

Федеральное государственное учреждение
**«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»**

119071 Россия, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2. Тел.: (495) 954-5283; факс: (495) 954-2732; www.fbras.ru; e-mail: info@fbras.ru

30.04.2019 № 85-01-19/386
На № 6210/134 от 02.04.2019

Г

Г

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора по науке
Федерального государственного
учреждения «Федеральный
исследовательский центр
«Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии
наук» (ФИЦ «Биотехнологии» РАН)
д.б.н.



Н.В. Пименов

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу

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

Актуальность темы исследования. Микробиом кишечника (или микробиота – совокупность всех микроорганизмов, населяющих кишечник) тесно взаимодействует с организмом хозяина и влияет на многие его жизненные системы. Патологии микробиома связывают не только с гастроэнтерологией, но и со многими нейродегенеративными, иммунными заболеваниями и даже раком. Структура микробиома каждого индивидуума зависит как от генетических факторов хозяина, так и от его питания и других составляющих его образа жизни. Манипуляции микробиомом могут внести существенный вклад в терапию различных заболеваний, однако этому препятствует все еще слабая степень изученности функционирования микробиома человека как самого по себе, так и его взаимодействия с хозяином. Это, в свою очередь, вызвано сложностью системы

(многокомпонентное сообщество с меняющимися параметрами среды) и недостаточной степенью разработанности подходов для его исследования.

Новизна исследования, степень обоснованности полученных результатов и выводов.

Микробиому кишечника человека посвящено множество исследований, подавляющее большинство которых можно отнести к одной из двух категорий: 1) описание изменений таксономического состава микробиома в зависимости от изменения внешних условий, в т.ч. описание связи изменений микробиома с патологическими состояниями организма-носителя, и 2) детальное изучение отдельных представителей кишечного микробиома. Работы из первой категории крайне важны для ассоциативного описания структуры микробиома, но не развивают понимания механизма метаболических сетей, их регуляции и межорганизменных взаимодействий. С другой стороны, работы из второй категории крайне медленны, дорогостоящи и плохо масштабируемы. Основной новизной представляемой работы является то, что применяемые в ней методы сравнительной геномики позволяют с одной стороны провести широкомасштабный скрининг геномов большого количества микроорганизмов, а с другой – достаточно глубоко изучить их метаболизм, таким образом, объединяя преимущества указанных выше двух типов подходов. Кроме того, поскольку, около 80% вариативности между клетками обеспечивается регуляцией транскрипции, выбор фокуса данной работы именно на исследовании регуляции транскрипции выглядит целесообразным. В ходе работы были исследованы регулоны сотен всевозможных транскрипционных факторов (ТФ) различных семейств, участвующих в регуляции углеводного метаболизма, предсказаны новые ТФ, а также новые функции известных ТФ. Предсказаны сложные сети регуляции катаболизма альфа-глюкозидов, витаминов и многое другое. Все полученные результаты обоснованы и достоверны и могут служить основой для дальнейших работ в области биохимии, системной биологии, микробиологии, а также быть основой для новых технологий в пищевой промышленности и медицины.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации стандартна за исключением того, что каждая из трех глав, посвященных собственно работе (Главы 2-4) содержат свои методы, результаты и обсуждение. Главы 2 и 3 хорошо связаны друг с другом, в то время как Глава 4 стоит несколько в стороне. Объем диссертации - 149 страниц (включая приложения), она включает 22 рисунка, 3 таблицы и список литературы, состоящий из 230 литературных источников, а также 3 приложения с большим количеством дополнительных рисунков.

Диссертация написана хорошо, однако местами (особенно в части результатов) ее довольно трудно читать, что, по-видимому, связано с тем, что некоторые куски исходно были написаны на английском и затем переводились на русский язык. В качестве примера можно выделить такие обороты как:

стр. 14. «для пертурбации уровней экспрессии изучаемых генов»

стр. 20. «репрезентации сайтов связывания для визуализации и репрезентации для поиска новых сайтов.»

При этом, не смотря на довольно большой объем текста есть ощущение того, что многие детали и подробности в разделах «Результаты» всех трех глав опущены. Можно было бы привести их в дополнительных табличках (которых всего 3 на всю диссертационную работу) и рисунках чтобы не перегружать и без того достаточно объемный текст.

Мелкое структурное замечание: Рисунок 4 расположен под рисунком 5.

Отдельно хочется сказать об обзоре литературы. Этот раздел написан замечательно. Его можно прямо в текущем виде использовать в качестве пособия/обзора по регуляции транскрипции прокариот.

Основные научные результаты и их значимость для науки и практики.

Результаты не вызывают сомнений, однако в некоторых случаях алгоритмы их получения не совсем понятны в связи с кратким и тезисным изложением, направленным скорее на указание количества тех или иных генов и путей, а не на конкретику. Конкретике отведены таблицы и рисунки, но с моей точки зрения их недостаточно (см. комментарий выше).

Например, стр. 33 «Анализируя филогенетические деревья и геномный контекст идентифицированных регуляторов для каждого семейства по отдельности, мы выделили ортологичные группы транскрипционных факторов». Не понятно как конкретно все это делали. Общие подходы описаны в методах, но в каждом случае наверняка есть свои детали.

Не всегда понятно, что является результатом данной работы, а что взято из литературы. Например, стр. 40 «Мы идентифицировали 11 гомологов гена *rbsR*, которые можно отнести к 3 ортологичным группам регуляторов (*RbsR1*, *RbsR2* и *RbsR3*) <...>. Однако, предсказанные ДНК-связывающие мотивы *RbsR1* и *RbsR* из *B. breve* UCC2003 сильно различаются, поэтому мы переименовали второй регулятор в *RbsR2*». *RbsR2* регуляторы были известны ранее или были предложены в этой работе? Выше по тексту они уже встречались.

Отдельные вопросы и замечания:

Обзор литературы.

Стр. 15. Я бы не согласился, что ключевая идея методов сравнительной геномики состоит в том, что на последовательности, несущие жизненно важную функцию действует положительный отбор. Это несомненно важная идея, но я бы сказал, что главной идеей является: «то, что схоже по последовательности – то и родственно».

Стр. 15. Что такое Цис- и Транс-активные последовательности. Необходимо дать определение.

Глава 2.

Стр. 29. Что значит регуляторы «расположены по соседству» с предсказанными генами? Ближайшие XXX генов? YYY нуклеотидов? Важна ли цепь?

Стр. 29. А зачем определяли ортологичные группы ТФ? Это же в целом не нужно для задачи реконструкции метаболизма сахаров? Достаточно понимать, что те или иные гены/белки гомологичны.

Стр. 32. Таблица 1. Хотелось бы какого-то сравнения полученных предсказаний с данными о фенотипах тех 10 Бифидобактерий, геномы которых исследовались. Например, что известно по параметрам роста *B. gallicum*, у которого была обнаружена наименьшая ГУМ и количество ТФ, связанных с метаболизмом углеводов. Такое сравнение может дать ценную информацию, делающую реконструкцию метаболизма исследуемых бактерий более полной.

Стр. 37. было бы интересно увидеть соотношение полностью известных путей (все реакции и ферменты описаны ранее) и путей, в которых автор предлагает новые/модифицированные шаги.

Стр. 38. Про часть, где большинство углеводных транспортеров относились к ABC и MFS. Это согласуется с литературой, но странно, что не было найдено группы SSS (Sodium solute symporter, 2.A.21). Они довольно часто транспортируют сахара.

Стр. 41. «Таким образом, мы предполагаем, что несколько рибозо-специфичных регулонов *RbsR* обнаруженных в различных бифидобактериальных геномах контролируют катаболизм рибозо-содержащих нуклеозидов». А почему именно катаболизм?

Стр. 44. «Реконструкция регулона *MalR3* у *B. bifidum*, позволяет предположить, что данный ТФ контролирует экспрессию только гликоген фосфорилазы *glgP*, а также самого гена *malR3*». Может быть этот микроорганизм не может расти на мальтозе/мальтодекстрине или делает это совсем другими белками? А данная гликоген фосфорилаза нужна только для гидролиза внутреннего (своего) гликогена (или, кстати, его синтеза.

Глава 3.

Стр. 52. Что такое «таксономическая группа»? В целом конечно понятно, что имеется в виду и по-видимому, определение есть в базе RegPrecise (вообще в тексте полно отсылок к этой базе), но это не совсем правильно с точки зрения того, что диссертация – это законченная и полноценная работа. Т.е. ссылка на какие-то наборы промежуточных данных видится уместной, а вот какое-то определение или термин должно быть расшифровано в самой диссертационной работе.

Стр. 53. Не понятна необходимость введения понятия «регулог». Оно появляется в начале Главы 3 и его роль в рамках данной работы неочевидна.

Стр. 60. *«Мы сравнили предсказанные функции регулонов с результатами ранее опубликованных экспериментальных работ, доступными для 24 ТФ из семейства LacI. Функции этих регуляторов, предсказанные в данной работе, соответствуют функциям, установленным ранее экспериментально».*

Очень хотелось бы не такого абстрактного утверждения, а приведения самих результатов сравнения, хотя бы в виде рисунка или таблички. Что-то наподобие Таблички 3, но по всем ТФ и регулонам с указанием подтверждающих данных.

Стр. 73-74 и Рисунок 14 (обсуждение Главы 3):

- Можно ли сделать такой вывод, что специфичность ТФ совершенно не наследуется вертикально? Т.е. скорость дубликаций и смены функции у паралонов существенно выше благодаря чему на дереве одни и те же специфичности находятся не вместе, а разбросаны по разным ветвям.
- Можно ли оценить вероятности превращения ТФ регулонов одних метаболитов в другие? Например, сказать, что превращения ТФ, отвечающего за регулон метаболизма "сахар X" ---> "сахар Y" сильно более вероятно чем "сахар Z" --> "сахар K". Например, судя по дереву, бета-галактозиды часто находятся вместе с бета-глюкозидами. Эти соединения близки с точки зрения родственности "работающих с ними" ферментов (бетаглюкозидазы часто родственны бета-галактозадидам, но не, скажем, альфа-глюкозидазам) и значит ТФ у них близки или мотивы связывания близки. Или эта близость на дереве как раз следствие вертикальной эволюции?
- Какова роль HGT на этом дереве?

Глава 4.

Стр. 85. Неправильно указаны названия нескольких типов.

Стр. 100-101. *«Среди них, 45 видов (~15%) варьируют хотя бы по одному витаминному фенотипу».* Выше (стр. 83-84) было сделано допущение о том, что представители одного вида должны быть одинаковы по отношению к профилю синтезируемых витаминов: *«По*

результатам проведенной реконструкции витаминных фенотипов для бактерий из кишечного микробиома мы наблюдали, что у большинства бактерий фенотипы консервативны на уровне видов. Поэтому мы предположили, что бактерии, относящиеся к одному ОТЕ, обладают похожими фенотипами». Не нужно ли это допущение пересмотреть исходя из результатов, показанных на стр. 100-101?

Стр. 117. Пересмотр таксономии по результатам анализа витаминов выглядит достаточно странным во многом из-за того, что вообще понятие вида у прокариот довольно искусственно.

Стр. 117. «поэтому обмен витаминами между ауксотрофами и прототрофами был бы правдоподобным объяснением механизма поддержания такого большого бактериального сообщества в человеческом кишечнике». Другим вариантом может быть получение витаминов не путем обмена между живыми микробами, а путем «поедания» живыми мертвых (включая даже «микробные антибиотические войны»). Такой вариант мог бы быть разрешен исследованием динамики сообщества.

Все указанные замечания и вопросы не снижают значимость и новизну полученных результатов. Нет никаких сомнений, что полученные результаты существенно расширяют наши знания о регуляции метаболизма сахаров, витаминов и коферментов у бактерий, что особенно актуально в связи с тем, что бактерии играют огромную роль не только в природных местообитаниях, но и как симбионты человека и животных.

Достоверность полученных результатов. Степень обоснованности результатов и выводов. Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов.

Нет никаких сомнений в достоверности полученных результатов. Это же подтверждает и уровень научных журналов, в которых полученные результаты были опубликованы.

По теме диссертации опубликовано три статьи в международных научных журналах, входящих в основные библиометрические базы данных (PubMed, WoS и Scopus), каждый из которых входит в Q1. Две статьи опубликованы в самом цитируемом микробиологическом журнале *Frontiers in Microbiology*, а одна в *Science!* В одной из них Матвей Сергеевич является первым автором, а еще одной делит первое место с одним из соавторов:

1. **Khoroshkin MS**, Leyn SA, Van Sinderen D, Rodionov DA. “*Transcriptional regulation of carbohydrate utilization pathways in the Bifidobacterium genus*”, **Frontiers in microbiology**, 2016; 7:120.

2. Wu M, McNulty NP, Rodionov DA, **Khoroshkin MS**, Griffin NW, Cheng J, Latreille P, Kerstetter RA, Terrapon N, Henrissat B, Osterman AL, Gordon JI. “*Genetic determinants of in vivo fitness and diet responsiveness in multiple human gut Bacteroides*”, **Science**, 2015; 350(6256):aac5992.;

3. Ravcheev DA*, **Khoroshkin MS***, Laikova ON, Tsoy OV, Sernova NV, Petrova SA, Rakhmaninova AB, Novichkov PS, Gelfand MS, Rodionov DA. “*Comparative genomics and evolution of regulons of the LacI-family transcription factors*”, **Frontiers in Microbiology**, 121 2014; 5:294.

Таким образом, публикационная активность подтверждает научную значимость данной работы.

Результаты данной работы обладают не только большой фундаментальной значимостью, но и могут быть использованы в широком спектре биотехнологических применений, в первую очередь, связанных с медициной, а именно для диагностики и терапии болезней и синдромов, связанных с дисбиозом, для подбора персонализированных пробиотиков, микроэлементов и пребиотиков.

Выводы обоснованы и полностью отображают суть основных полученных результатов.

Заключение.

Диссертационная работа **Хорошкина Матвея Сергеевича** на тему «**Реконструкция регулонов метаболических путей в бактериях микробиоты кишечника человека**», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук является законченной научно-квалификационной работой. По своей научной новизне и практической значимости диссертационная работа соответствует специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика. Диссертационная работа удовлетворяет критериям, установленным в п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013), а ее автор, **Хорошкин Матвей Сергеевич**, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика.

Отзыв заслушан и одобрен на научном семинаре лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот ФИЦ «Биотехнологии» РАН, 22.04.2019 г. (протокол №2 от 22.04.2019 г.); основное направление научно-исследовательской работы лаборатории соответствует тематике диссертационной работы.

Отзыв подготовлен:

Зав. лаб. Метаболизма экстремофильных прокариот, ФИЦ «Биотехнологии» РАН
кандидат биологических наук

Подпись Кубланов И.И.
Илья Валерьевич Кубланов
29 апреля 2019 г.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ «Биотехнологии» РАН)

119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2,

тел. +7 (495) 954-52-83, факс +7 (495) 954-27-32.

e-mail: kublanov.ilya@gmail.com