях транскрипции многих генов центрального углеводного метаболизма, отнесенные автором в регулон GapR.

В объёмном обсуждении результатов, полученных для регуляторов семейства LacI (реконструирован 1281 регулон в 272 геномах), автор акцентирует внимание на обнаружении трёх новых регуляторов центрального углеводного метаболизма у альфа-протеобактерий (PckR, GluR и GapR), на реконструкции эволюционной истории FruR, примерах дивергентной и конвергентной эволюции, а также примерах появления новых функций, нетипичных для соответствующих таксонов. Особенно интересным получилось обсуждение возможных путей появления нескольких парафилиетических веток и возможных сценариев диверсификации регулонов, для чего было использовано филогенетическое дерево, построенное с хорошей бутстреп-поддержкой по последовательностям 1324 факторов транскрипции. Автором обсуждается три основных способа появления регуляторов с новыми функциями. Они включают одновременную дубликацию гена регулятора и оперона, содержащего регулируемые гены; дубликацию регулятора с последующим приобретением новых регулируемых генов и изменение специфичности фактора транскрипции без дубликации его гена, что пока менее понятно. По результатам этой работы, автором сформулировано 3 вывода, из которых один (четвёртый), опять является констатацией факта проделанной работы, а пятый и шестой адекватно отражают полученные данные.

### **Замечания к разделу**

1. Хотя полученные данные выложены в базу данных RegPrecise, отсутствие общего списка геномов, отобранных для эволюционного анализа семейства LacI, не позволяет их в полной мере оценить, т.к. в RegPrecise, кроме данных, полученных в данной работе, содержится информация и о других геномах.
2. В подписи к Рис. 7 перепутаны панели.
3. Есть противоречие между текстом: «Более 75% найденных сайтов изучаемых ТФ расположены на участке между 140 и 30 основаниями перед старт кодоном (Рис.

9А)» и тем, что написано на оси X Рис. 9А: «Расстояние от сайта старта транскрипции».

Последняя часть работы посвящена реконструкция метаболических путей биосинтеза витаминов группы В в бактериях кишечной микрофлоры человека. Для этого было использовано 2228 геномов (отражено в седьмом выводе). Метаболические пути биосинтеза, транспорта и ассимиляции были реконструированы для 8 витаминов/кофакторов (В1, В2, В3, В5, В6, В7, В9, В12) с использованием сетевого ресурса SEED после заполнения множества пробелов в функциональной аннотации генов. При этом учитывались паралоги со схожими, но различными функциями, а также возможность регуляции генной экспрессии белковыми факторами транскрипции и рибосвитчем. Ортологичные группы были построены для 126 ферментов биосинтеза/сохранения витаминов и для 83 транспортёров витаминов или их предшественников.

Для каждого витамина, анализируемые бактерии были разделены на две категории: прототрофы и ауксотрофы. Бактерии, неспособные к самостоятельному синтезу целевых витаминов, но имеющие гены их ассимиляции с последующим превращением в кофакторы были отнесены к ауксотрофам. Разделение неполных прототрофных путей, предполагающих неортологичное замещение ферментативных функций, и нетипичных ауксотрофов потребовало сложного индивидуального подхода и убедительной аргументации с использованием схем, показанных на Рис. 15 и «фенотипических правил», приведённых в Приложении 1. В результате, профессионально выполненный анализ неполных путей биосинтеза витаминов стал существенной частью всего раздела, а выявленные закономерности послужили основанием для формулировки восьмого вывода.

Классификация бактерий на прототрофы и ауксотрофы по каждому из витаминов была также использована для обнаружения/характеристики транспортных систем, которые было легче предсказать в ауксотрофных бактериях, а затем полученную информацию проецировать на прототрофы. В результате этой интеллектуальной работы, было сформулировано представление о том, что бактерии кишечного микробиома обмениваются не только витаминами (например, В7 и В12), но и их биохимическими предшественниками (отражено в девятом выводе). В связи с этим закономерно возник вопрос о белках-экспортёрах. Поэтому было исследовано распределение транспортеров и ферментов биосинтеза витаминов по бактериальным семействам. Выявленные при этом тенденции, например, то, что пермеазы чаще обнаруживаются в прототрофах по некоторым витаминам (В2, В5, В7), тогда как их активные транспортеры более (или в равной степени) представлены в ауксотрофах, соответствует предположению о возможном участии некоторых импортёров в секреции витаминов и их предшественников в окружающую среду и, следовательно, в обмене метаболитами между бактериями.

Ценный фактический результат был получен с использованием упрощённых бинарных таблиц, отражающих информацию о «витаминном фенотипе» для каждого исследованного организма и каждого витамина (“1”, если прототроф или “0”, если ауксотроф). Такое «упрощение» позволило автору вычислить «усредненные уровни

витаминовой прототрофии» для разных таксономических групп, суперпозиция которых на филогенетические деревья, построенные по конкатенированным последовательностям 11 рибосомных белков (Рис. 17 и Приложение 3), выявило существенные вариации в доле прототрофных организмов между разными таксономическими группами. Среди *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*, например, больше прототрофных организмов, в то время, как *Tenericutes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Synergistetes* включают самое большое число ауксотрофов по всем витаминам. Оказалось, что фенотипы по витаминам консервативны для видов, но вариабельны на более высоких таксономических уровнях. В некоторой степени это позволяет предсказывать витаминные фенотипы неизученных бактерий, основываясь на их филогении, или, наоборот, проверять корректность таксономической идентификации новых или мало изученных изолятов.

На следующем этапе были оценены уровни ауксотрофии в клинических образцах человеческого кишечного микробиома. Для этого были использованы метагеномные данные, полученные из 4-х разных источников и особая метрика «покрытие», отражающая суммарную встречаемость тех операционных таксономических единиц, для которых ранее были предсказаны фенотипы по витаминам группы В. Убедившись в том, что выборка исследованных геномов хорошо соответствует природному кишечному микробиому и установив минимальный порог для «покрытия» в 70%, автор искал ответы на вопросы: насколько сильно варьирует средний уровень ауксотрофности в кишечной микробиоте, и насколько сильно он меняется в зависимости от диеты? Анализ микробиомов, собранных в рамках проекта «Микробиом человека», свидетельствует о том, что типичный уровень ауксотрофов в кишечнике составляет 20-30%. Это может быть следствием того, что ауксотрофы преимущественно заселяют верхние слои желудочно-кишечного тракта, где извлекается большая часть витаминов, но также свидетельствует о том, что биосинтез витаминов не является облигатным для значительной доли кишечной микробиоты, что, косвенно указывает на возможность обмена метаболитами в ней.

На второй вопрос был получен отрицательный ответ в результате анализа кишечного микробиома, полученного в двух разных очень масштабных исследованиях с искусственной и естественной сменой режима питания. На мой взгляд, это хороший результат (сформулирован в одиннадцатом выводе), свидетельствующий о стабильном популяционном гомеостазе кишечной микрофлоры, хотя автор обсуждает его критически, среди прочего допуская возможность низкой чувствительности метода оценки индекса ауксотрофности.

На последнем этапе проанализировано влияние генов витаминного метаболизма на выживаемость бактерий рода *Bacteroides* в модельном кишечном микробиоме. Для этого были использованы бар-кодированные библиотеки мутантов, полученные в результате транспозоновой «бомбардировки» 4 штаммов бактериоидов. Созданные библиотеки мутантов были введены в кишечник мышек-гнотобионтов вместе с 11 другими бактериями. Задача заключалась в определении существенных генов (по отсутствию в них мутаций) и оценке динамики композиционных изменений в составе искусственного микробиома в зависимости от режима питания мышей. Безусловно ценным в этом



исследовании является выявление незаменимых генов. Кроме этого, были идентифицированы «факторы выживаемости» бактероидов, каковыми, в частности, оказались ферменты биосинтеза биотина, и пиридоксина PdxA, PdxB и SerC, т.к. численность мутантов по этим генам значительно уменьшалась в процессе конкурентного роста. Любопытно также, что метаболические потребности четырех изученных штаммов бактероидов различались по некоторым витаминам.

В Заключении к этому разделу автор совершенно закономерно делает акцент на том, что только малая часть бактерий кишечного микробиома может синтезировать все витамины самостоятельно, а основная популяция импортирует их из внешней среды. При этом, обнаружение ауксотрофов, имеющих неполные варианты метаболических путей, предполагает участие в этом обмене ещё и предшественников канонических витаминов, для которых предложено название “альтернативные витамины” и высказано предположение, что такие соединения тоже могут влиять на композиционный состав природной микробиоты.

#### **Замечания к разделу:**

1. Последняя часть называется «Влияние генов витаминного метаболизма на выживаемость бактерий из рода *Bacteroides* в кишечном микробиоме человека». Это не совсем верно, т.к. исследовали выживаемость в модельном микробиоме, помещённом в кишечник мыши.
2. Подход, использованный для оценки выживаемости бактерий после транспозонной бомбардировки изложен плохо. Не понятно, например, что означают цифры «от 81,5% до 91,8%» (стр. 110). Для процента генов с нарушенной функциональностью это много. Так как в тексте указано, что «каждый мутантный геном содержал вставку транспозона», можно думать, что для отбора мутантов был использован селективный маркер, помещённый в транспозон, хотя при использовании рестрикции по сайтам MmeI, помещённым на концы транспозонов, это лишнее. Но в таком случае, в библиотеках присутствовали геномы и без пертурбаций, что осложняет интерпретацию данных о «факторах выживаемости».
3. Не понятно, какой смысл в группу незаменимых генов было включать гены с «ненулевой численностью в библиотеке мутантов»

Рецензируемая работа, вне всякого сомнения, является уникальным по объёму, хорошо спланированным и продуманным исследованием. Особого упоминания заслуживают широкое использование доступных экспериментальных данных на разных этапах работы, а также то, что реконструированные регулоны факторов транскрипции и идентифицированные мотивы их связывания сделаны общедоступными в базе данных RegPrecise. Диссертационная работа очень хорошо оформлена и содержит мало опечаток (стр. 4, 20, 29, 41, 43, 82, 95 и 112), несогласованных предложений (стр. 4, 5, 15, 18, 58, 111, 118) и других технических погрешностей (стр. 29, 51, 53, 113). Достоверность полученных результатов никаких сомнений не вызывает, и они обязательно будут востребованы широким кругом исследователей. Фактические выводы отражают суть

полученных данных, хотя второй, шестой и десятый могли бы быть сформулированы более предметно. Автореферат соответствует содержанию диссертации, хотя число Приложений к диссертации в нём указано не верно (2 вместо 3, на Стр. 6). В 9 публикациях автора отражены все результаты. Актуальность, научная новизна и практическая значимость проведенных в работе исследований полностью соответствует п. 9 «Положения о присуждении ученой степени», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 29.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Хорошкин Матвей Сергеевич, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика.

Доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки - обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Пущинский научный центр биологических исследований» Российской академии наук (ФИЦ ПНЦ БИ РАН)

Подпись сотрудника ФИЦ ПНЦ БИ РАН  
Ольги Николаевны Озолиной удостоверяю:

*Нач. отд. А. Озолина*  
29 апреля 2019 г.



*Т.Н. Левченко*

**Контактные данные:**

тел.: +7(4967)739-140, e-mail: [ozoline@rambler.ru](mailto:ozoline@rambler.ru)

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.02 – «Биофизика»

**Адрес места работы:**

142290, Московская область г. Пущино, ул. Институтская, д. 3,  
ФИЦ ПНЦ БИ РАН, Институт биофизики клетки РАН,  
Лаборатория функциональной геномики и клеточного стресса  
Тел.: +7(4967)739-140; e-mail: [ozoline@icb.psn.ru](mailto:ozoline@icb.psn.ru)