

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Хорошкина Матвея Сергеевича
«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"

Исследование молекулярно-генетических механизмов жизнедеятельности бактериальной клетки представляет собой насущную задачу современной биологии. Прояснение деталей метаболизма изолированных видов бактерий позволяет приблизиться к пониманию экологии сложных микробных сообществ (микробиома) – как свободноживущих, так и ассоциированных с организмом хозяина. Одним из важнейших для изучения является кишечный микробиом человека. Модуляция состава микробиома может позволить осуществлять профилактику и раннюю диагностику широкого круга заболеваний. Фундаментальные исследования метаболизма таких базовых веществ, как витамины и сахара, у микробов, населяющих кишечник человека, необходимы для идентификации эффективных и точных «рычагов» персонализированного воздействия на микробиом. Ключевыми инструментами таких исследований являются биоинформатика и, в частности, методы сравнительной геномики и метагеномики. В свете этого, работа Хорошкина М.С., целью которой было одновременное изучение метаболических путей и систем регуляции у бактерий кишечного микробиома, обладает значительной актуальностью.

Объем диссертационной работы составляет 149 страниц; работа включает все необходимые разделы, наглядно проиллюстрирована и снабжена таблицами. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в международных рецензируемых научных журналах, а результаты работы представлены на ряде международных и российских конференций, что дополнительно свидетельствует об успешной апробации результатов. Описанные в работе результаты обладают высокой степенью новизны; методы, использованные для их получения, детально описаны.

Структура работы несколько отличается от традиционной. Вслед за введением и общим литературным обзором (глава 1), в трех последовательных главах полно и детально изложены три соответствующих раздела проделанной работы: изучение транскрипционной регуляции путей утилизации углеводов в бактериях рода *Vifidobacterium* (глава 2), исследование транскрипционной регуляции и эволюции регулонов из семейства *LacI* (глава 3) и реконструкция метаболических путей биосинтеза витаминов группы В в бактериях микробиома кишечника человека (глава 4). При этом внутри каждой из глав описаны использованные в разделе методы, полученные результаты, и приведено их обсуждение. Далее следуют все необходимые заключительные разделы диссертации.

Использованная структура не умаляет ясности и полноты изложения полученных результатов. Однако, как видится, более целостное объединенное представление – как в части обзора литературы, так и в части выводов и обсуждения всей совокупности результатов – позволило бы улучшить понимание читателем значимости и актуальности

результатов. Тем более что все части вносят существенный вклад в фундамент общей насущной темы – взаимосвязи микробиома, диеты и здоровья человека.

Обзор литературы достаточно полный и подробный и освещает практически все необходимые концепции и сведения из области каждого из трех разделов работы. Список использованной литературы обширен и включает в себя 230 источников.

В качестве замечания, во-первых, стоило бы обогатить обзор краткой биомедицинской перспективой на роль бифидобактерий в кишечном микробиоме. Логично осветить такие вопросы, как польза бифидобактерий для организма человека; предполагаемые механизмы их пробиотических свойств (особенно связанные с катаболизмом сложных сахаров); особенности их экологической ниши среди других кишечных видов, в том числе в первые месяцы жизни человека.

Во-вторых, стоило бы несколько расширить общий обзор связи между микробиомом, здоровьем и диетой человека. На стр. 28 приведены 4 ссылки на исследования ассоциации заболеваний с составом кишечного сообщества, однако все они посвящены ожирению – между тем как это не основная и не самая важная связь, а имеется множество ассоциаций и по другим заболеваниям – например, воспалительным заболеваниям кишечника и другим. Аналогичным образом, по поводу диеты: приведены ссылки на 3 статьи, из которых одна описывает лишь кратковременное интервенционное исследование по небольшой группе добровольцев, а вторая – описание микробиома для немногочисленной группы из одной относительно компактной популяции.

Наконец, говоря о метаболизме сахаров в контексте «микробиом-здоровье-диета», было бы полезно привести наглядно их классификацию: моно-, олиго-, полисахариды и их основные подтипы/представители – и основные источники для кишечных бактерий (какие из них поступают с пищей, какие – непосредственно от хозяина). Поскольку бифидобактерии входят объединены в симбиотические сети с другими микробами внутри кишечника, полезно было бы описать известные факты на этот счет, в том числе внутрикишечный кросс-фидинг между бифидобактериями и продуцентами масляной кислоты – продукта ферментации пищевых волокон и ключевого для организма хозяина вещества в кишечнике.

В главе 2 подробно описан биоинформатический анализ разнообразия транскрипционных факторов, участвующих в регуляции сахарного метаболизма, у 10 бактерий рода *Bifidobacterium*, с применением методов сравнительной геномики; проведена геномная реконструкция регулонов для более чем 260 транскрипционных факторов из семейств LacI, ROK, DeoR, AraC, GntR и TetR; а также биоинформатически проанализированы их функции. О новизне свидетельствует тот факт, что впервые предсказан глобальный регулятор AraQ из семейства LacI, контролирующей центральный углеводный метаболизм у бифидобактерий, а также впервые обнаружен пример регуляции метаболизма углеводов транскрипционными факторами из семейства TetR.

Значимость описанных в данном разделе результатов – в том числе реконструкции сети регуляции путей катаболизма мальтозо-содержащих полисахаридов у бифидобактерий - подкрепляется тем, что бифидобактерии могут оказывать положительное влияние на здоровье человека. Таким образом, описание механизмов их полезного действия – в том числе опосредованных утилизацией сахаров – имеет не только

фундаментальное значение, но и в перспективе прикладное – для точечного повышения эффективности воздействия пробиотиков на их основе.

Замечания по разделу:

Стр. 31 – Непонятно, почему в сравнительный геномный анализ представительных видов бифидобактерий не был включен геном *Bifidobacterium catenulatum*. Несмотря на то, что он – наряду с выбранными – один из распространенных представителей кишечных бифидобактерий.

Стр. 33 и далее в разделе – Не приведены методы построения филогенетических деревьев (такие, как использованные метрики расстояния).

Стр. 39 – Интерес представляют возможные объяснения избыточной регуляции путей утилизации сахаров транскрипционными факторами. Помимо приведенных объяснений, было бы интересно обсудить, как это связано с особенностями ниши (кишечник человека).

В главе 3 описан проведенный с помощью методов сравнительной геномики обширный анализ репертуара генов транскрипционных факторов семейства LacI по большому набору геномов разнообразных микробов; описан анализ регулонов и регулогов, сайтов связывания. Предсказаны возможные биологические функции (в основном относящиеся к метаболизму углеводов) и эффекторы. Предложены основные способы появления регуляторов с новыми функциями.

Проделанная каталогизация осуществлена впервые и скрупулезно описана. В то время как автор ссылается на ряд сторонних проектов, результаты которых независимо подтвердили некоторые из идентифицированных механизмов регуляции, по всей видимости, намеренная экспериментальная валидация для обнаруженных регуляторов не проводилась. Проведение валидации дополнительно усилило бы значимость этого раздела работы.

Замечания по разделу:

Стр. 58 – Непонятен смысл фразы в предпоследней строке («двойные сайты были найдены в 1 +96118 оперонах»).

Стр. 70 – Показанные автором с помощью филогенетического анализа ТФ из семейства LacI важные примеры различных эволюционных процессов имеет смысл представить в виде наглядной схемы.

Стр. 75 – Подписи на рисунке не очень разборчивы.

В целом по разделу: в свете тематики двух других разделов работы, было бы интересно более подробно остановиться на сравнении разнообразия транскрипционных факторов семейства LacI между бифидобактериями и другими основными кишечными представителями, присутствующими в анализе.

По обсуждению: В разделе очень детально описана реконструкция метаболизма для простых сахаров. Автору стоило упомянуть, возможна ли подобная реконструкция для полисахаридов (ввиду их важной микробиотно-опосредованной роли для здоровья человека).

В главе 4 для представительного набора кишечных бактерий человека описана впервые проведенная полная реконструкция путей биосинтеза, сохранения и захвата из окружающей среды 8 витаминов группы В; в частности, предсказаны несколько новых вариантов путей для предшественников этих витаминов. Автором была разработана мера оценки соотношения численности ауксотрофных и прототрофных бактерий для микробиома кишечника человека, при этом ее вариабельность была оценена на наборе данных ДНК-секвенирования по кишечным микробиомам.

Отдельного внимания заслуживает часть работы, посвященная биоинформатическому анализу влияния генов витаминного метаболизма на выживаемость бактерий в кишечном микробиоме человека на основании экспериментальных моделей с мутантными микробами в мышах. Разработанный конвейер по реконструкции метаболизма и идентификации генов-факторов выживаемости микробов – ценный инструмент для подобных экспериментов, которые в перспективе позволят существенно детализовать понимание как связей внутри микробиома, так и способа управления ими.

Помимо того, что некоторые витамины, синтезируемые микробами в ЖКТ человека, могут всасываться и таким образом становиться доступными самому человеку, по-видимому, еще большую роль витамины играют для поддержания баланса самого кишечного сообщества. В этом свете, полученные автором в данном разделе результаты имеют важное значение для углубления понимания экологии кишечного микробиома и возможных механизмов нарушения его равновесия, связанного с заболеваниями.

Замечания по разделу:

Стр. 83 – Из описания методов анализа данных секвенирования не очень ясна граница между описанием того, что проводилось в других публикациях, а что – автором диссертации.

Там же, для анализа были взяты таблицы состава микробиоты, полученные разными методами (в одном случае порог сходства для единиц OTU – 97% , в другом – 99%). Не пояснено, насколько сильно это могло сказаться на результате предсказания синтеза витаминов. Обработка ДНК-ридов с начала и по унифицированному алгоритму была бы более точна. В частности, имеет смысл максимизировать точность предсказания путем замены OTU-подхода на рассмотрение уникальных ридов без кластеризации в духе ASV (amplicon sequencing variants) – например, как предлагается в алгоритмах Deblur и DADA2.

Стр. 84 - Фразу «176 геномов, для которых не определена их таксономическая принадлежность» стоило бы улучшить – предположительно, для большинства из них с точностью до семейства либо рода все-таки известна таксономия.

Стр. 95 – В качестве предложения: ввиду обнаруженной возможности обмена кишечных бактерий витаминами, было бы интересно реконструировать реальные сети обмена исходя из состава реальных сообществ, наблюдаемого посредством метагеномики, и оценить роль витаминов в поддержании гомеостаза кишечного сообщества.

Стр. 103-105 - В результате оценки степени ауксотрофии кишечной микробиоты по различным витаминам по массиву 16S рРНК данных микробиоты населения США из проекта Human Microbiome Project («Микробиом человека») автор делает вывод о том, что кишечник заселен по большей части прототрофными организмами. Между тем, не исключено, что данное наблюдение связано с аномально высоким преобладанием рода *Bacteroides* в данной выборке (а ведь *Bacteroides* – протрофы практически по всем витаминам). Последующие исследования на аналогичной популяции (*American Gut*) и других популяциях показали, что широко распространены и другие варианты нормы - в том числе сообщества с низкой долей *Bacteroides* и преобладанием различных *Firmicutes*. Поскольку среди последних много ауксотрофов по витаминам, было бы интересно валидировать вывод о преобладании прототрофии по более актуальным новым данным.

Стр. 105-108 - Описан анализ изменения баланса между прототрофами и ауксотрофами в кишечнике при изменении рациона питания у хозяина. Делается вывод о том, что изменения незначительны (что отражено в положении 11). Стоит заметить, что вывод сделан на основании анализа данных из 2 исследований, которые могут быть недостаточно представительными для такого широкого утверждения. В исследовании David et al, *Nature*, 2014 выборка состоит из всего лишь из нескольких человек – такой объем может не обеспечивать достаточной статистической мощности для детекции изменений «микробиомных фенотипов». Также добровольцы изменяли свой рацион пусть и радикально, но на протяжении лишь нескольких дней. Между тем, из других исследований известно, что для значимых изменений состава микробиома (а также влияния на организм человека) необходим срок интервенции от 2 недель или 2 месяцев. Во втором исследовании (Zhang et al, *Scientific Reports*, 2014), по монгольской популяции, сезонные переключения диеты действительно существенны (между мясными и молочными продуктами) – однако, очевидно, не включают изменения количества и спектра потребляемых пищевых волокон – которые и представляют собой важные рычаги влияния на отдельные группы бактерий в кишечнике. Таким образом, представляет интерес дополнительно проверить вывод о неизменности баланса прототрофы-ауксотрофы на расширенных когортах и в связи с вариацией уровня сложных сахаров в пище.

В целом по работе, в качестве небольших замечаний по оформлению стоит отметить наличие опечаток, в том числе в названии разделов (стр. 29). На стр. 29 используется нетривиальный термин «регулог» без предварительного определения (вводится лишь на стр. 55). Однако указанные недостатки (как и перечисленные в отзыве выше) являются незначительными и не умаляют значимости проделанной работы.

Содержание автореферата соответствует основному содержанию диссертации. Работа отвечает требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней, а ее

автор Хорошкин Матвей Сергеевич заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 "математическая биология, биоинформатика".

Официальный оппонент

Тягт Александр Викторович
кандидат биологических наук,
научный сотрудник лаборатории моделирования и терапии наследственных заболеваний
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена
Российской академии наук (ИБГ РАН)
119435, г. Москва, ул. Вавилова, 34/5
Контактный телефон: +7 (910) 4607032
E-mail: a.tyakht@gmail.com

30.04.2019



*Подпись Верна
специалист по кадрам*



О.Л. Борисов