

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета НТУ.1.5.8.06
Афонникова Дмитрия Аркадьевича
на диссертацию **Куляшова Михаила Андреевича**
«Изучение метаболизма аэробного метанотрофа *Methylovulumicrobium*
alcaliphilum 20Z^R методом потокового моделирования»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.8. Математическая биология, биоинформатика

Актуальность темы диссертации

Биотехнологии в современном мире играют все более значимую роль в промышленности, производстве материалов, топлива, новых перспективных соединений, утилизации отходов промышленности и жизнедеятельности человека. Они призваны в перспективе заменить химические технологии во многих областях, являясь при этом более экологичными и безопасными. Основа биотехнологий – использование живых организмов (по большей части микроорганизмов) и продуктов их жизнедеятельности для решения технологических задач. В этой связи очень важной, но, в то же время, чрезвычайно сложной задачей является оптимизация процессов получения продукта для микроорганизмов. Для ее решения разработан ряд подходов в области системной биологии, которые с различной степенью успешности позволяют рассчитать метаболические процессы в клетках и их адаптационный ответ на различные ростовые условия, доступность метаболитов в среде, температуру, наличие дополнительных химических веществ. Одним из таких подходов является потоковое моделирование, которое предполагает, что биологическая система находится в равновесии и на основе этого позволяет количественно оценивать скорость различных ферментативных реакций в клетке и, в конечном итоге, такой важный биотехнологический параметр, как скорость роста бактериальной культур. Активно исследуются в настоящее время методы на основе потоковых моделей, учитывающие вклад экспрессии генов и других факторов (контекст-зависимые модели).

Диссертационная работа Куляшова М.А. посвящена разработке контекст-зависимых подходов на основе потокового моделирования для бактерии *Methylovimicrobium alcaliphilum* 20ZR, которая является перспективным продуцентом метана. Этот организм является не только метанотрофом, но и продуцентом ряда важных метаболитов, таких как эктоин, 2,3-бутандиол, лактат, изопреноиды, муконовая кислота и т.д. Метанотрофы могут быть использованы и как продуценты рекомбинантных белков. Таким образом, работа Куляшова М.А. имеет важный прикладной аспект: на основе подходов компьютерного моделирования метаболических процессов этой бактерии в перспективе можно оптимизировать биомассу и выход целевого рекомбинантного белка и, таким образом, в большей степени задействовать свойства *M. alcaliphilum* 20ZR, как организма-продуцента.

Таким образом, диссертационная работа Куляшова М.А. является актуальной как с точки зрения фундаментальной науки, так и в области прикладных исследований бактерий-метанотрофов.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа имеет общепринятую структуру изложения и включает разделы: «Введение», «Обзор литературы», две основных главы («Материалы и методы», «Результаты и обсуждения»), «Заключение», раздел рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы, «Выводы».

Введение посвящено описанию актуальности работы, приведены цели и задачи, положения, выносимые на защиту, новизна работы, ее практическая значимость.

В обзоре литературы описаны особенности метаболизма объектов исследования – метанотрофных микроорганизмов и их применение в современной биотехнологии. Приводится описание современного состояния науки в области компьютерного моделирования метаболических процессов микроорганизмов с фокусом на методах потокового моделирования и их модификациях. Описаны существующие на сегодня основные алгоритмы и

программные пакеты в этой области, а также базы данных. Отдельный раздел посвящен описанию особенностей организма *M. alcaliphilum* 20ZR как модельного метанотрофа.

В главе «Материалы и методы» охарактеризованы экспериментальные данные по характеристикам *M. alcaliphilum* 20ZR, включая результаты оценки экспрессии генов в условиях наличия метана и наличия или отсутствия в среде ионов металлов. Описаны математические методы, разработанные для решения поставленных задач потокового моделирования (использованное программное обеспечение, химические реакции, процесс интеграции данных в потоковую модель на основе алгоритма RIPTiDe. Охарактеризованы целевые рекомбинантные белки (включая их нуклеотидные последовательности). Описана модификация ранее разработанной модели *iIA409* для моделирования производства рекомбинантных белков *M. alcaliphilum* 20ZR и методы ее оптимизации.

В ключевой главе «Результаты и обсуждения» приведены результаты применения разработанных методов для решения поставленных в диссертации задач: описание вычислительного конвейера для модификации потоковых моделей, реализованный в среде BioUML; модифицированная контекст-зависимая модель метаболизма *iIA409* с учетом транспорта ионов металлов и результаты ее анализа. Проведено детальное исследование влияния наличия и отсутствия ионов различных металлов на рост клеток бактерий *M. alcaliphilum* 20ZR и на основе этого анализа были предложены несколько гипотез об особенностях метаболизма этой бактерии и возможной роли некоторых ферментов в этих процессах. Приведен конвейер, реализующий модификацию модели *iIA409* для моделирования биосинтеза рекомбинантных белков, проведено численное исследование этих процессов.

В главе «Заключение» подведен итог исследований, в разделе «Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы» автор представил свое видение дальнейшего развития работы.

Работа изложена на 182 страницах машинописного текста, содержит 60 рисунков и 25 таблиц, списки публикаций по теме работы, сокращений, 6 приложений. Список литературы включает 230 ссылок.

Научная новизна результатов диссертационной работы

Работа Куляшова М.А. расширяет представление о «контекст-зависимых» моделях метаболизма бактерий и реализует использование этой парадигмы для моделирования метанотрофных бактерий. Следует отметить несколько результатов работы Куляшова М.А., которые обладают несомненной новизной. Во-первых, впервые разработан программный подход для модификации существующих потоковых моделей метаболических путей бактерий в рамках единой платформы BioUML, в том числе и интеграции экспрессионных данных. Во-вторых, детальный анализ ряда потоковых моделей позволил высказать ряд гипотез о новой роли некоторых ферментов в метаболических путях бактерий, впоследствии подтвержденных экспериментально. В-третьих, на основе программного подхода BioUML была предложена новая модель (на основе модификации более ранней iPA409) для описания биосинтеза рекомбинантных белков в бактерии. Это впервые позволило предсказать направление генетических модификаций бактерии для оптимизации производства рекомбинантного белка и роста биомассы. Эти результаты свидетельствуют о высокой научной квалификации соискателя.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Теоретическая ценность работы заключается в создании программного обеспечения в рамках платформы BioUML для работы с потоковыми математическими моделями, описывающими метаболизм микроорганизмов. Этот программный компонент доступен для свободного скачивания и использования, что обеспечивает доступ к нему широкого круга исследователей. Второй важный теоретический вклад работы Куляшова М.А.

закключается в разработке подхода, позволяющего учитывать в потоковых моделях метаболизма *M. alcaliphilum* 20ZR данные об экспрессии ее генов в различных условиях. Это позволяет уточнять специфические особенности конкретных условий среды культивирования и построить более точные модели. Третий теоретический вклад работы – создание программного обеспечения, реализующего вычислительный конвейер для моделирования продукции этой бактерией рекомбинантных белков.

С учетом важности изучения метанотрофных бактерий для биотехнологий, указанные результаты также обладают высокой практической ценностью. В работе показаны способы разработки моделей метаболизма *M. alcaliphilum* 20ZR, которые могут быть расширены для моделирования процессов у других метанотрофных бактерий. Кроме того, одно из предложенных в работе направлений развития данных методов – создание технологий использования метанотрофных бактерий в качестве организмов-продуцентов целевых белков также является перспективным с точки зрения практической биотехнологии.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, являются обоснованными. Это обусловлено сравнением результатов компьютерного моделирования с опубликованными в литературе данными, полученными на основе реальных экспериментов. Соискатель продемонстрировал хорошее согласие предсказанных значений параметров и их экспериментальных оценок. Ряд полученных численных результатов также были экспериментально верифицированы группой профессора М. Г. Калюжной из университета Сан-Диего, США.

Соответствие автореферата основному содержанию диссертации

Содержание автореферата соответствует содержанию, основным положениям и результатам диссертации.

Оценка диссертационного исследования

Диссертационная работа Куляшова Михаила Андреевича представляет законченное научное исследование.

В диссертации решен целый ряд задач, актуальных в области системной биологии, компьютерного моделирования и биотехнологии бактерий-метанотрофов. В рамках платформы BioUML создано программное обеспечение, которое позволяет осуществлять модификацию контекст-зависимых моделей метаболизма бактерий с учетом данных по экспрессии генов бактерий, выращиваемых на различных средах культивирования. С помощью этой технологии разработаны контекст-зависимые потоковые модели *M. alcaliphilum* 20ZR, описывающие рост бактерий на средах с различным составом ионов металла. Показано, что предложенные контекстные модели дают более точное согласие с экспериментальными данными. На основе анализа моделей были высказаны ряд гипотез о возможной новой роли ряда ферментов (ферментов Fae1-2) в метаболических путях. Разработаны контекст-зависимые потоковые модели для описания процесса биосинтеза рекомбинантных белков. Проведена их апробация на примере нескольких белков и показано хорошее соответствие между рассчитанными параметрами и их экспериментальными оценками. На основе анализа полученных моделей предложены направления возможной генетической оптимизации бактерий за счет изменения уровней экспрессии ряда генов в направлении увеличения биосинтеза аминокислот.

Основные результаты диссертации представлены в трех научных публикациях в зарубежных журналах, относящихся к первому и второму квартилям системы цитирования Web of Science. Результаты также были представлены на всероссийских и международных научных форумах, по их итогам опубликованы 8 тезисов.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.8. Математическая биология, биоинформатика.

Замечания по диссертации

1. 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 Geckoru 3.0), однако их особенности и возможные преимущества не описаны.

2. 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?

3. 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).

4. На некоторых рисунках (например, 3.1.2, 3.3.4 и др.) подписи осей выполнены на английском.

5. 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.

6. На некоторых рисунках текст написан слишком мелким шрифтом неразборчиво.

Отмеченные недостатки не снижают высокого качества исследования и не влияют на главные теоретические и практические результаты диссертации, описанные выше. Результаты оригинальны, обладают научной новизной и практически значимы.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней Автономной некоммерческой образовательной организацией высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус»

Диссертационная работа Куляшова Михаила Андреевича является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение ряда важных научных задач в рамках единого методического подхода, разработанного автором. Данный подход был апробирован на нескольких моделях, учитывающих различные среды культивирования, а также целевые рекомбинантные белки. Во всех случаях предсказанные моделями параметры находились в хорошем согласии с экспериментальными оценками, что подтверждает работоспособность предложенного подхода. Полученные результаты обладают новизной, актуальны как с теоретической, так и практической точек зрения.

Диссертационная работа Куляшова Михаила Андреевича «Изучение метаболизма аэробного метанотрофа *Methylovumicrobium alcaliphilum* 20Z^R методом потокового моделирования» отвечает требованиям пп.2.1–2.6 Положения о присуждении ученых степеней Автономной некоммерческой образовательной организацией высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус» утвержденного приказом от 25

декабря 2023 г. № 350/1-ОД-У, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Куляшов М. А., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8. Математическая биология, биоинформатика.

Член диссертационного совета
НТУ.1.5.8.06
д.б.н., доцент
зам. директора «ФИЦ Институт
цитологии и генетики СО РАН»

Афонников

Афонников
Дмитрий
Аркадьевич

5.05.2025

Сведения:

Афонников Дмитрий Аркадьевич,

Докторская диссертация защищена по специальности 1.5.8. – математическая биология, биоинформатика.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»

Адрес организации: 630090, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, д.10

Телефон: +7 (383) 363-49-63

e-mail: ada@bionet.nsc.ru

подпись Д. А. Афонникова заверено
ученой секретарью ИГиГ СО РАН
Орлова

