

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Роспотребнадзора,

доктор биологических наук


Р.А. Максютков

» ноября 2018 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности диссертации

Ри Натальи Александровны

на тему «Анализ молекулярных механизмов утилизации нитрита в
клетке *Escherichia coli* методами математического моделирования»

на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.09 – математическая биология,

биоинформатика.

Актуальность избранной темы

Диссертационная работа Ри Натальи Александровны посвящена исследованию особенностей организации и функционирования нитритной респираторной цепи бактерии *E. coli* с помощью методов математического моделирования. Исследование взаимосвязи между структурно-функциональной организацией генных сетей и их динамическими свойствами является важной фундаментальной научной проблемой. В качестве предмета исследования автором выбран метаболический путь утилизации нитрита кишечной палочкой, одного из самых известных представителей кишечной микрофлоры. Помимо фундаментального научного значения изучение структуры и регуляторных механизмов,

определяющих динамические особенности нитритной респираторной *E. coli*, является актуальной задачей и с практической точки зрения, поскольку исследуемый метаболический путь характерен для патологических процессов, возникающих при попадании кишечной палочки в мочеполовую систему, и нитрит утилизирующий путь может стать мишенью для воздействия при ликвидации последствий воспалительного процесса. Кроме того, нитрат-нитритная респираторная система у *E. coli* и близких к ней видов бактерий играет определенную роль в патологических процессах, связанных с развитием раковых опухолей

Теоретическая и практическая значимость исследования

Диссертационная работа представляет большой интерес для решения важных фундаментальных вопросов метаболизма. Материалы о структурной организации цепи переноса электронов с формата на нитрит, а также о теоретически доказанном механизме регуляции скорости утилизации нитрита за счет действия мембранного потенциала на транспорт субъединиц периплазматической нитритредуктазы через мембрану, представленные в диссертационной работе, являются ценным теоретическим материалом для дальнейшего экспериментального исследования. Разработанные модели могут служить основой для теоретического изучения таких сложных процессов, как например, воспаление, связанное с бактериальной инфекцией.

Математические модели утилизации нитрита клетками *E. coli*, разработанные в ходе выполнения диссертационной работы, подробно описаны в соответствующих публикациях, которые находятся в открытом доступе и могут быть использованы другими исследователями, а также послужить материалом для лекций по математическому моделированию биологических процессов. Часть подмоделей, описывающих отдельные процессы в метаболическом пути утилизации нитрита, представлены в базе данных MAMMOTH [Kazantsev et al., 2017] и доступны на сайте <http://mammoth.biomodulsgroup.ru>.

Результаты исследования могут быть использованы в Институте цитологии и генетики СО РАН, Институте микробиологии РАН, на факультете естественных наук НГУ и в других профильных научных и производственных организациях.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором впервые изучены динамические аспекты функционирования респираторной системы анаэробного нитритного дыхания в условиях стационарного роста клеток *E. coli* при недостатке глюкозы с помощью методов математического моделирования и впервые выявлен новый, не описанный в литературных источниках, механизм регуляции нитрит-утилизирующей активности при концентрациях субстрата, характерных для естественных мест обитания энтеробактерий.

В работе были предложены два сценария пути передачи электронов от формата к нитриту в дыхательной цепи *E. coli*, при этом автор опирался на известные косвенные данные об особенностях экспрессии оперонов, кодирующих субъединицы гидрогеназ и форматдегидрогеназ.

Высказана гипотеза, что дополнительная нитрит-утилизирующая активность в области концентраций нитрита в среде менее 1 мМ может быть реализована за счет локального изменения концентрации периплазматической Nrf нитритредуктазы при переходе из цитоплазмы в периплазму под действием мембранного потенциала, формирование которого является следствием активности ферментов респираторной цепи. Было продемонстрировано, что мембранный потенциал, независимо от сценария его формирования, является достаточным механизмом регуляции активности респираторной периплазматической Nrf редуктазы, обеспечивающим корректное описание кинетики утилизации нитрита при культивировании в условиях хемостата.

Структура диссертационной работы

Диссертация построена по традиционному плану и изложена на 155 страницах печатного текста и состоит из введения, литературного обзора и заключения к нему, описания материалов и методов, двух глав с описанием результатов моделирования, заключения, выводов и списка литературы; содержит 8 таблиц и 27 рисунков. Список цитированной литературы содержит 237 источников.

Во введении автор убедительно обосновывает актуальность теоретических исследований механизмов функционирования респираторной системы *E. coli* в условиях анаэробного дыхания на нитрите и вкладе отдельных компонентов этой системы в кинетику утилизации нитрита методами математического моделирования. Цели и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно и соответствуют теме диссертационной работы.

В первой главе, посвященной обзору литературы, излагается подробное описание структурно-функциональной организации респираторной системы *E. coli* с детальным описанием особенностей системы утилизации нитрита. Отдельное внимание уделяется известным на данный момент регуляторным механизмам. Также приводится обзор современных методов математического моделирования и анализ существующих математических моделей, посвященных изучению процессов дыхания как в бактериальных клетках, так и в митохондриях эукариот. Всесторонний обзор научной литературы наряду с глубоким анализом демонстрирует широкий научный кругозор автора и представляет самостоятельную ценность.

Во второй главе в части, посвященной методам расчета и анализа, описаны принципы сбора моделей из элементарных подсистем, а также приводится описание используемых функций. В этой главе описываются разработанные автором кинетические модели M1 и M2 процессов утилизации нитрита бактериальными клетками при культивировании в условиях хемостата. На основе результатов расчетов по модели M1 были

исследованы особенности функционирования системы транспорта нитрита и его цитоплазматическая утилизация и продемонстрирована достаточность известных механизмов в области концентрации нитрита более 2 мМ. Результаты моделирования в области низких концентраций нитрита позволили автору выявить существование дополнительной нитрит-утилизирующей активности. Натальей Александровной были рассмотрены различные гипотезы природы данной активности и в результате многочисленных численных экспериментов была выдвинута гипотеза о том, что концентрация фермента повышается за счет влияния мембранного потенциала на транспорт в периплазму Nrf редуктазы. Автором была разработана более сложная модель M2, которая позволила подтвердить возможность этого механизма.

Третья глава посвящена исследованию структуры цепи переноса электронов с донора – формата на акцептор – нитрит. Основываясь на косвенных данных, автором были предложены два сценария формирования дыхательной цепи, которые были описаны в математических моделях M2/3 и M2/4. На основании результатов расчетов автор теоретически подтверждает вклад мембранного потенциала в общую нитрит-утилизирующую активность.

В заключении подводятся итоги выполненного исследования и описываются основные результаты. Достоверность полученных автором выводов не вызывает сомнений, поскольку они основываются на результатах расчетов детальных кинетических моделей, адаптированных к экспериментальным данным, опубликованным в научной литературе. Методы моделирования, в частности, использование обобщенных функций Хилла и принцип построения модели из базы элементарных подмоделей, использованные автором, успешно применялись ранее при создании моделей других метаболических систем.

В диссертационной работе все модели адаптированы к имеющимся экспериментальным данным и детально описаны, необходимые параметры

представлены в виде таблиц, а результаты расчетов – представлены наглядно в виде графиков. Основные результаты были опубликованы в пяти статьях, в рецензируемых научных журналах, входящих в список ВАК, а также были представлены на международных научных конференциях.

Замечания

В работе, однако, имеются и некоторые недостатки. В тексте присутствует большое количество сокращений, но полный список сокращений не приводится. Иногда наряду с сокращенными русскими названиями встречались аналогичные обозначения на английском, например, диметилменахинон: DMK и ДМХ, никотинамидадениндинуклеотид: НАДН и NADH, диметилсульфоксид: ДМСО и DMSO. Встречаются стилистические ошибки, например, повторение слов в одном предложении – на стр. 47: «впервые в биологии подобного вида функции были использованы Хиллом, который использовал степенную функцию вида...». В названиях белков и белковых комплексов порядок слов часто соответствует грамматике английского языка, например: «... цитоплазматической NirB редуктазы...», «... ингибирующего эффектора ArgA фактора на...», «... через Tat систему белков...». Присутствуют и другие шероховатости перевода, например: «... показали активирование экспрессии...». Часто встречающееся выражение «дыхание на нитрите», на мой взгляд, лучше было бы заменить на «нитритное дыхание». В тексте и на ряде рисунков (например, рис. 24) не указан заряд некоторых ионов. Попадаются опечатки и пунктуационные ошибки, правда, очень немногочисленные.

Однако все указанные выше замечания носят рекомендательный характер и несколько не умаляют научной значимости представляемой работы и полученных результатов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тема диссертационной работы Ри Н.А. «Анализ молекулярных механизмов утилизации нитрита в клетке *Escherichia coli* методами математического моделирования» соответствует научной специальности 03.01.09 - математическая биология, биоинформатика. Работа посвящена решению актуальных задач, связанных с моделированием динамики бактериальных метаболических процессов с использованием современных подходов математического моделирования. Научная новизна положений, выносимых на защиту, не вызывает сомнений. Полученные в ходе выполнения диссертационной работы научные и практические результаты полностью соответствуют поставленным целям. Содержание диссертации должным образом отражено в автореферате и в опубликованных работах. Выводы диссертации носят конкретный характер и адекватно отражают полученные результаты.

Представленная работа была апробирована на многих международных конференциях, материалы диссертации опубликованы в пяти статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК.

Наталья Александровна продемонстрировала способность к глубокому системному анализу биологических процессов наряду с высокой квалификацией в области математического моделирования и информационных технологий. Текст диссертации написан грамотным научным языком.

Таким образом, работа Ри Н.А. «Анализ молекулярных механизмов утилизации нитрита в клетке *Escherichia coli* методами математического моделирования» полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени – кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика.

Отзыв на диссертацию и автореферат Ри Натальи Александровны
обсужден и принят на заседании Ученого совета Федерального бюджетного
учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и
биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека» (Протокол № 9 от 09.11
2018 г.).

Кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
теоретического отдела,

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Д.В. Антонец

Подпись Д.В. Антонца заверяю

Ученый секретарь

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

кандидат биологических наук, доцент



О.А. Плясунова

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный
центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по
надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека»

630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово,

+7(383)336-60-10

antonec@yandex.ru