

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за присъждане на научната и образователна степен
„доктор”
с професионално направление 4.3 „Биологични науки”,
научна специалност 01.06.08 „Биофизика“

Тема на дисертационния труд:

„МАКРООРГАНИЗАЦИЯ НА ПИГМЕНТ-БЕЛТЪЧНИ КОМПЛЕКСИ В
РАЗЛИЧНИ ФУНКЦИОНАЛНИ СЪСТОЯНИЯ И ЛИПИДНО МИКРООБКРЪЖЕНИЕ”

Автор на дисертацията: Светозар Димитров Стойчев

Рецензент: доц. д-р Анелия Георгиева Добрикова
от Институт по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН,
член на научно жури във връзка със защита на дисертационен труд, съгласно заповед
№ 134/19.03.2015г на директора на ИБФБМИ - БАН

Светозар Стойчев е завършил Софийския университет „Св. Климент Охридски” със специалност „Молекулярна биология”, магистър, през 2010 г. От началото на 2011 г. до края на 2013 г. той е бил редовен докторант към секция „Биомакромолекули и биомолекулни взаимодействия” към Института по биофизика и биомедицинско инженерство – БАН. Той е представил по процедурата всички необходими документи, в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав на ИБФБМИ.

Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем:

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е насочен към изследване ролята на макромолекулната организация на пигмент-белтъчните комплекси във фотосинтетичните мембрани и липидния матрикс за оптималното им функциониране и фотозащита при оксидативен стрес. Изследванията са свързани с **актуалния проблем** в областта на защитните механизми на растенията към променящите се условия на околната среда и оксидативен стрес, в които макроорганизацията на светосъбиращия комплекс на фотосистема 2 (ССК2) играе ключова роля. Познаването на промените, настъпващи в макроорганизацията на пигмент-белтъчните комплекси и в липидното им обкръжение е от фундаментално значение за разбиране механизмите на фотозащита при висши растения, които са обект на голямо внимание и интензивно изследване в последните години. Известно е, че организацията на белтъчните комплекси в тилакоидните мембрани е много динамична и реагира на промените в условията на околната среда посредством промени в конформацията, олигомеризацията и подредеността на комплексите, както и с промени в липидния състав. Тези промени са определящ фактор за адаптацията на растенията и отговора им към стрес фактори на околната среда. Изучаването на фотозащитните механизми на растенията дава възможност както за получаване на конкретна представа за специфичността в действието на тези структурни промени, така и за изучаване на механизмите на адаптация на фотосинтетичния апарат.

Промените, настъпващи в организацията на ФС2 и ССК2, свързани с първата стъпка на процеса нефотохимично гасене на хлорофилната флуоресценция, а именно след протонирането на тилакоидния лумен, все още не са изяснени напълно. В дисертационната работа е използвано протонирането на тилакоидни мембрани и мембранни фрагменти като модел за изучаване на началните стъпки на този фотозащитен механизъм. **Всичко това определя актуалността на представения ми за рецензия дисертационен труд.**

Описание на дисертационния труд:

Дисертационният труд е написан на 128 страници и е структуриран по стандартния начин, състоящ се от разделите: Увод - 2 страници, Литературен обзор - обхващащ 44 страници и 20 фигури, Цел и задачи, Материали и методи - 11 страници, Резултати и дискусия - 33 страници с 22 фигури и 9 таблици, Обобщение - 3 страници, 6 Извода, 4 Приноса и Литературна справка, обхващаща 274 литературни източника.

Литературният обзор представлява компетентен преглед на съществуващата литературата и се състои от 5 раздела, посветени на структурата и функцията на фотосинтетичния апарат и на оксидативния стрес, като специално внимание е отделено на фотофизичните механизми за защита на фотосинтетичния апарат и структурните модели на нефотохимичното гасене. Информацията е добре систематизирана и много подробна, онагледена е с подходящи модели и схеми от съвременни литературни източници (общо 20 фигури). Цитирани са актуални публикации, които обхващат всички съществени страни на проблема, изследван в дисертацията. От литературния обзор е видно, че докторантът познава добре публикуваната литература по темата, може да си служи адекватно с нея и да я представи ясно и разбираемо. Последователното и изчерпателно изложение на обзора показва много добрата теоретична подготовка, както и владееене на терминологията по тематиката. Докторантът обосновава показва необходимостта и ролята на проведените експериментални изследванията в попълването на липсващите проучвания, а именно структурните промени настъпващи в тилакоидните мембрани в началния етап на процеса нефотохимично гасене. Този раздел е написан в тясна връзка с целта на дисертацията и обосновава актуалността на поставените задачи.

Целта и задачите са формулирани ясно и конкретно. Основната цел на настоящата дисертационна работа е да се изследва зависимостта между макроорганизацията на пигмент-белтъчните комплекси и състоянието на протониране, липидното обкръжение и оксидативния стрес, за да се получи по-ясна картина за факторите обуславящи организацията на пигмент-белтъчните комплекси в различни функционални и стресови състояния.

Поставените 3 конкретни задачи са адекватни на целта. За тяхното изпълнение са използвани широк набор от съвременни биофизични и биохимични **методи**, които включват: абсорбционна и флуоресцентна спектроскопия, кръгов дихроизъм, резонансна раманова спектроскопия, диференциална сканираща калориметрия, атомно-силова микроскопия, както и методи за изолиране на нативни тилакоидни мембрани, ФС2-фрагменти и ламеларни агрегати от ССК2. Овладяването на тези изброени методи ще бъде от изключителна полза за бъдещите изследвания на докторанта.

В раздела **Резултати и дискусия** са представени 22 фигури и 9 таблици. В този раздел е описана и анализирана извършената значителна по обем експериментална работа във връзка с поставените задачи.

В първата част на раздела: „Структурна организация на липидния и белтъчния матрикс на тилакоидни мембрани в различни функционални състояния“ са представени и анализирани промените в нискотемпературните флуоресцентни спектри на

тилакоидни мембрани в нативно и протонирано състояние. Резултатите показват, че протонирането на тилакоидните мембрани в буфер с рН 5.2 индуцира гасене на хлорофилната флуоресценцията от пигмент-белтъчните комплекси във фотосинтетичния апарат, което е индикация за стартирало състояние на фотопротекция. Показано е, че липидната фаза също се повлиява от преминаването на тилакоидните мембрани във фотозащитно състояние. Установено е с помощта на липофилния флуоресцентен маркер мероцианин 540, че флуидитетът на мембраните намалява след протониране, което е индикация за по-плътна опаковка на липидите. Получените резултати показват, че флуидитетът на липидния матрикс има регулаторна роля за настъпващите в резултат на протонирането структурните реорганизации в пигмент-белтъчните комплекси.

Във втората част от този раздел са представени нови резултати, свързани с измененията, настъпващи в макроорганизацията, конформацията и температурната стабилност на ФС2-обогатени мембранни фрагменти в резултат от протонирането им. Тези промени са изследвани с помощта на нискотемпературна флуоресценция, атомно-силова микроскопия (АСМ), кръгов дихроизъм и диференциална сканираща калориметрия. Резултатите от АСМ показват, че протонирането води до изтъняване на граналните мембрани, придружено с рандомизация и редуциране размера на ФС2 суперкомплексите. Установено е също прегрупиране на ФС2 суперкомплексите от агрегати, съдържащи 2 комплекса в частично депротонираните мембрани до такива, съдържащи 4 комплекса в протонираните гранални мембрани, съпроводено с отцепване на ССК2 тримери и формиране на самостоятелни ССК2 домени, както и със структурна дестабилизация на ФС2 и на ССК2 тримерите. За първи път са визуализирани самостоятелни домени от ССК2 в гранални мембрани и е показана зависимостта на размерите им от промяната на рН на средата. Получените данни също установяват, че агрегирането на ССК2 настъпва още преди стартирането на ксантофиловия цикъл. На базата на получените нови данни е предложен схематичен модел на ефекта на протониране върху макроорганизацията на пигмент-белтъчните комплекси в граналните мембрани (Фиг. 11 от автореферата, съответно Фиг. 34 от дисертацията), който предполага „шахматно” разположение на срещуположно отстоящите луменални участъци от ФС2 комплексите при рН 5.2, както и фронтално разположение и по-плътна опаковка на суперкомплексите в частично депротонираните мембрани.

Третата част от този раздел разкрива, че протонирането на изолирани ССК2 макроагрегати оказва силно влияние върху състоянието на олигомеризация на този комплекс. Данните демонстрират и ролята на липидното обръжение на ССК2 за осъществяването на рН-индуцираните структурни промени. С помощта на резонансна раманова спектроскопия е установено, че протонирането на ССК2 индуцира конформационни промени свързани с изменения в планарността на каротиноидите неоксантин и лутеин.

Четвъртата част от този раздел изследва структурните промени, настъпващи в тилакоидни мембрани при оксидативен стрес след въздействие с хербицида паракват. Данните показват, че параквата влияе върху макроорганизацията на комплексите в тилакоидните мембрани като индуцира формирането на по-големи хирални макродомени, изградени от ФС2 суперкомплекси. За пръв път е изследвана ролята на сигналната молекула H_2O_2 в защитата на тилакоидните мембрани от оксидативен стрес на ниво структурна организация. Установено е, че H_2O_2 не оказва защитен ефект по отношение на уголемяването на хиралните макроагрегати.

Обобщаването на представените резултати убедително показва, че макроорганизацията на фотосинтетичните комплекси е важен фактор за функционалността на тилакоидните мембрани в различни физиологични и стресови

състояния. Фотопротекцията на фотосинтетичните мембрани се осъществява посредством промени в конформацията, олигомеризацията и подредеността на ФС2 и ССК2 комплексите, както и с промени в опаковането на липидните молекули. Наблюдаваните структурни промени са предпоставка за пълното осъществяване на многокомпонентния процес нефотохимично гасене.

Бележки и препоръки:

По дисертационния труд бих направила някои препоръки и забележки към докторанта, а именно:

- бих отбелязала като забележка пропускане да се дадат в литературната справка някои от цитираните автори, които са дадени в текста. Например: Williams (1998), Yamamoto и съавт. (1999), Goss и съавт. (2005), Sakurai и съавт. (2007), Scheller и съавт. (1997), Gradinaru и съавт. (2000), Minagawa, (2011), Takahashi и съавт. (2013), Andreeva и съавт. (2003), Andreeva и съавт. (2013) и други;

- на места в текста е написано: Chow и съавт., 1999, а в литературата е даден само един автор: Chow W.S., 1999 или е написано: Amunts и Nelson, 2007, а в литературата е дадено: Amunts A., Drory O., Nelson N., 2007 и т.н.

- някои дребни печатни грешки съм посочила лично на докторанта;

- би било уместно да се даде статистическата достоверност на представените резултати, за да може да се оцени по-добре дали промените в стойностите на изследваните параметри показват наистина статистически-значими разлики. Например в Таблица 3 от автореферата и дисертацията, и в Таблица 7 от дисертацията грешките са много големи;

- Фиг. 13 от автореферата показва доста изразен пик при 735 нм, който обикновено не е характерен за нискотемпературните спектри на изолирани ССК2 макроагрегати (Ruban et al., 1997, Biochim. Biophys. Acta 1321:61);

- не става ясно защо, при ресуспендиране на тилакоидните мембрани в буфери с различно рН, са използвани както Tricine с рН 5.2, така и MES с рН 5.2 (Фиг. 2 и Таблица 1 от автореферата, съответно Фиг.22 от дисертацията) и на какво се дължат наблюдаваните разлики при третиране с различните буфери при едно и също рН. Този факт се отбелязва в работата, но не се коментира при дискусията на резултатите. Бих искала да попитам какви са били мотивите за използването им?

Направените забележки не засягат приносите на дисертацията, а по-скоро имат за цел отстраняване и избягване на посочените неточности в бъдещата работа на докторанта.

Изводите от дисертационния труд (6 на брой) са формулирани точно и ясно и са в пълно съответствие с получените резултати.

Основните приноси на дисертационната работа са обобщени по следния начин:

1. Представена е детайлна картина на процесите, настъпващи при протониране на фотосинтетичните комплекси в тилакоидни мембрани и изолирани мембранни фрагменти (гранални мембрани и ламеларни агрегати от ССК2). Установени са промените във физичното състояние на липидния матрикс, в структурната организация и температурната стабилност на инкорпорирани в тилакоидните мембрани пигмент-белтъчни комплекси при преминаването от светосъбиращо във фотопротективно състояние.

2. За пръв път са визуализирани обогатени на ССК2 мембранни домени в гранални мембрани. Установено е, че протонирането на фотосинтетичните мембрани е сигнал за тяхното формиране.

3. Установена е конфигурацията на пигментните молекули неоксантин и лутеин в ламеларни агрегати на ССК2, при две функционални състояния - светосъбиращо и фотозащитно.

4. Демонстрирана е структурно-модулиращата роля на хербицида паракват за макроорганизацията на тилакоидни мембрани.

Приемам изводите и приносите на дисертацията по начина, по който са формулирани. Те изцяло съответстват на целта, поставена в дисертационния труд.

Собствените ми впечатления от докторанта, получени от разговорите и от презентациите, на които съм присъствала, са че той е навлязъл добре в проблематиката, притежава необходимата компетентност и теоретична подготовка, и може правилно да интерпретира получените резултати.

Авторефератът отразява правилно основните резултати на дисертационния труд и по обем и съдържание отговаря на изискванията.

Във връзка с дисертацията са публикувани 3 научни труда, от които 1 статия в авторитетното списание *Biophysical Journal* (IF 3.832), 1 в *Доклади на БАН* (IF 0.198) и 1 в сборник с материали от конференция. В първите две публикации докторантът е първи автор, което показва неговото основно участие в тях. Материали от дисертацията са представени на 5 научни форума – 2 национални и 3 национални с международно участие. Представените наукометрични данни изпълняват изискванията на ИБФБМИ-БАН за присъждане на научната и образователна степен „доктор”.

Заклучение:

Дисертационният труд е посветен на актуалния научен проблем, засягащ механизмите на фотозащита на растенията. Проведени са голям брой изследвания с подходящи и съвременни методи като са получени нови резултати, които представляват принос в разбирането на молекулните събитията, предизвикани от протонирането на мембранните комплекси по време на първия етап на фотозащитния механизъм на фотосинтетичния апарат - нефотохимично гасене.

Считам, че дисертацията на Светозар Стойчев е актуална и е изпълнена на много добро експериментално ниво, със съвременни и информативни методи. Тя до голяма степен е лично дело на докторанта, като показва неговата много добра методична подготовка и теоретични познания в областта на съвременната биофизика на фотосинтетичните мембрани. Дисертационният труд отговаря напълно на изискванията на ЗРАСРБ и на Правилника за приложението на ЗРАСРБ на ИБФБМИ-БАН.

Всичко това ми дава основание да дам своята **положителна оценка** и убедено да препоръчам на членовете на Научното жури да присъдят на кандидата Светозар Стойчев научната и образователна степен „доктор”.

12.06.2015 г.
гр. София

Рецензент:
/Доц. Анелия Добрикова/