

ОБЗОР ОТЗЫВОВ,

поступивших на диссертацию и автореферат диссертации Куляшова Михаила Андреевича,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по научной специальности 1.5.8. Математическая биология, биоинформатика,

тема: Изучение метаболизма аэробного метанотрофа *Methyloviumicrobium alcaliphilum* 20Z^R методами потокового моделирования

Организация, Фамилия И.О.	Вопросы/Замечания	Ответы/Комментарии
1	2	3
От Колчанова Николая Александровича, доктора биологических наук, профессора, академика РАН, научного руководителя Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук». г. Новосибирск	1. В тексте диссертации встречаются не всегда последовательные обозначения одних и тех же понятий, например: "контекст-зависимые модели", "потоковые контекст-зависимые модели", "потоковые модели с учётом экспрессии". Рекомендуется унифицировать терминологию для повышения ясности и читабельности изложения.	С замечанием согласен.
	2. Ряд результатов численного моделирования изложен преимущественно в описательной форме без указания точных количественных показателей (например, прирост потока, значение прироста биомассы, изменение «потоков»). Было бы полезно усилить численный компонент результатов, представив в тексте основные значения или интервалы полученных	С замечанием согласен.

	параметров, а не только ссылками на приложения в диссертации.	
	3. Часть выводов, полученных в результате моделирования (например, невозможность определённых потоков через фосфокетолазу), представлены как факт без углублённого обсуждения биохимических причин или подтверждения из литературы.	На данный момент, единственным подтверждением обратимости реакции фосфокетолазы у 20ZR были результаты предыдущего теоретического анализа реконструированной потоковой модели iIA409. С точки зрения биохимии, данная реакция из расчета дельты энергии Гиббса, действительно, может быть обратимая. Однако, основываясь на неопубликованных данных от наших коллабораторов из университета Сан-Диего, которые использовали C^{13} анализ, данное предположение было опровергнуто. Других опубликованных данных для метанотрофов, связанных с данным ферментом, на данный момент нет.
	4. Хотя модуль BioUML-CBM описан подробно, в тексте недостаточно акцентируется его отличие и преимущества по сравнению с аналогичными зарубежными инструментами (например, COBRA Toolbox, OptFlux, Kbase).	В сравнении с Kbase модуль BioUML-CBM позволяет производить реконструкцию контекст-зависимых моделей. Также в Kbase затруднена модификация моделей, что осложняет создание дополнительного уравнения для синтеза рекомбинантного белка. Cobra Toolbox является мощным инструментом, аналогом которого является используемая в модуле BioUML-CBM библиотека Cobrapy. Основным преимуществом BioUML-CBM является наличие GUI-интерфейса для реконструкции контекст-зависимых моделей, а также

		отсутствие потребностей в собственных вычислительных мощностях. Кроме того, ввиду того, что Cobra Toolbox является модулем для Matlab, то для работы с этим инструментом требуется коммерческая или академическая лицензия для использования. Optflux имеет пользовательский интерфейс, но используемые в нем алгоритмы для реконструкции контекст-зависимых моделей уже устаревшие, а также он требует собственных вычислительных мощностей. С другой стороны, его явным преимуществом является наличие алгоритмов ко-оптимизации, которые были использованы в рамках данной работы.
	5. Часть иллюстративного материала в тексте и приложениях требует более подробных подписей или пояснений к используемым обозначениям, что повысило бы ясность представления результатов для читателя, не знакомого с программной платформой.	С замечанием согласен.
от Головина Андрея Викторовича, доктора химических наук, профессора научного центра генетики и наук о жизни направления «Вычислительная биология» автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический	1. Хотя в работе представлены предсказания, основанные на моделях, экспериментальное подтверждение новой функции гена <i>fae1-2</i> требует более подробной статистической обработки данных.	После получение экспериментальных данных о роли гена <i>fae1-2</i> в метаболизме объекта исследования будет проведен более детальный анализ, включая подробную статистическую обработку данных.

университет «Сириус», федеральная территория «Сириус».	2. Исследование охватывает специфические условия культивирования, а именно присутствие $\text{Ca}^{2+}/\text{La}^{3+}$, но слабо обсуждается химические причины использования экзотического иона La^{3+} для активности фермента.	Да, La^{3+} кажется достаточно экзотическим ионом и открытие роли лантаноидов в биологических процессах было показано чуть больше 10 лет назад. При этом лантаноиды, в частности, лантан и церий, несмотря на то, что относятся к редкоземельным металлам, могут содержаться в почве и воде в достаточных количествах для микроорганизмов. Недавнее исследование показывает, что у 20% морских микробов имеются ферменты с лантаноидами в активном центре, а также показан их высокий уровень экспрессии (Voutison et al, 2025). Если рассматривать с точки зрения активных центров у Ca^{2+} и La^{3+} зависимых ферментов на примере алкогольдегидрогеназ МХА и ХохF, там действительно практически идентичное строение активного центра (Cotruvo, 2019 , Featherston, Cotruvo, 2021), что может объяснить использование микроорганизмами лантаноидов. Но стоит отметить, что на данный момент высказаны гипотезы, что ферменты с лантаноидами эволюционно появились раньше Ca^{2+} -зависимых (Voutison et al, 2025), Featherston, Cotruvo, 2021).
	3. Работа опирается на метод потокового моделирования, однако не обсуждаются его ограничения в сравнении с другими методами системной биологии, например, динамическим моделированием.	Основным ограничением потокового моделирования в сравнении с динамическим моделированием является изучение биологической системы только в равновесном состоянии, что не позволяет рассматривать изменение концентрации различных ферментов, метаболитов во

		времени. Поточковые метаболические модели также не могут учесть влияние аллостерических регуляторов, в том числе промежуточных метаболитов путей биосинтеза, на активность фермента(ов). Данное ограничение частично может быть решено с использованием другого класса поточковых моделей - enzyme constraint поточковых моделей, либо с использованием отдельного модуля с динамическими параметрами и последующим использованием динамического анализа баланса потоков.
	4. Выявленные мишени, связанные с ЦТК и биосинтезом аминокислот, требуют более детального обоснования их выбора, включая потенциальные побочные эффекты модификаций на другие метаболические пути	Алгоритм ко-оптимизации выбирал потенциальные мутации с учётом минимизации изменения потоков в остальных метаболических путях, тем самым стараясь минимизировать побочные и негативные эффекты на метаболизм клетки. Но полностью согласен, что полученный список требует дальнейшего, более детального анализа и экспериментальной верификации.
от Колпакова Фёдора Анатольевича, доктора биологических наук, научного руководителя направления «Вычислительная биология», Научный центр генетики и наук о жизни, автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус».	1. Несмотря на высокий уровень и научную новизну работы, в диссертации недостаточно подробно обсуждены методологические ограничения используемых подходов поточкового моделирования, особенно в контексте интеграции транскриптомных данных. Было бы полезно представить более	Основным ограничением данного подхода является предположение о том, что уровень экспрессии гена коррелирует с уровнем синтеза соответствующего фермента, что не всегда так. Частично, данное ограничение решается алгоритмом RIPTiDe, который использован в данной работе, за счёт присвоения двух вариантов рангов генам (ген с высоким уровнем экспрессии имеет высокий ранг и наоборот, при высоком

	детальное обсуждение того, как эти ограничения могут повлиять на точность получаемых результатов и какие шаги могут быть предприняты для минимизации данных ограничений.	уровне экспрессии - низкий ранг; аналогичный альтернативный подход используется для генов с низким уровнем экспрессии) и затем выбор результата оптимизации модели с наибольшим уровнем корреляции распределения потоков и уровня экспрессии генов. Дополнительным ограничением подхода является сужения области пространства решений только для конкретных условий культивирования, в которых были получены данные об уровне экспрессии генов, что не позволяет использовать данную модель в других <i>in silico</i> экспериментах с измененными условиями роста.
	2. В диссертации недостаточно детально обоснован выбор конкретных условий моделирования (например, концентрации металлов, параметры культивирования). Включение более подробного анализа или описания влияния металлов на метаболизм <i>M. alcaliphilum</i> 20Z^R могло бы помочь лучше понять причины и последствия выбора именно этих параметров.	Выбор условий культивирования основывался на метаболических особенностях <i>M. alcaliphilum</i> 20Z^R и наличии у данного микроорганизма La³⁺-зависимой метанолдегидрогеназы и Ca²⁺-зависимой метанолдегидрогеназы, которые по разному катализируют окисление метанола и с разной эффективностью. Также у объекта исследования имеется W⁴⁺-зависимая формиадегидрогеназа, наличие W⁴⁺ у которой в аллостерическом активном сайте увеличивает эффективность генерации НАДН клеткой в данной реакции. Исходя из этого, были отобраны эксперименты, в которых были добавлены данные металлы в среду культивирования, чтобы оценить их влияния на метаболизм с помощью модели.

	3. Также в тексте диссертации присутствуют синтаксические и орфографические ошибки, имеется ряд опечаток.	С замечанием согласен.
от Афонникова Дмитрия Аркадьевича, доктора биологических наук, доцента, ведущего научного сотрудника, заведующего лабораторией эволюционной биоинформатики и теоретической генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск	Ключевым подходом диссертационной работы является расширение контекст-зависимых моделей для различных условий среды культивирования бактерий, однако в тексте не дано четкое определение термина «контекст-зависимая модель». Наличие такого определения (и более формального описания данной методологии) существенно бы улучшило позиционирование разрабатываемых методов. Входит ли в понятие контекст только лишь данные по экспрессии (что опосредовано учитывает множество факторов среды)? Могут ли быть использованы другие данные омиксного профилирования? В тексте есть упоминание про методы на основе учета протеомных данных (программа Geckory 3.0), однако их	В рамках термина “контекст-зависимая” рассматривается экспрессия всех генов у изучаемого микроорганизма в соответствующих условиях проведения эксперимента или контекста. Да, другие омиксные данные также могут быть использованы, в том числе и протеомные, как к примеру инструмент Geckory. Но они, в свою очередь, требуют использования другого класса потоковых моделей: enzyme-constraint потоковые модели, которые включают помимо генов информацию о соответствующих ферментах, а также требуют значений каталитических констант для данных ферментов, что в рамках потоковой модели включающей в себя более 400 реакций является сложной задачей, так как каталитические константы известны далеко не для всех белков, особенно у метанотрофных организмов.

	особенности и возможные преимущества не описаны.	
	На рисунке 3 приложения 1 заметно преобладание доли генов, увеличивающих свою экспрессию в эксперименте при добавлении в культивируемую среду ионов лантана, в сравнении с обратной ситуацией для экспериментов для ограничения потока метана, для которых превалируют гены, понижающие экспрессию (сравн. рисунок 1,2). Можно ли эти данные интерпретировать как положительное в отношении роста влияние ионов лантана на биологические процессы в клетках бактерий?	Да, подобный тренд в доле генов с повышенной экспрессией в условиях роста на La^{3+} можно связать с положительным эффектом данного редкоземельного металла на ростовые характеристики метанотрофного штамма. Так, если сравнить скорость роста с добавлением La^{3+} , она в 1.5 раза выше чем в условиях с добавлением Ca^{2+} (0.07 ч^{-1} vs 0.05 ч^{-1}) согласно экспериментальным данным и данным моделирования. В первую очередь, это связано с тем, что La^{3+} -зависимая метанолдегидрогеназа гораздо эффективнее окисляет метанол до формальдегида, а также имеет возможность его прямого окисления до формиата, что влияет на перераспределение углерода в клетке и сказывается на уровне экспрессии и остальных генов, в том числе связанных с центральными метаболическими путями, как, например, описанный в работе ген <i>fae1-2</i> .
	В качестве разделителя дробной части в тексте и ряде рисунков используется точка (например, рис. 3.3.4), в некоторых рисунках – запятая (например, рис. 3.4.3, 3.4.4).	С замечанием согласен.

	На некоторых рисунках (например, 3.1.2, 3.3.4 и др.) подписи осей выполнены на английском.	С замечанием согласен.
	Для ряда рисунков часть описания (например, обозначение цветов элементов рисунка) приведены в тексте (рис. 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3 и ряде других). Обычно такие детали указываются в подписи к рисункам. Возможно это некорректное форматирование подписей к рисункам, которые должным образом не отделены от текста.	С замечанием согласен.
	На некоторых рисунках текст написан слишком мелким шрифтом неразборчиво.	С замечанием согласен.
от Лашина Сергея Александровича, доктора биологических наук, заведующего сектором компьютерного анализа и моделирования биологических систем и сектора биоинформатики и информационных технологий в генетике, Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения	Несмотря на довольно объёмный литературный обзор, в статье практически не цитируются работы на русском языке. В частности, никак не упомянуты работы по геномным сетям и методам их моделирования.	С замечанием согласен.
	На странице 4, во введении, первые два абзаца представляют собой малосвязанные предложения. Такое же замечание к	С замечанием согласен.

Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск	последнему предложению раздела «Теоретическая значимость».	
	Положение, выносимое на защиту под номером 3 сформулировано, на мой взгляд, чересчур обще. Хотелось бы в нём увидеть конкретные генетические модификации, связанные с увеличением синтеза аминокислот. Тем более, результаты для этого имеются.	С замечанием согласен.
	Довольно большая часть рисунков имеет очень мелкие и сложно читаемые надписи.	С замечанием согласен.
	В разделе 1.3.1. в предложении «В Европе ... в связи с тем, что белки микробного происхождения дают более высокие урожаи по сравнению с другими источниками белка ...» не понятно, какие именно «урожаи» имеются в виду. Не является ли этот фрагмент машинным переводом?	Да, с с замечанием согласен. Под “урожаи” имелась в виду скорость наработки биомассы сельскохозяйственных животных, получаемая в результате использования такого источника белка.
	В целом, в литературном обзоре достаточно много ссылок на статьи с авторством соискателя. В том числе, и в разделах,	С замечанием согласен. Отмечу только, что ссылка в литературном обзоре приводится на последнюю обзорную работу, посвященную сравнительному анализу существующий инструментов и подходов для потокового

	описывающих актуальность исследования. Это выглядит странно.	моделирования, в том числе для реконструкции контекст-зависимых моделей.
	В разделе 1.4 не очень понятно, зачем столь подробно описывать функциональность сторонних программ. На мой взгляд, вполне хватило бы таблицы 1.4.1 и краткого текстового пояснения к ней.	В данном разделе описываются существующие на данный момент инструменты для потокового моделирования и их сильные и слабые стороны, в том числе для того, чтобы более корректно обосновать выбор программ для интеграции в модуль BioUML-CMB. Соглашусь, что часть приведенной информации может быть и избыточна.
от Щербакова Дмитрия Юрьевича, доктора биологических наук, доцента, заведующего лабораторией геносистематики Федерального государственного бюджетного научного учреждения науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск	Не проведено исследование на устойчивость решений, а это не позволяет определить точность, с которой должны быть установлены экспериментальные параметры.	Потоковые математические модели не предполагают разбиение множества моделируемых сущностей и механизмов на параметры и переменные, а представляют собой лишь вектор скоростей ферментативных реакций, умноженный на стехиометрическую матрицу (стехиометрический вклад каждого метаболита в соответствующую ферментативную реакцию), так как исследуемая метаболическая система рассматривается в равновесном состоянии. В рамках этого предположения о достижении системой равновесного состояния следует, что скорость изменения концентрации всех метаболитов в системе равна 0. Ввиду чего для такого класса математических моделей нет алгоритмов для исследования устойчивости найденных решений. Ближайшим аналогом оценки устойчивости решения в динамической модели может

		служить анализ variability потоков, который может показать область допустимых решений для каждой ферментативной реакции при заданном значении целевой функции оптимизации. Но так как в работе использовались контекст-зависимые модели, в основе которых лежит максимальное сужение области решений для каждой реакции на основании транскриптомных данных, данный анализ не проводился, что требует дальнейшего исследования.
	Не обсуждаются концентрации параметров в расчете на клетку. Впечатление такое, что модели относятся к цепи реакций в реакторе, значительно большем, чем клетка. С другой стороны, мелкий масштаб реакций может сопровождаться рядом специфических эффектов...	В рамках потоковой модели скорости ферментативных реакций имеют размерность ммоль/грамм сухого клеточного веса/час. Концентрации метаболитов в ферментативных реакциях в данном классе моделей не учитывается, ввиду того, что рассматривается состояние системы при достижении равновесия.
от Петрушина Ивана Сергеевича, кандидата технических наук, доцента кафедры естественнонаучных дисциплин Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Иркутский государственный университет», г. Иркутск	Использование для воплощения потоковых моделей платформы Python (Jupyter Notebook) предъявляет к пользователю дополнительные требования — навыка программирования. Визуальный подход или более высокоуровневый язык позволили бы	Да, согласен с данным замечанием, модуль BioUML-CMB на данный момент имеет пользовательский интерфейс только для модуля по реконструкции контекст-зависимых моделей и модификации моделей для продукции рекомбинантного белка, но в дальнейшем планируется расширение доступности и остальных его возможностей для более широкого круга пользователей.

	существенно расширить круг возможных пользователей.	
	Описанный в работе (Kulyashov M.A. <i>et al.</i> , 2025) программный продукт нуждается в инструкции по эксплуатации, поскольку регистрация на веб-платформе BioUML не работает (сервер возвращает ошибку 500).	С замечанием согласен.
	В разделе «Научная новизна» автор говорит о верификации результатов работы модели в исследовании М. Г. Калюжной, но не указывает ссылки на источник или публикацию.	С замечанием согласен.
	Рекомендую авторам рассмотреть регистрацию программ и моделей в Роспатенте для защиты интеллектуальной собственности.	Спасибо за рекомендацию, мы рассмотрим такую возможность.
от Бирюкова Михаила Юрьевича, кандидата биологических наук, научного сотрудника, Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск	Монументальность работы заключена в 182 страницах машинописного текста, для простоты понимания структурированного в три-четыре уровня. Этот, казалось бы, отличный ход изложения мыслей, всё же	С замечанием согласен.

	допускает определённые огрехи в формулировке мыслей соискателя.	
от Казанцева Федора Владимировича, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск	Формулировки задач в автореферате более скромные чем полученные результаты, которые сложно передать в формате автореферата.	С замечанием согласен.
	в тексте есть пара досадных грамматических ошибок и опечаток вида: «...(3) показано что повышенный уровень гена <i>fae1-2</i> ,...»	С замечанием согласен.
	В автореферате нет информации, выложены ли в публичный доступ наборы параметров и авторские версии метаболической модели iIA409.	С замечанием согласен. Наборы параметров и версии потоковых моделей находятся в открытом доступе в репозитории GitHub: https://github.com/mkulyashov/20ZR_CS_GSM_model_mSystems
от Антонца Дениса Викторовича, кандидата биологических наук, ведущего программиста лаборатории моделирования сложных систем ИСИ СО РАН, г. Новосибирск	Разработка модуля BioUML-CBM – важный результат, но его универсальность и возможность применения к другим метанотрофам или промышленным штаммам в автореферате практически не обсуждаются.	Разработанный модуль может быть применен для других метанотрофов, главным ограничением на данный момент является необходимость экспериментально измеренных затрат на синтез и транспорт рекомбинантных белков для другого организма, а также наличие аннотации метаболитов в модели согласно базе данных BIGG models.
	Выводы об оптимальных генетических модификациях для продукции белков сделаны на основе моделирования <i>in silico</i> ,	Предел применимости необходимо оценивать индивидуально для каждой выявленной модификации совместно с экспериментальной группой, которая будет производить верификацию. Стоит также

	но в автореферате не отражены пределы применимости этих предсказаний к реальным биотехнологическим системам.	отметить, что в рамках экспериментальной проверки может возникнуть ряд сложностей: например, при верификации модификаций, связанных с прямым увеличением синтеза АТФ в клетке, ввиду сложности реализации <i>in vivo</i> .
	Кроме того, в работе имеется ряд опечаток и орфографических ошибок.	С замечанием согласен.

Обзор составлен Куляшовым М.А. по отзывам, поступившим на дату 19 мая 2025 г.