

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Евсеева Петра Владимировича
на тему: «Биоинформатические подходы к таксономической
классификации бактериофагов»
по специальности 1.5.8 – Математическая биология, биоинформатика

Диссертация посвящена использованию биоинформатических методов для таксономической классификации бактериофагов. Особое внимание уделено классификации хвостатых бактериофагов класса *Caudoviricetes* (реалм *Duplodnaviria*). Работа также рассматривает вопросы, связанные с проблемами таксономической классификации бактериофагов, имеющих мозаичную организацию генома. Важным результатом исследования является возможность использования результатов структурного моделирования для выявления глубоких эволюционных связей между сильно дивергировавшими группами вирусов реалма *Duplodnaviria*.

В настоящее время систематика вирусов, включая бактериофаги, является одной из ключевых областей биологических наук. Создание обоснованной таксономической иерархии прокариотических вирусов основывается в основном на использовании геномных данных с применением биоинформатических методов. Таксономическая классификация вирусов представляет собой задачу, решение которой лежит в компетенции Международного комитета по классификации вирусов (ICTV), который опирается на результаты вирусологических исследований. Большая часть известных бактериофагов, включая хвостатые фаги класса *Caudoviricetes*, до сих пор не получила классификации на уровне любой из категорий таксономии, основные классифицированные группы фагов находятся внутри родов или подсемейств. С такой неудовлетворительной ситуацией связаны

задачи по построению обоснованной классификационной схемы, включая последние открытия новых вирусных групп. В контексте вышеописанных проблем, результаты данной работы являются важными и актуальными.

Классификация бактериофагов, включая те, которые инфицируют фитопатогенные бактерии, представляет собой важнейшую задачу в биологической науке. Изучение таксономического разнообразия профаговых областей и фагов позволит расширить наши знания о многообразии бактериофагов. Кроме того, большое значение имеет изучение эволюционных взаимосвязей между различными таксономическими группами фагов. В этой работе автор использовал филогенетические методы анализа, включая различные подходы и методы, чтобы раскрыть эволюционные связи между разными таксономическими группами бактериофагов. В результате нашей работы были получены высококачественные данные, которые подкреплены современными биоинформатическими методами. Автор с коллегами опубликовали результаты в восьми высоко-рейтинговых журналах, что подтверждает их значимость и соответствие принятым стандартам. Кроме того, автор принял участие в пяти международных и российских конференциях, где представил свои исследования. Во введении также описан личный вклад автора в работу, что доказывает ключевую роль в исследованиях коллектива, связанных с биоинформатикой.

Объём и содержание диссертации полностью соответствуют теме и содержанию работы. Общая структура работы достаточно традиционна и включает введение, список условных сокращений, обзор литературы, описание использованных методов, результатов исследований и их обсуждение, заключение, выводы и список использованных источников. Особое внимание следует уделить богатому иллюстративному материалу,

представленному в диссертации. В списке использованных источников указано 278 источников.

Введение диссертации представлено на 10 страницах и в нём подробно описываются цели и задачи исследования, а также обосновывается выбор объектов и методов исследования. Во введении указывается на научную новизну, теоретическую и практическую ценности проведенного исследования, четко формулируются основные положения, которые будут вынесены на защиту.

Глава 1 обзора литературы состоит из шести разделов, среди которых отдельно стоит раздел "Современные критерии таксономических рангов бактериофагов и специализированные биоинформатические методы и инструменты". Этот раздел содержит несколько подразделов для различных типов анализа бактериофагов. Важно отметить, что глава включает в себя актуальные и интересные разделы, описывающие эволюцию вирусов и историю развития таксономии бактериофагов и их классификационной системы. Это позволяет получить представление о развитии систематики бактериофагов на разных временных срезах. Обзор литературы также уделяет внимание практическому применению бактериофагов, что дополнительно обосновывает выбор объектов исследования.

Описаны проблемы, связанные с несостоятельностью устаревших классификационных подходов, основанных на морфологических данных, которые приводят к ошибкам и появлению немонафилетичных таксонов. Подчеркнута роль современных биоинформатических методов, которые используют метагеномные данные для открытия новых групп бактериофагов.

В обзоре литературы автор демонстрирует взвешенный и профессиональный подход к поиску и анализу опубликованных материалов. Глава содержит более 130 ссылок на работы, полностью соответствующие

тематике исследования и представляющие особый интерес для требовательного читателя. Особенный интерес представляет заключительный раздел главы, в котором автор резюмирует проблемы таксономии бактериофагов и соответствующие задачи биоинформатики. Евсеев П.В. аргументирует особенности эволюции вирусов и бактериофагов, включая химерное происхождение и высокий уровень дивергенции вирусных белков.

Во второй главе диссертации детально описываются объекты и методы исследования, а также процедуры сбора данных. В более позднем разделе - третьем, который включает 11 подразделов, представлен протокол таксономического анализа, основанный на методах, рекомендованных ICTV, и собственные методы. Все этапы таксономического анализа приведены ясно и понятно. Выбранные методы являются обоснованными и разнообразными, что подчеркивает профессиональный подход автора к исследованию. Отдельное внимание следует уделить использованию актуальных баз данных автором для аннотирования фаговых геномов, включая пользовательские, как для поиска BLAST, так и для анализа, основанного на применении скрытых марковских моделей, для выявления функций, закодированных в геноме. Следует также отметить широкий спектр методов филогенетического анализа, использованных в работе, и применение новых программ и алгоритмов, включая те, которые позволяют предсказывать третичную структуру фаговых белков.

Раздел "Результаты и обсуждение" (глава 3) является ключевой частью работы и включает четыре секции с подразделами. Я оценил логику и стиль, которыми автор излагает результаты исследования, а также высокое качество иллюстраций.

Первая секция этой главы представляет результаты таксономического анализа новых бактериофагов, которые заражают фитопатогенные бактерии рода *Pectobacterium*. Отдельный подраздел посвящен анализу таксономического разнообразия фагов, которые заражают родственные бактерии *Pectobacterium* и *Dickeya* из группы "Soft Rot *Pectobacteriaceae*". Каждый новый фаг подробно проанализирован с точки зрения таксономической классификации, геномной организации, межгеномного сходства и филогенетического анализа на основе аминокислотных последовательностей консервативных белков. Предложенная таксономическая классификационная схема для фагов семейств *Autographiviridae* и *Schitoviridae* объяснена в убедительной форме. Анализ показал, что, несмотря на схожую морфологию, спектр хозяев и организацию геномов, фаги *Pectobacterium* PP47 и PP81, а также фаг Q19 принадлежат к разным группам подобных таксономических единиц. Фаги *Pectobacterium* *Possum* и *Horatius* захватывают сообщество одного и того же рода *Sbunaviruses*. Анализ таксономического разнообразия фагов, которые заражают бактерии *Pectobacterium* и *Dickeya*, продемонстрировал широкое разнообразие этих фагов и возможность уточнения их таксономической классификации.

Во втором разделе главы "Результаты и обсуждение" диссертации содержатся результаты таксономического анализа первого выделенного бактериофага, инфицирующего фитопатогенные бактерии рода *Curtobacterium*. Используя сочетание биоинформатических методов, стало ясно, что фаг *Curtobacterium* Аука может быть классифицирован как новый представитель семейства или подсемейства. Проведенное межгеномное сравнение, анализ генетической сети фага Аука и его близких родственников, а также филогенетический анализ на основе последовательности

консервативных белков выявили родство между фагом Аука и ф29-подобными фагами.

Следует отметить, что автор проделал впечатляющую работу по поиску профаговых областей, исследуя почти 200 геномов бактерий рода *Curtobacterium*. Это позволило впервые предсказать существование потенциальных умеренных фагов, найденных при помощи разных программных пакетов. Особое внимание заслуживает экспериментальное обнаружение фаговой частицы, индуцированной у одного из штаммов *Curtobacterium* коллегами автора. Также обосновано показано широкое таксономическое разнообразие потенциальных профагов и их родство с умеренными фагами актиномицетов. Анализ фаговых лизоцимов и деполимераз может иметь практическую ценность для разработки новых антибактериальных препаратов.

Третий раздел посвящен таксономическому анализу умеренного бактериофага *Pseudomonas* MD8. В работе был детально аннотирован геном, проведен анализ геномной организации и показано ее сходство с фагом λ. Выявлены близкородственные фаги, проведен интенсивный горизонтальный перенос генов, а также показаны различия в эволюционных историях консервативных белков, присутствующих во всех вирусах реалма *Duplodnaviria*.

Автором проведен тщательный филогенетический анализ для всех фаговых белков, который позволил выявить химерную структуру генома MD8. Однако, самым интересным в анализе фага MD8 является выявление автором его химерного характера и проблемы реконструкции эволюционной истории и построения классификационной схемы для подобных фагов.

Поднимаемые проблемы должны быть детально обсуждены и анализированы в дальнейшем. Результаты анализа показывают значительный

вклад автора в изучение фаговой биологии, и могут стать основой для дальнейших исследований в этой области.

В четвертом разделе главы "Результаты и обсуждение" диссертации рассматривается возможность использования программы AlphaFold2 для предсказания структур белков и реконструкции их эволюционной истории в целях таксономической классификации. Структуры белков являются более консервативными, чем последовательности, и предсказания AlphaFold2 позволяют с высокой точностью восстанавливать структуры белков, которые не были экспериментально определены. Однако, важно учитывать возможные ошибки моделирования и необходимость использования комплекса методов для анализа фагов и фаговых белков.

Интересно рассмотреть вопрос реконструкции эволюционной истории чехольных белков, вне зависимости от ее значения для таксономической классификации, которое маловероятно будет значимым. Автор диссертации провел серьезную работу по моделированию и сравнению более ста моделей и экспериментально определенных структур с использованием структурного сходства и аминокислотного состава. Предложенная автором гипотеза о полифилетичности бактериоцинов интересна и требует дальнейшего изучения. Также перспективностью для экспериментальной проверки является гипотеза о структурной роли дополнительных доменов и их участии в адсорбции бактериофагов.

Один из подразделов четвертого раздела главы "Результаты и обсуждение" описывает использование структурных предсказаний для классификации таксонов высокого ранга. Эта тема вызывает особый интерес, поскольку автор рассматривает эволюционную историю двух консервативных

белков вирусов *Duplodnaviria*, терминазы и главного капсидного белка, с помощью комплекса биоинформатических методов.

Для анализа был проведен филогенетический анализ с использованием выравниваний аминокислотных последовательностей, полученных разными алгоритмами, и сравнение структурного сходства моделей белков. Автор анализирует белки, использует представителей всех классифицированных отрядов и семейств *Duplodnaviria*, пытаясь сгруппировать семейства, объединенные в отряды.

Автор предлагает использовать структурный анализ в случаях, когда филогенетический анализ с использованием обычных выравниваний не дает достоверных результатов. Некоторые результаты, например, о близости бактериофагов семейств *Guelinviridae*, *Rountreeviridae* и *Salasmaviridae*, выглядят довольно обоснованными и подтвержденными геномными и биологическими данными.

Автор также обнаружил противоречия в существующей таксономической классификации хвостатых вирусов архей и описал эволюционную историю главного капсидного белка и терминазы этих вирусов.

Интересно сравнить точность предсказаний, сделанных двумя новыми программами - AlphaFold 2 и RoseTTAFold. В целом, результаты данного исследования являются важными для анализа эволюционной истории и классификации бактериофагов.

Диссертационная работа Евсеева П.В. вполне продемонстрировала профессиональный и творческий подход. В ней были аккуратно выбраны средства и методы исследования, а результаты анализа получились действительно информативными. В диссертации, научные положения и выводы были четко и вполне обоснованы. Главные результаты работы были

удачно опубликованы в престижных журналах и освещены на международных конференциях.

Стиль написания работы, выполненной Евсеевым П.В., был мастерски организован и очень прост к восприятию, а также хорошо иллюстрирован. Нельзя не заметить, что был проведен большой объем исследований и обработаны значительные объемы данных.

Замечания и вопросы:

1. В разделе 2.3 "Методы исследования" было хотелось бы увидеть более подробное описание алгоритмов, лежащих в основе соответствующих методов. Особенно интересует, насколько результаты, полученные данными методами, зависят от биологии источников нуклеотидных последовательностей и эвристических соображений, используемых в алгоритмах. Какова точность аппроксимации, устойчивость и сходимость использованных методов?

2. Во введении широко обсуждается таксономия бактериофагов, читается желание автора предложить новый универсальный подход к таксономии. Однако в работе не было дано прямого ответа на вопрос, должен ли новый подход быть подчинен филогенетической истории. Считает ли автор, что все таксоны должны быть монофилетическими? Также интересно, предполагает ли автор, что таксономия может в какой-то степени определяться экологическими или, например, терапевтическими свойствами бактериофагов?

Вышеупомянутые замечания не могут уменьшить значимость диссертационного исследования. Работа полностью удовлетворяет требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова для работ данного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.8 – Математическая биология, биоинформатика в соответствии с различными ее направлениями, такими как

компьютерная системная биология, математическое и компьютерное моделирование эволюционных процессов в живой природе, а также критериям, установленным в соответствии с Положением о присуждении ученых степеней Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Диссертация оформлена в соответствии с требованиями Положения о совете по защите диссертаций на получение ученых степеней кандидата и доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель, Петр Владимирович Евсеев, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8 – Математическая биология, биоинформатика.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,
научный сотрудник лаборатории вирусов микроорганизмов ФИЦ
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

БЕЛАЛОВ Илья Шамильевич
05 июня 2023 года

Контактные данные:

тел.: -

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.02.02 - Вирусология

Адрес места работы:

119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33,
строение 2

Тел.: +7 (495) 954 5283; e-mail: info@fbras.ru

Подпись сотрудника ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
Белалова И.Ш. удостоверяю:

Подпись Белалов
ЗАВЕРЯЕТСЯ
Заведующий канцелярией
«05» июня