

## ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертационную работу **Дьячковой Марины Сергеевны**  
**«Сравнительный эволюционный и функциональный анализ генов**  
**клUSTERА PFNA у представителей рода *Bifidobacterium*»,**

представленной на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 — генетика

Диссертационная работа Дьячковой посвящена изучению механизмов адаптации бифидобактерий к условиям желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) различных животных, являющегося их естественной экологической нишей, и поиску экспериментальных подходов для проверки моделей механизмов передачи сигналов при взаимодействия бифидобактерий с клетками эпителия ЖКТ.

Род *Bifidobacterium* характеризуется широким разнообразием занимаемых различными видами экологических ниш и строгой ассоциацией между определенными видами и подвидами бифидобактерий и источниками их выделения.

Бифидобактерии, являясь важным компонентом нормальной комменсальной микробиоты ЖКТ человека и других животных, выполняют ряд ключевых функций, важных для организмов хозяев, включая метаболическую, антагонистическую и иммуногенную функции. В процессе колонизации ЖКТ различных организмов бифидобактерии адаптируются к условиям ЖКТ этих организмов, конкурируют с другими представителями густонаселенного микробного сообщества ЖКТ. Учитывая, что функционирование бифидобактерий важно для организма хозяина, следует ожидать существование механизмов их эффективной адаптации к условиям ЖКТ и взаимодействия с клетками эпителия, в т.ч. реагирования на воспалительные процессы, стрессовые состояния организма хозяина.

В настоящее время актуальной прикладной задачей является выявление и использование потенциальных возможностей комменсальной микробиоты и, в частности, бифидобактерий, для повышения устойчивости человека и животных к инфекционным заболеваниям, корректировки нарушений пищеварения, повышению иммунитета, что непосредственно связано с адаптацией бифидобактерий к условиям ЖКТ.

Значительный фундаментальный интерес представляет изучение механизмов взаимодействия микроорганизмов комменсальной микробиоты с клетками эпителия ЖКТ, изучение генетической адаптации

микроорганизмов микробиоты к особенностям условий ЖКТ различных животных.

Таким образом, общее выбранное в диссертационной работе направление исследований актуально как для решения прикладных, так и теоретических задач.

Конкретным объектом исследований был выбран кластер генов PFNA, характерный для бифидобактерий различных видов, в состав которого входит протеинкиназа СТПК Pkb2.

Этот выбор связан с тем, что протеинкиназы бактерий потенциально могут участвовать во взаимодействии бактериальной клетки с клетками эпителия хозяина. Логичным является предположение, что и гены, входящие в общий кластер с протеинкиназой, также могут участвовать во взаимодействии бактерий с клетками хозяина.

Ранее в геномах бифидобактерий обнаружены и охарактеризованы шесть СТПК, среди которых наибольший интерес представляет видоспецифическая СТПК Pkb2, демонстрирующая аномально высокий уровень дивергенции последовательностей различных видов по сравнению с другими охарактеризованными СТПК. Анализ субстратов фосфорилирования позволил выдвинуть предположение, что функции СТПК Pkb2 могут быть связаны с адгезией и коммуникацией бифидобактерий с эпителиальными клетками кишечника.

**Целью настоящей работы** являлась функциональная характеристика и анализ молекулярной эволюции генов кластера PFNA у представителей различных видов рода *Bifidobacterium*. Для достижения поставленной цели были сформулированы **задачи** по структурно-функциональной характеристике кластера PFNA, а также изучению молекулярной эволюции последовательностей генов кластера в геномах представителей различных видов бифидобактерий, исследованию транскрипционной организации кластера PFNA в геноме *B. longum* GT15, оценке уровня экспрессии гена *fn3* в геномах ряда штаммов различных бифидобактериальных видов, изучению функциональной активности и субстратной специфиности СТПК Pkb2 штаммов *B. longum* GT15 и *B. choerinum* DSM 20434, а также изучению влияния провоспалительного цитокина IL-6 на рост и экспрессию генов штамма *B. longum* GT15.

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста, включая 14 страниц Приложений, содержит 30 рисунков, 19 таблиц и состоит из следующих глав-разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Список цитируемых литературных источников включает 179 наименований, из которых 177 – на английском языке.

**В Обзоре литературы (Глава 1)** представлен анализ современного состояния исследований в области генетики, геномики и экологии бифидобактерий как компонента комменсальной микробиоты человека и других животных (разделы 1.1 и 1.2), изложены представления об известных молекулярных механизмах коммуникации микроорганизмов с факторами занимаемой экологической ниши в организме хозяина (раздел 1.3), а также современные представления о быстрой молекулярной эволюции генов как инструменте адаптации к средовым факторам (раздел 1.4).

**В Материалах и методах (Глава 2)** подробно изложены используемые автором экспериментальные и биоинформационные методики и подходы, что соответствует предъявляемым к диссертационным работам критериям воспроизводимости. Помимо описания методик, автором представлены наглядные схемы комплексных экспериментов. Использованные в работе методы характеризуются широким разнообразием, включая в себя классические методы микробиологии и культивирования бактерий, молекулярно-генетические методы, в том числе, выделение нуклеиновых кислот, полногеномное секвенирование и секвенирование РНК, классическая ПЦР и ПЦР в реальном времени, методы молекулярного клонирования и другие, биохимические методы и биоинформационные методы. Умелый выбор и использование диссидентантом разнообразных современных экспериментальных методов, корректная интерпретация полученных результатов свидетельствует о способности диссидентанта самостоятельно планировать и на высоком научно методическом уровне выполнять весь комплекс работ, требующихся для получения ответов на поставленные сложные научные задачи.

Описание проведенных работ и обсуждение полученных результатов достаточно подробно описаны в **Главе 3**.

### **Замечания и комментарии**

Автору, в целом, удалось получить ответы на поставленные вопросы.

На основе анализа первичной последовательности кластера PFNA штаммов различных видов показана стабильность состава кластера и высокая степень межвидовой дивергенции, что расценивается автором как свидетельство адаптации генов кластера к особенностям ЖКТ хозяев и, в частности, эпителиальных клеток хозяев, с которыми взаимодействуют бактериальные клетки. Для одного из анализируемых штаммов бифидобактерий проведен анализ оперонной организации генов кластера, свидетельствующей о комплексной регуляции их транскрипции.

Умение делать выводы из полученных результатов автор продемонстрировал, в частности, сопоставив полученные им данные о множественных изменениях нуклеотидных последовательностей генов кластера PFNA различных видов бифидобактерий и известной информации о том, что различные виды бифидобактерий специфичны для различных

организмов хозяев. Результатом этого анализа стало аргументирование высказанного предположения о существовании продолжительного положительного отбора, связанного с адаптацией различных видов бактерий к различным хозяйственным организмам.

Существенный научный интерес может представлять впервые экспериментально продемонстрированная автором функциональная активность полноразмерных СТПК Pkb2 представителей видов *B. longum* subsp. *longum* и *B. choerinum*, субстратная видоспецифичность для СТПК Pkb2 *B. longum* subsp. *longum* GT15 и ее отсутствие для СТПК Pkb2 *B. choerinum* DSM 20434.

Не все используемые автором экспериментальные результаты в равной степени позволили сделать какие-либо общие научные выводы. Так значительный объем работ был связан с анализом транскрипции гена *fn3* изучаемого кластера в различных видах бифидобактерий и изучением зависимости экспрессии генов кластера и роста бифидобактерий от воздействия на клетки прововоспалительного цитокина IL-6. Ген *fn3* привлек внимание автора тем, что его продуктом является протяженный белок, содержащий мотивы, характерные для цитокиновых рецепторов. Цитокины, в свою очередь, могут являться переносчиками сигналов о состоянии организма хозяина, в частности воспалительных процессов, и регулировать развитие бифидобактерий.

Автором продемонстрирована значительная вариация экспрессии гена *fn3* в условиях опытов у штаммов 9-ти различных видов бифидобактерий и не обнаружено какого-либо влияния цитокина IL-6 на транскрипцию генов оперона PFNA и рост бифидобактерий. В то же время, в опытах по анализу экспрессии генов автор продемонстрировал владение современными методиками анализа транскрипции генов с использованием флуоресцентного репортера, а в ходе анализа последствий воздействия цитокина на клетки бифидобактерий обнаружен эффект зависимости от цитокинов экспрессии других генов бифидобактерий, исследования которых в дальнейшем может быть важным для понимания механизмов передачи сигналов о состоянии организма хозяина бифидобактериям и роли бифидобактерий в защите организма хозяина от инфекций, вызывающих воспалительные процессы.

Диссертационная работа не вызывает существенных замечаний. В качестве дискуссионных вопросов можно отметить следующее: в ходе обсуждения причин обнаруженной вариабельности генов кластера PFNA автор считает очевидным, что вариабельность генов бактерий комменсальной микробиоты, функционально связанных с адаптацией к хозяйственному организму, объясняется постоянной, по терминологии автора, «гонкой вооружений» по приобретению устойчивости клетками хозяина к бактериям и преодолению бактериями возникающей устойчивости.

Подобная гипотеза кажется спорной, т.к. для позитивного отбора приобретаемая устойчивость клеток хозяйственного организма должна быть

связана с какими-либо преимуществами отбираемых мутантных вариантов, а комменсальная микробиота наоборот является полезной для организма и ее отсутствие будет вредным для хозяйственного организма. Более логичным кажется объяснение вариабельности адаптационных генов различных видов бифидобактерий их специфичностью к различным хозяевам.

Большинство из сформулированных автором выводов можно скорее отнести к результатам, из них можно попытаться дополнительно сделать какие-либо теоретические или практические выводы.

В целом, диссертация хорошо оформлена и логично изложена. Результаты и положения диссертации были опубликованы в четырех статьях международных рецензируемых изданий и двух сборниках тезисов российских и международных конференций, что свидетельствует о признании работ автора диссертации профессиональным научным сообществом. Представленная диссертация является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на хорошем научном и методическом уровне с очевидными перспективами дальнейших исследований в данной актуальной теме. Полученные результаты достоверны, автореферат полностью отражает основные полученные результаты диссертационного исследования.

Таким образом, данная диссертационная работа по уровню теоретической значимости, объему и качеству проведенных исследований, научной новизне и актуальности отвечает критериям, сформулированным в п. 9 Раздела II «**Положения о порядке присуждения ученых степеней**», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013г. с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», а ее автор — Дьячкова Марина Сергеевна, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 — генетика.

Директор Биоресурсного центра –  
Всероссийская коллекция промышленных  
микроорганизмов (БРЦ ВКПМ), НИЦ «Курчатовский институт» –  
ГосНИИгенетика.  
д.б.н., профессор  
117545, Россия, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1.  
Телефон: +7 (495) 314-26-95, e-mail: sineoky@genetika.ru

Подпись С.П. Синеокого заверяю:  
Учёный секретарь НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика

к.х.н.

« 3 » декабря 2019 года

