

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Пузанского Романа Константиновича по теме: «**Метаболом и профиль экспрессии генов клеток *Chlamydomonas reinhardtii* при различных трофических условиях**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

Актуальность темы диссертационной работы

Комплексные подходы к изучению фундаментальных процессов, протекающие в живых системах, на сегодняшний день, позволяют детально описать функциональные и адаптивные особенности микроорганизмов, представляющих научно-практический интерес. Из совокупности доступных и удобных объектов для изучения в данной работе выбрана *Chlamydomonas reinhardtii*, являющаяся широко распространённым представителем одноклеточных зеленых водорослей, населяющий преимущественно пресные водоёмы и почвы. *Chlamydomonas* традиционно используются, как модельные объекты молекулярно-биологических и биохимических исследований, таких процессов, как фотосинтез, минеральный обмен, метаболизм липидов. В ходе планомерного изучения фундаментальных явлений, данный объект широко применяется для характеристики действия стрессовых факторов, изучения структуры клеточной оболочки и организации цитоскелета, а также действия фармацевтических препаратов.

Способность к быстрой адаптации данного микроорганизма к изменяющимся трофическим условиям определяет интерес исследователей в области системного изучения метаболических каскадов, пластичность которых способствует своевременному переключению метаболизма на альтернативные источники энергии. В частности, для фотоавтотрофных водорослей, основой функциональной активности фотосинтезирующих систем является способность акцептировать свет и углекислый газ. Однако

хламидомонада и ряд других микроорганизмов утилизируют содержащиеся в среде органические вещества, что приводит к перераспределению метаболических потоков между процессами анаболизма и катаболизма, и в конечном итоге отражается на скорости роста, интенсивности синтеза и депонирования органических субстратов. При этом особенности акклимации при смене источника питания могут быть системно охарактеризованы посредством различных молекулярно-биологических подходов. Кроме того, одним из преимуществ работы с данным микроорганизмом является возможность непрерывного наблюдения за поведением объекта в привычных условиях культивирования, а также оценка функциональных изменений в клетках на транскрипционном и метаболомном уровнях в ходе акклимации. Совокупно данный подход позволяет оценить динамические изменения параметров физиологического состояния клеток, включая изменяющиеся уровни экспрессии генов и концентраций метаболитов. Кроме того, описанная в работе схема исследования и предложенные подходы к систематизации и обработке данных могут лечь в основу будущих исследований для изучения функционального состояния различных микроорганизмов в заданных условиях.

Научная новизна диссертационной работы

Исследования биохимических процессов, проходящих в ходе роста культуры и трофической акклимации, в результате потребления различных источников энергии относятся к сложным экспериментальным задачам. Для своей реализации вопросы, поставленные в диссертации, требуют уверенного знания и владения разнообразными методиками, фундаментальными аспектами строения клеток микроорганизмов, глубокого понимания биохимических процессов. Данные, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, позволяют описать динамику процессов метаболической реконструкции клеток в ходе изменения источников энергопотребления. Кроме того, структура работы способствует

формированию целостного представления о последовательности этапов изучения объектов с похожими биологическими свойствами в ходе экспериментального моделирования условий культивирования. В работе впервые применен и математически обоснован системный подход к изучению динамических процессов в клетках водорослей, включающий подробный анализ профиля метаболитов и оценку уровня экспрессии таргетных генов, вовлеченных в клеточный метаболизм.

Оценка содержания выполненной работы в соответствии с требованиями ВАК

Рецензируемая диссертационная работа изложена на 366 страницах и построена по традиционному плану. В начале представлена глава - "Введение", далее следует объемный литературный обзор, описание материалов и методов, а также полученных в ходе работы результатов и их обсуждения. После главы "заключение" и описания выводов работы, в диссертации представлен список литературы, включающий в себя 427 источников, а также объемная глава «Приложение», в которой суммарно с другими разделами диссертационной работы размещено 111 рисунков и 19 таблиц.

Обзор литературы состоит из 8 объемных глав, суммарно насчитывающих 133 страницы. В данном разделе автор представляет исчерпывающую информацию о закономерностях роста культур водорослей, а также процессах ассимиляции экзогенной органики. В разделе приведена информация об имеющейся на сегодняшний день системных подходах к изучению микроводорослей, а также вариантах культивации в различных трофических условиях. Подробно рассмотрены особенности физиологии и метаболизма автотрофных и миксотрофных культур в нормальных и стрессовых условиях.

В целом литературный обзор включает значительный объем информации, позволяющий подробно ознакомиться и подготовиться к восприятию основной части диссертационной работы.

Раздел «Материалы и методы» изложен на 10 страницах и содержит описание основных экспериментальных подходов, использованных при проведении исследования. В разделе представлена схема эксперимента, описаны варианты пробоподготовки для проведения метаболомного и транскриптомного исследования. Большое внимание автор уделяет детальному описанию использованного в работе математического аппарата, а именно представляет варианты статистической обработки данных в среде языка R.

Раздел «Результаты и обсуждение» представлен на 85 страницах в основной части и значительным дополнительным иллюстративным материалом в части «Приложение». Полученные в ходе работы результаты представлены в нескольких главах. В первой части работы проводится детальный анализ интенсивности фотосинтеза и темнового дыхания миксотрофной культуры клеток *Chlamydomonas reinhardtii*. Автор отмечает несколько пиковых значений активности газообмена в периоды инокуляции и выхода из логарифмической фазы, а в ходе метаболомного анализа демонстрирует значительные изменения поведения ряда метаболитов в клетках в процессе развития культуры. В ходе кластеризации всех идентифицированных метаболитов удается выявить максимально обогащенную группу метаболитов, представленную преимущественно липофильными соединениями. Анализ соотношений метаболитов при этом демонстрирует распределение аминокислот и коротких жирных кислот между фазами экспоненциального роста и стационара, в котором большую значимость приобретает процесс депонирования липидов. Данные метаболомного анализа дополнены результатами измерения уровня экспрессии генов, кодирующих ферменты, вовлеченные в энергетический

метаболизм, ассимиляцию ацетата, синтез липидов, метаболизм крахмала. В конце автор применяет корреляционный анализ для установления связей между измененными уровнями экспрессии генов и динамическими изменениями метаболитов на разных стадиях роста культуры.

Во второй части работы автор проводит анализ поведения автотрофной культуры клеток *Chlamydomonas reinhardtii*, используя тот же подход к получению и анализу данных, как и в случае миксотрофной культуры. В результате проведения метаболомного и транскриптомного исследования для автотрофной культуры также отмечаются метаболомные сдвиги и изменения уровня экспрессии генов, коррелирующие с интенсивностью физиологической активности в период экспоненциального роста. При этом в ходе корреляционного анализа автор выделяет несколько значимых кластеров, включающих гены пластидных экспортеров, гены ферментов синтеза и деградации крахмала, а также гены, кодирующие ферменты синтеза жирных кислот и метаболизма углеводов.

В финальной части автор проводит сравнение физиологических и биохимических параметров автотрофной и миксотрофной культур в ходе акклимации, делая вывод о более выраженном влиянии акклимации при культивировании в миксотрофных условиях.

Текст диссертации заканчивается разделом «Заключение» с обобщением полученных результатов, согласно сформулированной цели исследования, а также выводами, сопоставимыми с представленными задачами.

Комментарии и вопросы к диссертационной работе

Комментарии:

1. Диссертационная работа имеет ряд замечаний по оформлению. В частности, как в печатной, так и в электронной версии работы допущены ошибки в структуре оглавления. Форматирование текста выполнено не по стандартным правилам оформления текстов, рекомендованных ВАК, а именно допущены ошибки в текстовых интервалах, применяемых шрифтах и абзацах.

2. Диссертационная работа содержит значительное количество описательного материала, представленного в разделе «Обзор Литературы». Обилие представленных литературных данных затрудняет чтение и не позволяет сконцентрироваться на материале, необходимом для понимания сформулированной цели и поставленных задач. Стоит отметить, что в тексте автореферата, автор более конкретен в представлении информации, необходимой для понимания основного замысла исследования.

3. Раздел «Материалы и методы» должен содержать подробную информацию об условиях проведения эксперимента. В частности, подписи к рисункам, описывающим использованные лабораторные штаммы и схему эксперимента, необходимо делать в более развернутой форме. В настоящем виде подписи имеют излишнюю лаконичность, что в ряде случаев усложняет восприятие приведенной иллюстративной информации.

4. В разделе «Результаты и обсуждение» автор последовательно описывает полученные данные с использованием различных методов статистики. При этом в изложении присутствуют разноязычные варианты терминов, что усложняет восприятие текста. Унификация терминологии и общее снижение количества терминов, используемых при описании биологических процессов, позволило бы более конкретно формулировать ни

только результаты, но и проводить планомерную дискуссию, которой в объеме представленных данных не хватает.

Вопросы:

1. Исследовалась ли используемая в разных трофических условиях культура *Chlamydomonas reinhardtii* на предмет гомогенности, а именно, считаете ли Вы достаточным, для адекватного осуществления фотосинтеза в суспензии, условие перемешивания культуры один раз в сутки?
2. В качестве способа нормализации метаболомных данных в работе применен вариант анализа соотношений относительного содержания метаболитов. Был ли применен иной способ нормализации данных, например, по отношению к суммарному количеству белка в исследуемом образце? Объясните, какой вариант наиболее предпочтителен и почему.
3. Для изучения транскрипционного профиля в культуре при разных трофических условиях были выбраны 32 гена, продукты которых задействованы в анализируемых биохимических реакциях. С учетом общего количества генов *Chlamydomonas reinhardtii*, дублирующих и дополняющих многие описанные функции, сложно согласиться с выводом о том, что анализ 32 генов в совокупности с метаболомным исследованием может способствовать пониманию функционирования клетки, как целостной многоуровневой системы. Можно ли предположить, что при увеличении выборки анализируемых генов, найденные корреляции будут иметь другую направленность?
4. В ряде работ по изучению особенностей физиологии одноклеточных в качестве основного подхода в дополнение к метаболомному анализу используют количественное исследование протеома. Отмечено, что вариации уровня экспрессии генов, не всегда

соотносятся с количественными изменениями уровня кодируемых ими белков. Проводилась ли в работе предварительная оценка количественного содержания белков, относительно измеряемых уровней экспрессии генов?

Заключение

Высказанные замечания и комментарии, тем не менее, не уменьшают значимости представленной диссертационной работы. Исследования, выполненные Пузанским Романом Константиновичем являются примером планомерного, тщательного изучения фундаментальных основ физиологии растений с привлечением современных технологий и методик анализа данных. По своему содержанию, объему и качеству представления результатов, диссертационная работа Р.К. Пузанского отвечает требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

Кандидат биологических наук
н.с. лаборатории молекулярной патофизиологии
отдела молекулярной биологии и генетики
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального медико-биологического агентства» России
Захаржевская Наталья Борисовна
Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация: 03.01.04 – «биохимия»
Контактные данные: Телефон: 8(495)246-02-93
Адрес: Москва, улица Малая Пироговская, д. 1А
E-mail: natazaha@gmail.com
24.10.2019 года
Подпись к.б.н. Н.Б. Захаржевской заверяю
Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России
к.б.н. Кострюкова Е.С.

