

**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**

Диссертационная работа Евсеева Петра Владимировича посвящена вопросам использования биоинформатических методов для таксономической классификации бактериофагов с применением этих методов для классификации хвостатых бактериофагов класса *Caudoviricetes* (реалм *Duplodnaviria*). В работе также рассмотрены вопросы, касающиеся проблем таксономической классификации бактериофагов, характеризующихся мозаичной организацией генома, и возможностей использования результатов структурного моделирования для выявления глубоких эволюционных взаимосвязей между сильно дивергировавшими группами вирусов реалма *Duplodnaviria*.

Систематика вирусов, в том числе, бактериофагов – сейчас бурно развивающаяся область биологических наук. Построение обоснованной таксономической иерархии прокариотических вирусов – задача, которая в последние десятилетия решается, в первую очередь, на основании геномных данных биоинформатическими методами. Таксономическая классификация вирусов – прерогатива Международного комитета по классификации вирусов (ICTV), который в своих решениях обосновывается на результатах вирусологических исследований. Подавляющее большинство известных бактериофагов, в первую очередь хвостатых фагов класса *Caudoviricetes*, ICTV не классифицировано, а существенная часть классифицированных фагов классифицирована на уровне родов или подсемейств. Неудовлетворительная



ситуация с классификацией известных ранее бактериофагов сопровождается появлением новых задач по построению обоснованной классификационной схемы, связанных с последними открытиями новых вирусных групп. В связи с этим важность, **актуальность и новизна поставленных и решенных в работе задач, как и работы в целом, не вызывают никаких сомнений.**

Таксономическая классификация впервые выделенных бактериофагов, в том числе инфицирующих фитопатогенные бактерии, с точки зрения целеполагания представляет самодостаточную задачу, как и анализ таксономического разнообразия профаговых областей и известных фагов, расширяя наши представления о многообразии бактериофагов. Большое значение имеет изучение эволюционных взаимосвязей между фагами, относящимися к сильно дивергировавшим высокоранговым таксонам. В работе отдельное внимание уделено филогенетическим методам анализа с использованием разнообразных подходов и методов, раскрывающих эволюционные связи между различными таксономическими группами бактериофагов. Поэтому выполненная работа **убедительно показывают свою теоретическую и практическую значимость. Степень достоверности** данных обосновывается выбором современных биоинформатических методов, объемом проведенных исследований, **восемью публикациями** в высокорейтинговых журналах (в том числе пятью в Q1), в большинстве которых Евсеев П.В. является первым автором, докладами на пяти международных и всероссийских конференциях, и не вызывают сомнения. Также во введении описан **личный вклад** автора, подтверждающий его ключевую роль в работе над диссертацией и биоинформатической составляющей публикаций.

Объем и содержание диссертации полностью соответствуют содержанию работы. Общая структура работы достаточно традиционная – диссертация состоит из введения, списка условных сокращений, обзора



литературы, описания использованных методов, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Следует отметить богатый иллюстративный материал, представленный в диссертации. Всего работа изложена на 246 страницах, содержит 6 таблиц, 103 рисунка, 6 приложений. Список литературы включает 278 источников.

**Введение** диссертации изложено на 10 страницах, в нем детально описываются поставленные цели и задачи исследования, а также обосновывается выбор объектов и методов исследования. Во введении указаны научная новизна, теоретическая и практическая ценности исследования, четко формулируются основные положения, выносимые на защиту.

**Обзор литературы** (глава 1) состоит из шести разделов, включая раздел «Современные критерии таксономических рангов бактериофагов и специализированные биоинформатические методы и инструменты», включающий несколько подразделов для разных типов анализа бактериофагов. Важно, что глава включает в себя актуальные и интересные разделы, описывающие эволюцию представлений о вирусах и историю развития таксономии бактериофагов и их классификационной схемы, что позволяет получить представления о развитии систематики бактериофагов в динамике на разных временных срезах. Также в обзоре литературы уделено отдельное внимание практическому применению бактериофагов, что дополнительно обосновывает выбор объектов исследования. В обзоре описаны проблемы, демонстрирующие несостоятельность устаревших классификационных подходов, основанных на использовании морфологических данных, приводящих к ошибочному появлению немонафилетичных таксонов. Подчеркивается роль современных биоинформатических методов, использующих метагеномные данные для открытия новых групп бактериофагов.



Обзор литературы демонстрирует взвешенный и профессиональный подход автора к поиску и анализу опубликованных материалов. Глава содержит ссылки на более 130 работ, в целом, полностью соответствующих тематике исследования и, что важно отметить, иногда представляющих отдельный интерес для требовательного и эрудированного читателя. Отдельный интерес представляет заключительный раздел главы, в котором убедительно резюмируются проблемы таксономии бактериофагов и соответствующие задачи биоинформатики. В этом разделе аргументированно указаны особенности эволюции вирусов и бактериофагов, в частности, включая химерное происхождение и высокий уровень дивергенции вирусных белков.

Глава 2 диссертации содержит описание **объектов и методов исследования** и процедуры сбора данных. В последнем, третьем разделе, включающем 11 подразделов, описан использованный протокол таксономического анализа с применением методов, рекомендованных ICTV, и сами методы. Все стадии таксономического анализа описаны четко и понятно. Обоснованность выбранных методов не вызывает сомнения, а их разнообразие подчеркивает профессиональный подход автора к выполнению работы. Отдельно отмечу использование автором для аннотирования фаговых геномов разнообразных актуальных баз данных, включая пользовательские, как для поиска BLAST, так и для анализа, основанного на применении скрытых марковских моделей, для выявления функций кодируемых в геноме белков. Следует также отметить широкий репертуар методов филогенетического анализа, использованных в работе, и применение новых программ и алгоритмов, в том числе, предсказывающих третичную структуру фаговых белков.

**Результаты и обсуждение** (глава 3) является основной частью работы и включает четыре раздела с подразделами. Мне очень понравилась логика и



авторский стиль изложения результатов исследования, впечатлил высокий уровень и качество иллюстраций.

Первый раздел главы содержит результаты таксономического анализа новых бактериофагов, инфицирующих фитопатогенные бактерии рода *Pectobacterium*, и отдельный подраздел, посвященный анализу таксономического разнообразия бактериофагов, инфицирующих родственные бактерии *Pectobacterium* и *Dickeya*, относимые к группе «Soft Rot *Pectobacteriaceae*». Для всех новых фагов подробно представлены результаты детального таксономического анализа, включая анализ геномной организации, межгеномного сходства, филогенетический анализ на основе аминокислотных последовательностей консервативных белков. Убедительно обоснована предложенная таксономическая классификационная схема как для фагов семейства *Autographiviridae*, так и для фагов семейства *Schitoviridae*. Установлено, что несмотря на схожую морфологию, спектр хозяев и организацию геномов, фаги *Pectobacterium* PP47 и PP81, с одной стороны, и фаг Q19, с другой, относятся к разным близким таксономическим группам, а фаги *Pectobacterium* Possum и Horatius являются представителями семейства одного рода *Cbunaviruses*. Анализ таксономического разнообразия фагов, инфицирующих бактерии *Pectobacterium* и *Dickeya*, указал на широкое разнообразие этих фагов и возможность уточнения их таксономической классификации.

Второй раздел главы «Результаты и обсуждение» диссертации содержит результаты таксономического анализа первого выделенного бактериофага, инфицирующего фитопатогенные бактерии рода *Curtobacterium*. Комплекс использованных биоинформатических методов однозначно указал на то, что фаг *Curtobacterium* Аука может быть классифицирован как представитель нового семейства или подсемейства. Результаты межгеномного сравнения, анализа генетической сети фага Аука и родственных фагов и



филогенетического анализа с использованием последовательностей консервативных белков также убедительно указывают на родство фага Аука и ф29-подобных фагов.

Отмечу масштабную и впечатляющую работу, проделанную автором по поиску профаговых областей с использованием почти 200 геномов бактерий рода *Curtobacterium*. В результате этой работы также впервые было предсказано существование нескольких десятков потенциальных умеренных фагов, обнаруженных с помощью разных программных пакетов. Особого внимания заслуживает дальнейшее экспериментальное обнаружение фаговой частицы, индуцированной из одного из штаммов *Curtobacterium* коллегами автора. Обоснованно показано широкое таксономическое разнообразие потенциальных профагов и их родство с умеренными фагами актиномицетов. Выполненный анализ фаговых лизоцимов и деполимераз может иметь практическое значение для разработки новых антибактериальных препаратов.

Третий раздел посвящен таксономическому анализу умеренного бактериофага *Pseudomonas* MD8. Детально аннотирован геном, проанализирована геномная организация и показано ее сходство с таковой у фага λ. Следует отметить убедительный анализ среднегеномного сходства фага MD8, проведенный с использованием около 15 тысяч фаговых геномов, содержащихся в базе данных GenBank, что позволило выявить и сравнить между собой фаги, близкородственные MD8. Однако, самое интересное в анализе фага MD8 – это выявленный автором химерный характер его генома и разная эволюционная история двух консервативных белков, присутствующих во всех вирусах реалма *Duplodnaviria*. Автор показал интенсивные горизонтальные переносы с участием фага MD8 и родственных фагов, а также существование проблем реконструкции эволюционной истории и построения классификационной схемы для подобных фагов. Поднятые проблемы, действительно, должны детально обсуждаться и анализироваться в



дальнейшем. Отмечу сделанный в работе тщательный филогенетический анализ для всех фаговых белков, который позволил выявить химерную структуру генома MD8.

Четвертый раздел главы «Результаты и обсуждение» диссертации посвящен использованию программы предсказания структуры белков AlphaFold2 для реконструкции их эволюционной истории в целях таксономической классификации. Мне понравилась эта идея, так как структуры, действительно, более консервативны, чем последовательности, но экспериментально определенных структур фаговых белков не так много, а точность предсказаний AlphaFold2 во многих случаях довольно велика. Тем не менее, надо учитывать возможные ошибки моделирования и очень хорошо, что диссертант детально рассматривает вопросы точности и проблем предсказаний и необходимости учитывать их с комплексом других методов характеристики фагов и фаговых белков.

Реконструкция эволюционной истории чехольных белков интересна независимо от ее значения для таксономической классификации, которое вряд ли может быть существенным. Для этой части диссертации была проделана серьезная работа с моделированием и сравнением с использованием структурного сходства и аминокислотного состава более 100 моделей и экспериментально определенных структур. Предположения автора о полифилетичности бактериоцинов выглядят интересными и нуждаются в дальнейшем изучении. Также интересной и перспективной для экспериментальной проверки выглядит гипотеза о структурной роли дополнительных доменов и их участии в адсорбции бактериофагов.

Подраздел четвертого раздела главы «Результаты и обсуждение», посвященный использованию структурных предсказаний для классификации таксонов высокого ранга вызывает особый интерес. Автор рассматривает возможную эволюционную историю двух консервативных белков вирусов



*Duplodnaviria*, терминазы и главного капсидного белка, с помощью комплекса биоинформатических методов, включая сравнение структурного сходства полученных моделей белков и филогенетический анализ с использованием выравниваний аминокислотных последовательностей, полученных разными алгоритмами. Пытаясь сгруппировать семейства, не объединенные в отряды, автор анализирует белки, использует представителей всех классифицированных отрядов и семейств *Duplodnaviria*. Автор предлагает использовать структурный анализ в случаях, когда филогения с использованием обычных выравниваний не дает надежных результатов. Интересно отметить, что на небольших эволюционных дистанциях анализ структурного сходства подтвердился филогенетическим анализом на основе аминокислотных последовательностей. Некоторые выводы диссертанта, например, о близости бактериофагов семейств *Guelinviridae*, *Rountreeviridae* и *Salasmaviridae* выглядят довольно обоснованными и подтвержденными геномными и биологическими данными. Ряд других предположений также вызывает интерес и может быть полезен для анализа эволюционной истории и классификации бактериофагов. Важным наблюдением автора являются обнаруженные противоречия в существующей таксономической классификации хвостатых вирусов архей и эволюционной истории главного капсидного белка и терминазы этих вирусов. Также представляются интересными результаты сравнения точности предсказаний, сделанных двумя новыми программами – AlphaFold 2 и RoseTTAFold.

В диссертационной работе Евсеева П.В. в полной мере показан профессиональный и творческий подход как в выборе средств и методов исследования, так и в анализе полученных результатов. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, полностью обоснованы. Основные результаты диссертации опубликованы в высокорейтинговых научных



журналах и представлены на международных конференциях. Диссертация написана грамотным литературным языком и отлично иллюстрирована. Следует отметить большой объем выполненных исследований и обработанных данных.

#### Замечания и вопросы:

1. В рукописи присутствуют единичные опечатки.
2. В списке сокращений перевод с английского языка присутствует не для всех терминов.
3. Описание особенностей эволюции вирусов, приводящих к возникновению проблем в таксономической классификации, могло занимать бóльшую по размеру часть литературного обзора. Также хотелось бы увидеть примеры изменения таксономической классификации бактериофагов на примере модельных фагов, например, *Escherichia* T4, T7 и  $\lambda$ . Было бы интересно получить комментарии автора по проблемам классификации, предположительно, рано дивергировавших гигантских фагов.
4. К сожалению, несмотря на исчерпывающий список методов исследования, в работе отсутствует описание методики создания пользовательских баз данных.
5. Карта генетической сети приведена только для фага *Curtobacterium* Аука.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.8 – Математическая биология, биоинформатика (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в



Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

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

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,  
профессор кафедры вирусологии биологического факультета  
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова»

НИКИТИН Николай Александрович  
30 мая 2023 года

Контактные данные:

тел.: 7 (495) 939 5367, e-mail:

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

Адрес места работы:

119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12  
Тел.: +7-(495)-939-15-18; e-mail: info@mail.bio.msu.ru

Подпись сотрудника ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» Никитина Н.А. удостоверяю:

Ученый секретарь, зав. научно-  
организационным отделом  
Биологического факультета М

Е.В. Петрова