

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.101.01
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 6 июня 2022, протокол № __5__

О присуждении Манолову Александру Ивановичу,
Гражданину Российской Федерации,
Ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Биоинформатический анализ изменчивости генного состава прокариот, в том числе в ассоциации с патогенностью» по специальности 1.5.8. — Математическая биология, биоинформатика, принята к защите 24 марта 2022 года, протокол №3, диссертационным советом 24.1.101.01 на базе Федерального 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, номер изменен приказом № 561/нк от 03 июня 2021 года).

Соискатель **Манолов Александр Иванович**, гражданин Российской Федерации, 1985 года рождения, в 2008 году окончил факультет аэрофизики и космических исследований Московского Физико-Технического Института по специальности “прикладные математика и физика”. Соискатель работал в должности лаборанта-исследователя (с 3.07.2014 по 19.12.2016) и младшего

научного сотрудника (с 20.12.2016 по 9.01.2020) в лаборатории биоинформатики ФНКЦ Физико-Химической Медицины ФМБА России, в должности младшего научного сотрудника лаборатории геномных исследований и вычислительной биологии ФНКЦ Физико-Химической Медицины ФМБА России (с 10.01.2020 по 15.02.2022), в должности научного сотрудника (с 16.02.2022 по настоящее время) лаборатории математической биологии и биоинформатики ФБУН НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора.

Диссертация выполнена в лаборатории геномных исследований и вычислительной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения "Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства".

Научный руководитель - Елена Николаевна Ильина, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией геномных исследований и вычислительной биологии **Федерального государственного бюджетного учреждения "Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства"**.

Официальные оппоненты:

Марданов Андрей Владимирович, гражданин РФ, доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией геномики микроорганизмов и метагеномики в Федеральном государственном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», г. Москва,

Андронов Евгений Евгеньевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией микробиологического мониторинга и биоремедиации почв в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении

"Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", г. Санкт-Петербург,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация - Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение Науки Институт биологии гена Российской академии наук дала **положительное заключение**, подписанное кандидатом биологических наук Алексеем Дмитриевичем Куликовским, научным сотрудником лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУН ИБГ РАН, и утвержденное 19 мая. В заключении содержится **ряд замечаний и вопросов:**

1) В разделе Обзор литературы на стр. 18 упомянуто, что: «бактериальная хромосома разделена на домены взаимодействия хромосом (chromosome interaction domains, CID), которые аналогичны топологически ассоциированным доменам (topologically associating domains, TAD) у эукариот». Стоит уточнить, что исходя из имеющихся на момент данных в Hi-C формате для бактерий различных видов домены CID все же не очень устойчиво определены, между ними могут быть промежутки, и набор CID в конкретном геноме может разительно варьировать в зависимости от выбора алгоритма поиска.

2) Имеется вопрос относительно поиска оперонов *E. coli*, которые значимо чаще встречаются в изолятах от пациентов с болезнью Крона. Из описания пациентов в разделе 2.1 не очевидно, являлись ли пациенты первично диагностированными, не подвергавшимися еще лечению от данного заболевания. Если лечение все-таки предшествовало сбору образцов, насколько вероятно, что найденные опероны ассоциированы не с болезнью Крона как таковой, а представляют собой особенности подвидов *E. coli*, отобравшихся в результате лекарственной терапии данного заболевания?

3) Хотя в литературном обзоре описана важность плазмид как участников горизонтального переноса генов, в работе не описаны анализы плазмидной составляющей генома с помощью разработанных алгоритмов геномной изменчивости. Применимы ли данные графовые методы для плазмид? Если да, проводился ли такой анализ? Было бы интересно увидеть их - например, для тех же *E. coli*, ассоциированных с болезнью Крона, являющихся одним из центральных объектов исследования в работе.

4) В тексте присутствуют небольшое количество языковых ошибок и опечаток, которых, как представляется, легко можно было избежать, применив программу для поиска и исправления ошибок. Несмотря на замечания, в отзыве содержится высокая оценка научного уровня выполненной работы и **отмечено, что** «Диссертационная работа диссертации Манолова Александра Ивановича «Биоинформатический анализ изменчивости генового состава прокариот, в том числе в ассоциации с патогенностью» является оригинальной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне. По содержанию, актуальности, новизне, научному и методическому уровню, практической и теоретической значимости полученных результатов, она полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842, представляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Манолов Александр Иванович, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8 — Математическая биология, биоинформатика».

Соискатель имеет 21 статью в российских и международных рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК, из них 6 статей

по теме диссертации, общим объемом 77 страниц. Кроме того, соискателем опубликовано 6 тезисов по теме диссертации в материалах российских и международных конференций.

Статьи по теме диссертации:

1. Genome Complexity Browser: Visualization and quantification of genome variability / **A. Manolov***, D. Konanov*, D. Fedorov, I. Osmolovsky, R. Vereshchagin, E. Ilina // PLoS computational biology. — 2020. — Т. 16, № 10. — e1008222. (импакт-фактор журнала: 4.475)
2. Genetic diversity of Escherichia coli in gut microbiota of patients with Crohn's disease discovered using metagenomic and genomic analyses / A. V. Tyakht, **A. I. Manolov**, A. V. Kanygina, D. S. Ischenko, B. A. Kovarsky, A. S. Popenko, A. V. Pavlenko, A. V. Elizarova, D. V. Rakitina, J. P. Baikova [и др.] // BMC genomics. — 2018. — Т. 19, № 1. — С. 1—14. (импакт-фактор журнала: 3.969)
3. Genome analysis of E. coli isolated from Crohn's disease patients / D. V. Rakitina*, **A. I. Manolov***, A. V. Kanygina*, S. K. Garushyants*, J. P. Baikova, D. G. Alexeev, V. G. Ladygina, E. S. Kostryukova, A. K. Larin, T. A. Semashko [и др.] // BMC genomics. — 2017. — Т. 18, № 1. — С. 1—17. (импакт-фактор журнала: 3.969)
4. Ultrahigh-throughput functional profiling of microbiota communities / S. S. Terekhov, I. V. Smirnov, M. V. Malakhova, A. E. Samoilov, **A. I. Manolov**, A. S. Nazarov, D. V. Danilov, S. A. Dubiley, I. A. Osterman, M. P. Rubtsova [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2018. — Т. 115, № 38. — С. 9551—9556. (импакт-фактор журнала: 9.566)
5. Genome analysis of Acidiplasma sp. MBA-1, a polyextremophilic archaeon predominant in the microbial community of a bioleaching reactor / A. Bulaev, A.

Kanygina, A. Manolov // Microbiology. — 2017. — Т. 86, № 1. — С. 89—95.

(импакт-фактор журнала: 1.156)

6. Zakharzhevskaya, N. B. Outer membrane vesicles secreted by pathogenic and nonpathogenic *Bacteroides fragilis* represent different metabolic activities / N. B.

Zakharzhevskaya, A. A. Vanyushkina, I. A. Altukhov, A. L. Shavarda, I. O.

Butenko, D. V. Rakitina, A. S. Nikitina, A. I. Manolov, A. N. Egorova, E. E.

Kulikov [и др.] // Scientific reports. — 2017. — Т. 7, № 1. — С. 1—16. (импакт-фактор журнала: 4.379)

В двух публикациях диссертант является первым автором (в публикации 1 - совместно с Конановым Д. Н., в публикации 2 - совместно с Ракитиной Д.В., Каныгиной А.В., Гарушянц С.К.). Вклад диссертанта в опубликованную работу по теме диссертации состоит в планировании исследования (непосредственное планирование в публикации 1, участие в планировании в публикации 2), участии в формулировке задач (все публикации), теоретической разработке и практической реализации методов (все публикации), обработке и анализе данных (все публикации).

Полученные результаты могут быть использованы при чтении спецкурсов на биологических и биоинформатических факультетах ВУЗов, на курсах повышения квалификации биологов. Также, полученные автором результаты и отработанные методические подходы могут служить базисом для проведения последующих исследований по изучению изменчивости геномов прокариот, роли горизонтального переноса генов в эволюции геномных последовательностей, активности мобильных элементов генома. Исследования такого рода проводятся в ведущих лабораториях мира.

На диссертацию поступило четыре 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.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что за последние годы ими были опубликовано большое количество научных работ, посвященных изучению геномных последовательностей бактерий и метагеномным исследованиям.

В отзыве оппонента Андрея Владимировича Марданова, доктора биологических наук, профессора РАН, заведующего лабораторией геномики микроорганизмов и метагеномики в Федеральном государственном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», г. Москва, в целом давшего высокую оценку и рекомендовавшего диссертацию к защите, **имеется ряд замечаний и вопросов:**

1. В работе уделено достаточно много внимания описанию биоинформатического анализа изменчивости геномов, а применение этого метода для идентификации генов, по поиску наиболее изменчивых регионов в штаммах *E. coli* выделенных у пациентов с болезнью Крона, в этом плане может быть не репрезентативным. Отбор этих генетических перестроек может быть связан с их адаптацией, вызванной именно болезнью, а не их патогенностью, поскольку они являются комменсальными штаммами.
2. Мало внимания уделено практическому применению разработанного метода. Как он может быть применен на практике? Хотя упоминается несколько возможных применений, хотелось бы более развернутого

описания.

3. В работе провели сравнения поиска изменчивости при использовании полных геномов и драфт-геномов и полученные результаты показали схожие результаты. Однако остается вопрос будут ли сохраняться эти результаты при увеличении длины анализируемой цепочки генов в окне. Ведь в этом случае, во-первых, будет иметь значение качество сборки драфт-геномов, а, во-вторых, при использовании драфт-геномов теряется информация об организации генома, в том числе о локализации интегрированных фагов и мобильных элементов.

4. Диссертационная работа Манолова А.И. посвящена разработке биоинформатического инструмента анализа геномов и для практического использования всегда интересен функциональный контекст выявленных областей. В работе хотя и называются конкретные гены, однако, роли их в метаболизме подробно не описывается. А такой анализ мог бы усилить описание полученных результатов.

В отзыве указано, что “можно отметить ещё замечания, касающиеся опечаток, неудачных фраз и оформления диссертационной работы. В качестве примера, можно привести опечатку на стр. 39 слово «поход» нужно заменить на слово «подход». В части оформления наиболее ярким примером является странная нумерация подглав, с излишним дроблением стр. 47-48 (2.0.1) или отсутствием нумерации для некоторых разделов стр. 11 - раздел «Оперон как функциональная единица архитектуры генома», стр. 24 – раздел «Плазмиды», стр. 25 – раздел «Интегративные конъюгативные элементы» и т.д.”.

В отзыве отмечено, что “сделанные замечания носят дискуссионный характер и не влияют на высокую оценку самой диссертационной работы Манолова А.И.” и “её автор Манолов А. И. заслуживает присуждения ученой

степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8. - математическая биология, биоинформатика.”

В отзыве оппонента Андропова Евгения Евгеньевича, кандидата биологических наук, заведующего лабораторией микробиологического мониторинга и биоремедиации почв в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии", г. Санкт-Петербург, дана высокая оценка работы и приведено несколько замечаний и вопросов:

1. Одной из главных проблем в работах, важной целью которых является поиск связей между сложными феноменами, такими, как например, в данной работе поиск связи между этиологией болезни Крона и особенностями геномов *E. coli*, является комплексная взаимообусловленность факторов. Так, например, комплекс специфических реакций/метаболитов пациента, характерный для болезни Крона, может стать фактором, благоприятствующим развитию специфических генотипов *E. coli* (что отчасти довольно правдоподобно, если учесть данные о «перепредставленных» оперонах из вывода 4). Если это так, то следовало бы уточнить к какой более крупной цели, чем просто индикация особенностей штаммов *E. coli*, выделенных из пациентов с болезнью Крона, направляется данное исследование;

2. Аналогичная проблема связана с распределением хот-спотов в геноме бактерий. Известно (и Автор отмечает это в литературном обзоре), что интеграция геномных островов часто происходит в гены транспортной РНК. Геномный остров, характеризующийся, как правило, высоким содержанием IS-элементов, становится после этого рекомбинационным хот-спотом. Однако причиной локализации этого хот-спота является наличие лишь гена

тРНК, а не какой-либо другой особенности данного локуса. В связи с этой проблемой, между прочим, возникает также вопрос о том, что Автор не выявил явной ассоциации генов транспортных РНК с профилем изменчивости. Верно ли, что геномные острова в проанализированных геномах *E. coli* интегрированы по альтернативным сайтам?

3. Уточните, каким образом были идентифицированы границы реплихор в анализируемых геномах и куда делись пунктирные линии, обозначающие их границы на рис. 3.18 (возможно, я их просто не заметил)?

4. В качестве контрольных видов микроорганизмов, геномы которых были проанализированы Автором, были помимо прочих использованы геномы *N. gonorrhoeae*, общепризнанной особенностью биологии которых является большая склонность к естественной трансформации и, как следствие, чрезвычайно высоким уровнем внутривидовой рекомбинации. Каким образом эта особенность данной группы микроорганизмов может быть связана с особенностями профиля изменчивости в данной группе?

5. Наконец, вопрос, связанный с выбором референса. Авторами в качестве референса был выбран геном штамма, выделенного из пациента с болезнью Крона. Каким образом выбор альтернативного референса может (и может ли) отразиться на структуре графа и мерах локальной изменчивости (числе путей и весов ребер)?

В отзыве сказано, что “Все вопросы, сформулированные в данной части отзыва, не имеют критического характера и не вызваны сомнениями в ценности этой очень интересной и хорошо сделанной работы, их цель лишь уточнение некоторых положений”.

В заключении указано, что “Диссертационная работа Манолова А.И. посвящена актуальной теме - исследованию закономерностей процессов изменений генного состава в геномах прокариот, в частности исследованию

областей с повышенным уровнем изменчивости. Исследование стало возможным благодаря предложенным автором оригинальным методам численной оценки уровня изменчивости и визуализации изменений в наборе генов. Выполнен анализ изменчивости геномных последовательностей у бактерий вида *E. coli* и ряда других микроорганизмов. По теме диссертации опубликовано шесть публикаций. Все это позволяет рекомендовать автора работы А.И. Манолов для присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8 – математическая биология, биоинформатика. Работа полностью удовлетворяет требованиям к кандидатским диссертациям п. 9 “Положения о порядке присуждения ученых степеней”, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. N 842 "О порядке присуждения ученых степеней" (с изменениями в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля, 2 августа 2016 г., 29 мая, 28 августа 2017 г., 1 октября 2018 г., 20 марта, 11 сентября 2021 г.).”

В отзыве на автореферат И.А. Романца, кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории математического моделирования биологических процессов ФГБУ “НМИЦ гематологии” Минздрава России **отмечено, что** “Содержание автореферата свидетельствует о том, что диссертация представляет собой законченное научное исследование, результаты которого обладают научной новизной и практической значимостью” **и отмечено, что** “К незначительным недостаткам автореферата можно отнести отсутствие библиографических ссылок в разделе актуальность в автореферате. Принципиальных замечаний к автореферату нет.”

В отзыве на автореферат Д.А. Гудкова, исполнительного директора Центра внедрения геномных технологий МФТИ сказано, что “автореферат

написан достаточно хорошо, и по большей части - ясно” и “ее автор, Манолов Александр Иванович, заслуживает присуждения соответствующей ученой степени”, также **отмечено**, что “Среди замечаний к автореферату могу отметить неровность повествования: часть с описанием поиска оперонов кишечной палочки ассоциированных с болезнью Крона, возникает достаточно неожиданно между разделами, посвященными разрабатываемым методам с применением графов.”

В отзыве на автореферат В.И. Ульянцева, кандидата технических наук, доцента факультета ИТиП Национального исследовательского университета ИТМО, г. Санкт Петербург, **указано**, что “диссертационная работа полностью удовлетворяет требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатам биологических наук. Манолов Александр Иванович заслуживает присуждения соответствующей ученой степени” **и отмечено**, что “из недостатков работы можно выделить некоторую незаконченность исследования с точки зрения распутывания эволюционных механизмов, стоящих за появлением областей повышенной изменчивости без признаков мобильных элементов генома. Интересен вопрос об оптимальности выбора критерия Тьюки в качестве способа выделения высоко-изменчивых областей”.

В отзыве на автореферат А.А. Лагунина, доктора биологических наук, профессора РАН, заведующего кафедрой биоинформатики МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, **указано**, что “Работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук по 1.5.8. - «Математическая биология, биоинформатика». А.И. Манолов безусловно заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук.” **и отмечено**, что “небольшим недостатком автореферата является то, что в его тексте

недостаточно представлен раздел результатов, связанных с выводом 3. Хотя он представлен в тексте диссертации и замечаний к его описанию нет”.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Разработан метод поиска высоко-изменчивых областей генома, основанный на графовом представлении расположения генов в геномных последовательностях. Данный метод **применен** для анализа изменчивости в геноме кишечной палочки и ряда других микроорганизмов.

Впервые показано существование консервативно расположенных областей повышенной изменчивости, не несущих известных факторов мобильных элементов генома, в геномных последовательностях представителей различных филогрупп *E. coli*.

Впервые показано, что уровень геномной изменчивости ассоциирован с плотностью хромосомных контактов и плотностью расположения сайтов Chi.

Разработан метод поиска оперонов, ассоциированных с патогенностью и **применен** для поиска оперонов *E. coli*, которые значимо чаще встречаются в изолятах от пациентов с болезнью Крона, чем в изолятах от здоровых людей.

Разработан алгоритм визуализации графов, соответствующих отдельным локусам генома и позволяющий эффективно оценивать уровень и характер геномной изменчивости в данном локусе.

Впервые показано, что оперон утилизации пропандиола и оперон синтеза и экспорта капсульных полисахаридов расположены в высоко-изменчивых областях, а опероны захвата сорбозы, захвата гемина и утилизации глиоксилата — в консервативных участках генома *E. coli*.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что: оно вносит вклад в понимание закономерностей процесса изменения

геномных последовательностей, расположения высоко- и слабо-изменчивых областей генома. Разработанные подходы являются важными элементами последующих исследований организации генетического материала.

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

Разработанный подход к визуализации позволяет находить консервативные и переменные фрагменты оперонов, а также определять для них существующие геномные контексты. Разработанный подход к оценке уровня изменчивости геномной последовательности позволит выявить области повышенной и пониженной геномной изменчивости, что может быть использовано в биотехнологической отрасли.

Свидетельства достоверности результатов исследования:

- результаты работы согласуются с существующими представлениями об ассоциации высоко-изменчивых областей генома с мобильными элементами генома, а также ранее опубликованными результатами по поиску подобных областей; результаты оценки уровня изменчивости согласуются с результатами компьютерного моделирования.

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, направленных на дальнейшее изучение изменчивости геномных последовательностей прокариот. По своему содержанию диссертация отвечает паспорту специальности «1.5.8. - Математическая биология, биоинформатика».

Диссертационный совет пришёл к выводу о том, что диссертация представляет собой завершённое научное исследование. По актуальности, новизне, практической значимости диссертация соответствует требованиям, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (с изменениями в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля, 2 августа 2016 г., 29 мая, 28 августа 2017 г., 1 октября 2018 г., 20 марта, 11 сентября 2021 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

На заседании 6 июня 2022 года диссертационный совет принял решение присудить Манолову Александру Ивановичу ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.8. - Математическая биология, биоинформатика.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 9 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, проголосовали за – 14, против – 0, недействительных бюллетеней – 0.

Председатель диссертационного совета 24.1.101.01,

доктор биологических наук, профессор

 М.С. Гельфанд

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.101.01

доктор биологических наук

 О.В. Казенников

