

Сведения о результатах публичной защиты

Пузанский Роман Константинович

Диссертация «Метаболом и профиль экспрессии генов клеток *Chlamydomonas reinhardtii* при различных трофических условиях»

Специальность 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

Члены диссертационного совета Д 002.211.02, присутствовавшие на заседании при защите диссертации: д.б.н. Ярмишко В.Т., д.б.н. Слемнев Н.Н., д.б.н. Лянгузова И.В., д.б.н. Андреев М. П., д.б.н. Буданцев А.Л., д.б.н. Горшков В.В., д.б.н. Казнина Н.М., д.б.н. Кислюк И.М., д.б.н. Медведев С.С., д. б. н. Нешатаева В. Ю., д.б.н. Новожилов Ю.К., д. б. н. Потёмкин А. Д., д. б. н. Потокина Е. К., д. б. н. Родионов А. В., д.б.н. Шереметьев С.Н., д.б.н. Шишова М.Ф., д.б.н. Шнеер В.С.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.211.02
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ БОТАНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА ИМ. В.Л.
КОМАРОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 13 ноября 2019 г. № 120

О присуждении Пузанскому Роману Константиновичу, гражданину Российской Федерации ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Метаболом и профиль экспрессии генов клеток *Chlamydomonas reinhardtii* при различных трофических условиях» по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений» принята к защите 24 июня 2019 г., протокол № 116 диссертационным советом Д 002.211.02 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук, 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, дом 2, приказы

Рособрнадзора № 737-465 от 04.04.2008, № 426-214 от 15.03.2010, приказы Минобрнауки России № 194/нк от 22.04.2013, № 153/нк от 15.02.2016, № 403/нк от 10.05.2017; № 409/нк от 12.04.2018, приказ Министерства науки и высшего образования РФ № 175/нк от 02.10.18, приказ № 335/нк от 18.04.2019.

Соискатель Пузанский Роман Константинович 1981 года рождения.

В 2004 году соискатель окончил бакалавриат, в 2006 году магистратуру по направлению “Биология” Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», в 2009 году окончил очную аспирантуру по специальности 03.01.05 - «Физиология и биохимия растений» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет». Работает научным сотрудником в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботанический институт им. В. Л. Комарова Российской академии наук.

Диссертация выполнена на кафедре физиологии и биохимии растений биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет».

Научный руководитель – доктор биологических наук Шишова Мария Фёдоровна, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», кафедра физиологии и биохимии растений, профессор.

Официальные оппоненты:

Новикова Галина Викторовна — доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Лаборатория клеточной регуляции, ведущий научный сотрудник;

Захаржевская Наталья Борисовна – кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» России, лаборатория молекулярной патофизиологии, научный сотрудник дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» в своем положительном заключении, подписанном Горшковым Владимиром Юрьевичем, кандидатом биологических наук, лаборатория молекулярной биологии, старший научный сотрудник и Черновым Владиславом Моисеевичем, доктором биологических наук, руководитель указала, что представленная диссертация Р.К. Пузанского содержит большой достоверный экспериментальный материал, имеющий фундаментальное и практическое значение и представляет собой серьезное научное исследование, значимость которого выходит за рамки конкретной темы.

Соискатель имеет 20 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 13 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано – 4.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Puzanskiy R.K.**, Shavarda A.L., Tarakhovskaya E.R., Shishova M.F. (2015). Analysis of metabolic profile of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated under autotrophic conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 51 (1). P. 83-94.

2. **Пузанский Р.К.**, Шаварда А.Л., Шишова М.Ф. (2015). Динамика метаболизма клеток автотрофной культуры *Chlamydomonas reinhardtii* в период экспоненциальной и стационарной фазы роста. *Вестник Санкт-Петербургского Университета Сер. 3 Вып. 1*. С. 104-121.

3. **Puzanskiy, R.**, Tarakhovskaya, E., Shavarda, A., Shishova, M. (2018). Metabolomic and physiological changes of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae, Chlorophyta) during batch culture development. *Journal of Applied Phycology*. 30(2). P. 803-818.

4. **Puzanskiy R.**, Romanyuk D., Shishova M. (2018). Coordinated alterations in gene expression and metabolomic profiles of *Chlamydomonas reinhardtii* during batch autotrophic culturing. *Biological Communications*. 63 (1). P. 87-99.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы от:

1. Заикиной Евгении Александровны – к.б.н., научного сотрудника лаборатории геномики растений Института биологии и генетики Уфимского исследовательского центра РАН.

2. Соловченко Алексея Евгеньевича – д.б.н., профессора кафедры биоинженерии Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова.

3. Курамшиной Зили Мухтаровны – д. б. н., заведующей кафедрой биологии Стерлитамакского филиала Башкирского государственного университета.

4. Михайловой Юлии Владимировны – к.б.н. научного сотрудника лаборатории биосистематики и цитологии Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН.

5. Балнокина Юрия Владимировича – д.б.н., профессора, заведующего лабораторией и Поповой Ларисы Борисовны – д.б.н., ведущего научного сотрудника лаборатории ионов и солеустойчивости Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

6. Конарева Алексея Васильевича – д.б.н., профессора, главного научного сотрудника, заведующего отделом и Шеленги Татьяны Васильевны – к.б.н., ведущего научного сотрудника отдела биохимии и молекулярной биологии Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова.

7. Ермиловой Елены Викторовны – д.б.н., профессора кафедры микробиологии Санкт-Петербургского государственного университета.

8. Юриной Надежды Петровны – зав. лабораторией Биоэнергетики исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха.

9. Каюмова Айрата Рашитовича – д.б.н., доцента кафедры генетики Центра биологии и педагогического образования Казанского Федерального университета.

10. Юркова Андрея Павловича – к.б.н., доцента, с.н.с. лаборатории экологии симбиотических и ассоциативных ризобактерий Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии.

11. Синетовой Марии Андреевны – к.б.н., ведущего научного сотрудника лаборатории экофизиологии микроводорослей Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

12. Авальбаева Азамата Мэлсович – к.б.н., старшего научного сотрудника и Шакировой Фариды Миннихановны – д.б.н., заведующей лабораторией молекулярных механизмов устойчивости растений к стрессам Института биологии и генетики Уфимского исследовательского центра РАН.

13. Жукова Владимира Александровича – к.б.н., зав. лабораторией генетики растительно-микробных взаимодействий Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии.

14. Штарк Оксаны Юрьевны – к.б.н., ведущего научного сотрудника лаборатории генетики растительно-микробных взаимодействий Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии.

15. Маркушевой Татьяны Вячеславовны – д.б.н., проф., старшего научного сотрудника Уфимского Института биологии РАН.

16. Минибаевой Фариды Вилевны – д.б.н., главного научного сотрудника лаборатории окислительно-восстановительного метаболизма Казанского института биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН.

Все отзывы положительные. В отзывах отмечено, что диссертационная работа является оригинальным, актуальным, полным исследованием. В ряде отзывов есть замечания, вопросы, пожелания.

В некоторых отзывах содержатся замечания, предложения, пожелания.

Соловченко Алексей Евгеньевич в качестве пожелания рекомендует автору более четко формулировать отличия, преимущества и моменты новизны работы.

Михайлова Юлия Владимировна высказывает замечание к подписи рис. 4 автореферата и спрашивает, является ли это досадной опечаткой или культура *C. reinhardtii* в возрасте 24 суток характеризуется двумя разными метаболитными профилями?

Ермилова Елена Викторовна отмечает, что штамм СС-124, используемый в работе, является двойным мутантом по генам, кодирующим нитратредуктазу и транскрипционный фактор NIT2, что может отразиться на ряде процессов метаболизма и сигнальных путях *C. reinhardtii*.

Юрков Андрей Павлович высказывает замечания по поводу опечаток, стиля и формулировок выводов, а также задает два вопроса. В первом просит разъяснить выбор числа референсных генов. Во втором объяснить причину сравнительно низкой доли дисперсии, связанной с первыми главными компонентами на рис. 17 и 18.

Каюмов Айрат Рашитович советует автору в дальнейшем проводить измерения физиологических параметров культуры в тех же временных точках, в которых снимаются данные динамики роста для корректного их сопоставления. Также автор отзыва полагает, что рост содержания некоторых метаболитов на поздних стадиях может быть результатом лизиса клеток и вторичного роста, а также указывает, что было бы полезно измерить содержание хлорофилла, чтобы исключить факт хлороза из-за голодания.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обусловлен тем, что НОВИКОВА Галина Викторовна является специалистом в области физиологии и биохимии растений и имеет публикации по теме регуляции

метаболизма растений, ЗАХАРЖЕВСКАЯ Наталья Борисовна является специалистом в области биохимии и имеет публикации по молекулярной биологии, биохимии и системной биологии.

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» известен достижениями в изучении метаболизма как растений так и одноклеточных организмов, раскрытием молекулярных и биохимических механизмов адаптации, передовыми работами в области системной биологии, что позволяет организации определить научную и практическую значимость диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненного соискателем исследования существенно расширяются научные представления о развитии периодических культур *Chlamydomonas reinhardtii*. Выявлены существенные различия в динамике метаболома и транскрипционного профиля клеток хламидомонады при развитии в условиях авто- и миксотрофии. Продемонстрировано, что системный ответ на смену трофических условий заключается в изменении соотношения скорости пролиферации, активности дыхания и фотосинтеза, а также в перераспределении углерода между путями ассимиляции, катаболизма, депонирования и деградации резервных соединений, реализуемых в пластиде и/или цитозоле.

Предложена оригинальная научная гипотеза о дифференцировке метаболитов по особенностям динамики в процессе развития культуры. Разработана концепция о роли дифференциальной экспрессии генов центрального метаболизма и пластидных транспортеров в обеспечении метаболических перестроек в процессе роста культуры хламидомонады. Обнаружено положительное влияние ацетата в среде на накопление большой группы метаболитов, в первую очередь жирных кислот и их производных, а также некоторых аминокислот и карбоксилатов. Отсутствие ацетата

характеризовалось большим накоплением ряда сахаров. Выявлено влияние трофических условий на уровень экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза жирных кислот, метаболизм крахмала и олигосахаридов, входа/выхода ацетильных групп в цикл Кребса. Впервые раскрыта роль пластидных транспортеров в трофической адаптации хламидомонады. Установлена связь стадии развития культуры и влияния трофических условий. Впервые постулировано смещение метаболизма на уровне метаболома и профиля транскрипции в сторону автотрофии. Предложена и подтверждена экспериментально оригинальная гипотеза о стимуляции роста и физиологической активности культур *Chlamydomonas reinhardtii* в результате предварительной акклимации к миксотрофии. Представлены доказательства сохранения значительного числа черт метаболома и транскрипционного профиля в начальный период развития культуры после смены условий культивирования. Предложена оригинальная научная идея о влиянии смены условий среды на структуру корреляционных связей концентраций метаболитов и уровней экспрессии генов. Впервые показано усиление корреляционных связей в метаболитных и генных сетях при смене авто- и миксотрофных условий выращивания.

Теоретическая значимость исследований обоснована тем, что впервые выявлены закономерности системного ответа хламидомонады на изменение трофических условий среды. Предложенные и доказанные закономерности носят общий характер, что расширяет границы их применения для понимания механизмов роста микроводорослей. Впервые обнаружена динамика метаболома в зависимости от характера роста и формы питания. Изучена связь транскрипционного и метаболитного профилей. Исследован генезис процесса адаптации хламидомонады к новым трофическим условиям. Предложена оригинальная модель взаимовлияния метаболитных и транскрипционных изменений в ответ на смену трофического режима, характеризующая трофическую пластичность организма. Применительно к проблематике диссертации результативно (то есть с получением обладающих

новизной результатов) использовано сочетание комплекса базовых методов микробиологии, физиологии и биохимии растений с современными методами метаболомного и целевого транскрипционного анализа, а также математической обработки данных.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики определяется тем, что на основании представленных данных могут быть выработаны методики и рекомендации по повышению эффективности культивирования микроводорослей. Основные научные результаты и выводы диссертационной работы могут быть использованы при чтении курсов лекций для студентов биологических, экологических и биотехнологических специальностей.

Оценка достоверности результатов исследований выявила, что экспериментальная часть работы выполнена на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов в различных условиях эксперимента; теоретические положения согласуются с опубликованными в открытой печати данными по теме диссертации; научная гипотеза о роли трофических факторов в регуляции роста микроводорослей, их биохимического состава и активности таких процессов как фотосинтез, дыхание и др. базируется на совокупности результатов диссертации и имеющихся в литературе экспериментальных данных; использованы оригинальные авторские данные о системных изменениях, происходящих на транскрипционном и метаболомном уровнях при изменении трофического режима хламидомонады; установлено качественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках, по теме диссертации, в тех случаях, когда сравнение является обоснованным; в работе использованы современные апробированные молекулярно-генетические и физиолого-биохимические методы, в том числе газовая хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией, количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, анализ

результатов проведен с использованием методов математической обработки данных и биоинформатики.

Личный вклад автора состоит в теоретической разработке темы, планировании, подготовке и постановке экспериментов, в получении экспериментальных данных, их обработке и интерпретации полученных результатов, в подготовке публикаций по теме диссертации, представлении результатов на научных конференциях.

Диссертационным советом сделан вывод о том, что диссертация представляет собой научно-квалификационную работу, соответствует критериям, установленным Положением п. 9 «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

На заседании диссертационный совет принял решение присудить Пузанскому Р.К. ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений».

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 10 докторов наук по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений», участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета (из них 0 человек дополнительно введены на разовую защиту), проголосовали: за 17, против нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель

диссертационного совета

д.б.н.

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.б.н.

13 ноября 2019 года



Ярмишко Василий Трофимович

Лянгузова Ирина Владимировна