

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 003.011.01  
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО  
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО  
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»  
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ  
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Дата защиты 20 ноября 2018 г. протокол № 31

О присуждении Ри Наталье Александровне  
ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация Ри Н. А. «Анализ молекулярных механизмов утилизации нитрита в клетке *Escherichia coli* методами математического моделирования» по специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика, принята к защите 17.09.2018 г, протокол № 24, диссертационным советом Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», (630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10). Диссертационный совет Д 003.011.01 утвержден ВАК 15.01.2010, приказ ВАК № 1-7 и переутвержден Министерством образования и науки РФ 11.04.2012 года, приказ № 105/нк.

**Соискатель:** Ри Наталья Александровна, 1985 года рождения. В 2007 году окончила Новосибирский государственный университет, Новосибирск. С 01.10.2007 г. по 28.09.2018 Ри Н. А. обучалась в очной аспирантуре ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск.

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярно-генетических систем Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

**Научный руководитель:** Хлебодарова Тамара Михайловна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, ведущий научный

сотрудник лаборатории молекулярно-генетических систем ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Официальные оппоненты:

1. **Щербаков Дмитрий Юрьевич** - доктор биологических наук, заведующий лабораторией геносистематики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН), г. Иркутск
2. **Козлов Константин Николаевич**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Институт прикладной математики и механики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (ФГАОУ ВО «СПбПУ»)), г. Санкт-Петербург

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация:** Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. В своём положительном заключении, подписанном к.б.н. , с.н.с. теоретического отдела ФБУН ГНЦ «Вектор» Роспотребнадзора Антонец Д. В. и утвержденным Генеральным директором ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, д.б.н. Максютковым Р. А., указано, что «Диссертация Ри Натальи Андреевны «Анализ молекулярных механизмов утилизации нитрита в клетке *Escherichia coli* методами математического моделирования» является законченной научно-исследовательской работой, имеющей научно-практическое значение в области метаболомики. По актуальности темы, новизне результатов, теоретической и практической

значимости результатов диссертационная работа соответствует критериям пп.9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемого к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Считаем, что автор диссертации – Ри Наталья Александровна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика. 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» обсужден на заседании Ученого совета ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» 1 ноября 2018 г (протокол №9 от 1 ноября 2018)».

Соискатель имеет всего 15 публикации, из них 13 - по теме диссертации, общим объёмом 106 страниц, в том числе 5 статей, опубликованных в научных рецензируемых изданиях, (Scopus, WoS) и 8 тезисов в материалах всероссийских и международных конференций.

Наиболее значительные статьи по теме диссертации:

1. Ри Н.А., Лихошвай В.А., Хлебодарова Т.М. Мембранный потенциал как механизм регуляции активности периплазматической нитритредуктазы: математическая модель // Матем. Биол. Биоинформ. – 2018. – Т. 13. – №2. – С. 238-269 (Scopus, WoS)
2. Khlebodarova T.M., Ree N.A., Likhoshvai V.A. On the control mechanisms of the nitrite level in *Escherichia coli* cells: the mathematical model // BMC Microbiol. – 2016. – V. 16 (Scopus, WoS)
3. Ри Н.А, Лихошвай В.А., Хлебодарова Т.М. О механизмах утилизации нитрита клетками *Escherichia coli* при культивировании их в условиях стационарного роста // Матем. Биол. Биоинформ. – 2015. – Т.10. – №1. – С. 193-205 (Scopus, WoS)

4. Хлебодарова Т.М., Когай В.В., Акбердин И.Р., Ри Н.А., Фадеев С.И., Лихошвай В.А., Моделирование утилизации нитрита клетками *Escherichia coli*: анализ потоков // Матем. Биол. Биоинформ. – 2013. – Т.8. – №1. – С. 276-294 (Scopus, WoS)

На диссертацию и автореферат поступило 10 отзывов, все положительные. Отзывы прислали:

1. Ваганов А.В. – к.б.н., доцент кафедры ботаники ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет» (г. Барнаул).
2. Бажан С.И. – д.б.н., заведующий теоретическим отделом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (р.п. Кольцово)
3. Векшин Н.Л. – д.б.н., ведущий научный сотрудник Института Биофизики клетки РАН ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Российской академии наук» (г. Пущино)
4. Иляскин А.В. –к.б.н., Университет Эрлангена-Нюрнберга (г. Эрланген, Германия). «По автореферату можно высказать замечания. Приведенная на рис. 2 относительная активность белка NrfA в зависимости от концентрации нитрита не в полной мере соответствует данным, опубликованным в процитированной статье [Wang, Gunsalus 2000]. Максимальная активность NrfA в опубликованном эксперименте наблюдалась при концентрации, превышающей 2 мМ, а не при концентрации порядка 1 мМ, как отражено на рис. 2»
5. Щадрина А.С. –к.б.н., с.н.с. Лаборатории теоретической и прикладной функциональной геномики НГУ (г. Новосибирск) «Замечание касается рис.5, который бы лучше воспринимался в большем размере».
6. Варапаева О.Ф. – д.ф-м.н., в.н.с. лаборатории технологий анализа и обработки биомедицинских данных Института вычислительных СО РАН (г. Новосибирск). «В качестве небольшого замечания, отмечу

следующее. На стр. 6 автореферата автор указывает на то, что особый выбор начальных условий в задаче Коши обеспечивает воспроизведение условий соответствующего лабораторного эксперимента. Но зависят ли вообще решения этих систем уравнений при достаточно больших значениях времени от начальных условий? Как сильно этот выбор повлиял на результаты и выводы?»

7. Назипова Н.Н. – к.ф-м.н., в.н.с., и.о. зав. лабораторией биоинформатики Института математических проблем биологии РАН – филиала ИПМ им. М.В. Кельдыша РАН (г. Пушкино).
8. Штокало Д.Н. – к.ф-м.н., с.н.с. ФГБУН Институт систем информатики им. А.П. Ершова СО РАН (г. Новосибирск). «Стоило бы привести систему уравнений модели M2 в тексте. Стоило бы согласовать цвета между рис. 3 и 4 для удобства сравнения однотипных кривых. В-третьих, слишком мелкий шрифт на рис. 5 затрудняет чтение».
9. Акбердин И.Р. – к.б.н., н.с. ООО «БИОСОФТ.РУ» (г. Новосибирск). «На рис.3а расчеты модели по кинетике утилизации нитрита в хемостате показывают, что и при концентрациях добавленного нитрита выше 4 мМ расчеты модели не совпадают с экспериментальными измерениями. Стоит отметить, что результаты расчета модели M2, приведенные на рис. 4б позволили решить эту проблему при учете влияния мембранного потенциала на секрецию Nrf фермента из цитоплазму в периплазму. Однако в этом случае наблюдается пик скорости утилизации нитрита в диапазоне от 2 до 3 мМ, предсказанный в модели и обуславливающий расхождение расчетов модели с экспериментальными данными в этом диапазоне концентраций нитрита.»
10. Лисица А.В. – д.б.н., академик РАН, директор, главный научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича» (п. Москва).

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что официальные оппоненты являются компетентными специалистами в области системной биологии, имеют публикации в ведущих биологических журналах и дали свое письменное согласие быть оппонентами. Ведущая организация является одним из ведущих Институтов в нашей стране по системной биологии.

**Диссертационный совет отмечает, что** на основании выполненных соискателем исследований **предложена** новая, оригинальная, математически обоснованная гипотеза о молекулярно-генетических механизмах регуляции активности респираторной периплазматической Nrf нитритредуктазы при культивировании клеток *E. coli* в присутствии нитритов. Согласно этой гипотезе уровень активности Nrf редуктазы у *E. coli*, утилизирующей нитриты при низких концентрациях субстрата, характерных для естественных мест ее обитания, определяется не только уровнем синтеза субъединиц фермента, но и скоростью их секреции из цитоплазмы в периплазму, которая зависит от величины мембранного потенциала. Теоретически **доказано**, что влияние мембранного потенциала на скорость секреции и формирование активной формы Nrf редуктазы *E. coli* в периплазме клетки не зависит от структуры метаболического пути передачи электронов с форматов на нитриты.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что** впервые **изучены** динамические аспекты функционирования респираторной системы анаэробного дыхания клеток *E. coli* при культивировании их в глюкозо-лимитированных условиях стационарного роста и использовании в качестве субстрата солей азотистой кислоты. **Доказано**, что существующих данных о молекулярно-генетических механизмах регуляции экспрессии генов *nrfA* и *nirB*, кодирующих каталитические субъединицы периплазматической и цитоплазматической нитритредуктаз *E. coli*, достаточно для объяснения наблюдаемой скорости утилизации нитритов в хемостате при концентрации добавленного субстрата выше 2 мМ и недостаточно для объяснения таковой

при концентрациях ниже 2 мМ. **Доказано**, что при концентрациях нитритов меньше 2 мМ в клетках *E. coli* существует дополнительный, неизвестный механизм регуляции нитрит-утилизирующей активности. Показано, что этот неизвестный механизм связан с влиянием мембранного потенциала на скорость секреции субъединиц Nrf нитритредуктазы из цитоплазмы в периплазму и формированием активной формы фермента в периплазматическом пространстве клетки. Показано также, что мембранный потенциал является достаточным механизмом регуляции активности периплазматической Nrf редуктазы, обеспечивающим корректное описание динамики утилизации нитритов культурой *E. coli* в проточном хемостате.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем**, что в ходе работы получены новые знания о механизмах регуляции скорости утилизации нитритов клетками *E. coli* при низких концентрациях субстратов, характерных для естественных мест ее обитания в кишечнике млекопитающих, в том числе и человека.

**Создана** база моделей, описывающих молекулярно-генетические и биохимические процессы метаболического пути утилизации нитритов клетками *E. coli*. Она является частью базы данных MAMMOTH, которая доступна по адресу <http://mammoth.biomodelsgroup.ru> и может быть использована другими исследователями, занимающихся изучением процессов анаэробного дыхания у бактерий.

Результаты диссертационной работы дополняют имеющиеся на сегодняшний день представления о молекулярно-генетических механизмах регуляции анаэробного дыхания у бактерий и могут быть использованы при планировании экспериментов, связанных с изучением нитрат/нитритной респираторной системы. Полученные знания представляют интерес для научно-исследовательских организаций биологического профиля, занимающихся изучением процессов дыхания у прокариот и могут быть

использованы в образовательном процессе на биологических факультетах высших учебных заведений.

**Применительно к проблематике диссертации результативно** использованы стандартные подходы системной биологии и классические приемы компьютерного моделирования метаболических и молекулярно-генетических процессов, которые были применены к конкретному объекту исследования. Арсенал методов включает метод Гира и метод Рунге-Кутты четвертого порядка для решения задачи Коши, метод продолжения по параметру, реализованный в пакете STEP+, а также метод наименьших квадратов для оценки значений параметров, реализованный в пакете Mathematica. С их помощью исследована роль мембранного потенциала в регуляции активности респираторной периплазматической Nrf нитритредуктазы у *E. coli*.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила,** что в работе использованы методы и подходы математического моделирования, позволяющие адекватно решать поставленные задачи. Модели утилизации нитритов культурой клеток *E. coli* в условиях проточного хемостата и модели формирования цепи переноса электронов от форматов к нитритам участием форматгидрогенлиазных комплексов FHL-1 и FHL-2 разработаны в терминах элементарных подсистем и адаптированы к экспериментальным данным. Гипотеза о влиянии мембранного потенциала на транспорт субъединиц Nrf редуктазы из цитоплазмы в периплазму, математически обоснована и согласуется с существующими представлениями о возможной роли потенциала в реализации функций периплазматических белков. Сценарии формирования дыхательной цепи с использованием нитритов в качестве акцепторов при культивировании *E. coli* в условиях хемостата разработаны с учетом экспериментальных данных и предположений о возможных механизмах функционирования форматгидрогенлиазных комплексов FHL-1 и FHL-2.



**Личный вклад автора** состоит в разработке моделей M1 (совместно с В. А. Лихошваем) и M2 утилизации нитритов клетками *E.coli* в глюкозо-лимитированных условиях культивирования в хемостате, моделей M2/3 и M2/4, включающих процессы формирования цепи передачи электронов от форматов к нитритам, согласно предложенным сценариям, их адаптации к экспериментальным данным, в проведении численных экспериментов и анализе полученных результатов, а также в подготовке публикаций и представлении материалов на конференциях. Основные результаты, выносимые на защиту, получены автором самостоятельно.

Полученные соискателем научные результаты соответствуют п. 1. «Математическое и компьютерное моделирование живых систем: субклеточных структур, клеток, органов, систем органов, организмов, популяций, биоценозов» и п. 8. «Математические модели, численные методы и программные средства применительно к процессам получения, накопления, обработки и систематизации биологических и медицинских данных и знаний» паспорта специальностей 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика (биологические науки).

Диссертационным советом сделан вывод о том, что диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную работу, соответствует критериям пункта 9, абзац 2 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

На заседании 20 ноября 2018 г. диссертационный совет принял решение присудить Ри Наталье Александровне учёную степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человек, из них 8 докторов наук по специальности,

участвующих в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета,  
проголосовали: за – 21, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель  
диссертационного совета,  
академик РАН



  
В.К. Шумный

И.о.ученого секретаря  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



И.Н. Леонова

23.11.2018 г.