

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен
„доктор” в професионално направление
4.3 „Биологически науки”, научна специалност 01.06.08 „Биофизика“

Тема на дисертационния труд:

„Промени в ефективността на фотосинтетичните процеси в *Arabidopsis thaliana* в отсъствието на лютеин и при въздействие с висок светлинен интензитет”

Автор: **Константин Владимиров Добрев**

Научен ръководител: проф. д-р Антоанета Попова

Научен консултант: проф. д-р Мая Величкова

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 № 815/12.11.2018 г. на директора на ИБФБМИ - БАН

Константин Владимиров Добрев е бил зачислен като редовен докторант по специалността „Биофизика” към секция „Фотовъзбудими мембрани” в ИБФБМИ – БАН от 01.02.2013 г. и в момента е отчислен с право на защита. Той е завършил Софийския Университет „Св. Климент Охридски“ през 2012 г. като е придобил магистърска и бакалавърска степен съответно по „биохимия“ и „молекулярна биология“. По процедурата той е представил всички необходими документи в съответствие с Правилника за приложението на ЗРАСРБ в ИБФБМИ-БАН.

Константин Добрев е бил ръководител на 1 проект по Програмата на БАН за подпомагане на младите учени ДФНП-134/2016 г., свързан с дисертационния труд.

Представеният дисертационен труд обхваща общо 132 страници и включва: Увод – 1 стр., Литературен обзор - 34 стр. и 13 фигури, Цел и 3 поставени задачи - 1 стр., Материали и методи - 12 стр. с 3 фигури, Резултати и Обсъждане - 60 стр. с 3 таблици и 45 фигури, Заключение – 2 стр. Въз основа на получените резултати в

дисертационния труд са направени 9 Извода и са посочени 5 Приноса. Използваната литературна справка включва общо 133 източника.

Актуалност и значимост на дисертационния труд:

В процеса на развитието си растенията са подложени на различни стресови фактори на променящата се околна среда, които оказват неблагоприятно въздействие върху ефективността на фотосинтетичните процеси и повлияват негативно тяхното развитие. Изследванията, свързани с изучаване на механизмите за предпазване и аклиматизация на растенията към външната среда като поддържат ефективна фотосинтеза придобиват все по-голямо значение в последните години. Каротеноидите са съществен компонент на фотосинтетичните мембрани и изпълняват важни функции при поглъщането и предаването на светлинната енергия, участват в обезвреждането на излишната погълната светлина. Лютеинът е най-разпространеният ксантофил, произведен от алфа-каротина, който представлява около 50% от свързаните ксантофили в светосъбиращите комплекси при висшите растения, има структурна функция в тях и също участва в процесите на фотопротекция чрез гасене на триплетните форми на хлорофила и активните кислородни форми. Въпреки че ролята на лутеина в фотосинтетичните процеси е изследвана интензивно, функционалното му значение все още не е напълно разбрано. Всичко това определя актуалността на представения ми за рецензия дисертационен труд.

Литературният обзор е добре систематизиран, достатъчен по обем и представлява компетентен преглед на съществуващите литературни данни до момента по тематиките на дисертацията, което показва много добра теоретична подготовка на докторанта. Представената информация е много подробна и онагледена с подходящи модели и фигури. Той се състои от 5 основни раздела, включващи съвременните представи за състава и структурната организация на фотосинтетичния апарат, локализиран в тилакоидните мембрани на висши растения. Представени са литературни данни за ефектите от третиране с висок светлинен интензитет: фотоинхибиране, нефотохимично гасене и фотообезцветяване, както и за механизмите на фотопротекция на фотосинтетичния апарат на висшите растения. В последния раздел са дадени характеристиките на мутанта *lut2* на *Arabidopsis thaliana*, който не

синтезира лютеин и като резултат се наблюдава намален размер на светосъбиращия комплекс на ФС2 и дестабилизиране на тримерната структура на ССК2.

Целта на настоящия дисертационен труд е формулирана конкретно и ясно, а именно: Да се изясни ролята на каротеноидите и най-вече на най-разпространения каротеноид лютеин за (1) устойчивостта на фотосинтетичния апарат на висши растения към условията на абиотичен стрес – силна светлина при стайна или ниска температура и (2) за организацията на пигмент-белтъчните комплекси в тилакоидните мембрани в условията на висок светлинен интензитет.

За постигането на тази цел са формулирани **3 основни задачи** и е показана схема на експерименталната работа. Обект на изследванията е моделното растение *Arabidopsis thaliana* див тип (Col-0) и мутанта lut2, който не синтезира лютеин. За изпълнението на поставените задачи са използвани **съвременни биофизични и биохимични методи**, които включват: РАМ хлорофилна флуоресценция за определяне активността на ФС2 и на окислително-редукционното състояние на ФС1, нискотемпературна (77K) хлорофилна флуоресценция, полярографски методи за измерване на кислородното отделяне на цели листа и на тилакоидни мембрани, абсорбционна спектроскопия, SDS-PAGE електрофореза и имунодетекция. Подробно са описани и различните методи за определяне на фотосинтетичните пигменти, изолиране на тилакоидни мембрани, измерване на фотохимичните активности на ФС1 и ФС2. Направена е и статистическа обработка на експерименталните резултати.

Разделът **Резултати**, с общо 45 фигури и 3 таблици, е разделен и представен в три основни части. Всяка част накрая завършва с обсъждане на резултатите. В този раздел е описана и анализирана извършената значителна по обем експериментална работа във връзка с поставените задачи. Основните резултати, получени в дисертационната работа, могат да се представят накратко по следния начин:

Във връзка с **първата задача**: „Да се проследят промените във фотосинтетичната активност и да се установи ролята на лютеина при фотоинхибиране *in vivo* при стайна и при ниска температура на *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2“, са третирани цели листа от дивия тип (wt) и мутанта lut2 с висок светлинен интензитет при стайна (22°C) и ниска (8-10°C) температура за различно време (0 - 4.5 ч.). В тази част са проследени и анализирани промените в активността на кислородното

отделяне, фотосинтетичните параметри на ФС2, редокс състоянието на P700 и концентрацията на фотосинтетичните пигменти на цели листа. Енергетичното взаимодействие между основните пигмент-белтъчни комплекси, фотохимична активност на двете фотосистеми и активността на кислород-отделящата система (промяната на бързите и бавните ФС2 реакционни центрове) са изследвани върху изолирани тилакоидни мембрани от третираните листа. Показано е, че при нормални условия мутантът *lut2*, който не синтезира лютеин, се характеризира с по-ниско ниво на кислородно отделяне и усвояване на енергията от ФС2 в сравнение с дивия тип, а енергетичният натиск върху ФС2 е по-висок, цикличният електронен транспорт около ФС1 е по-бърз и преносът на енергия от ФС2 към ФС1 е по-силно изразен, което най-вероятно се дължи на по-голям процент стромални участъци и/или по-голяма популация на ФС1 комплексите. Получените резултати след третирането с висок светлинен интензитет показват, че степента на фотоинхибиране *in vivo* зависи от температурата и времето на осветяване като е по-силно изразена при *lut2* в сравнение с *wt*. Установено е, че при фотоинхибиране липсата на лютеин повишава чувствителността на ФС2 по отношение на електронния транспорт, ефективността на кислородното отделяне и максималната квантова ефективност. За разлика от дивия тип, при мутанта *lut2* се наблюдава също намаление в количеството на каротеноидите след осветяване на листата с висок интензитет. Всички наблюдавани промени са по-силно изразени при третиране при ниска температура. Установено е също, че при фотоинхибиране наблюдаваните промени в енергетичното взаимодействие между ФС2 и ФС1, изразено в пренасочване на повече енергия към ФС1, са по-силно изразени при мутанта *lut2* и най-вероятно са свързани с реорганизация на пигмент-белтъчните комплекси. След фотоинхибиране *in vivo* е показано, че намаляват активните ФС2 центрове, разположени в граналните участъци на тилакоидните мембрани като нараства приносът на бавните ФС2 реакционни центрове, което е много по-силно изразено при мутанта *lut2*. Установено е също, че значителна част от излишната погълната светлинна енергия от листата на *wt* и *lut2* се обезврежда по механизъм, който не зависи от функционирането на ксантофиловия цикъл като този механизъм отново има по-голям принос при *lut2*. В процеса на осветяване

енергетичният натиск върху ФС2 е по-висок и цикличният електрон транспорт около ФС1 е по-силно изразен при мутанта в сравнение с дивия тип.

По втората задача „Да се характеризира промяната в активността на ФС1 и ФС2, енергетичното взаимодействие между основните пигмент-белтъчни комплекси и белтъчния профил на фотосинтетичните комплекси в резултат на третиране с висок светлинен интензитет на изолирани тилакоидни мембрани на *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, при стайна и ниска температура“, са наблюдавани промените, настъпващи след фотоинхибиране *in vitro*, при което изолираните тилакоидни мембрани са осветявани при стайна (22°C) и ниска температура (4°C) с висок интензитет в продължение на 1 час. Проследени са промените в следните параметри: максимален квантов добив на ФС2, фотохимична активност на ФС2 и ФС1, ниско-температурни флуоресцентни спектри, светкавични кислородни добиви и амплитуда на кислородното избухване при постоянно осветяване в отсъствието на електронен акцептор. Получените резултати показват, че и при двата вида тилакоидни мембрани активността на ФС1 се засяга в по-малка степен при фотоинхибиране *in vitro* в сравнение с фотохимичната активност на ФС2. Установено е, че при фотоинхибиране на тилакоидните мембрани проведено при ниска температура, максималната квантова ефективност на ФС2 намалява с увеличаване времето на третиране, както при wt така и при lut2, но намалението е по-слабо изразено в сравнение с това при стайна температура.

Третата задача „Да се проследи степента на светлинно-индуцираното обезцветяване на фотосинтетичните пигменти и степента на деградация на компонентите на светосъбиращите комплекси на ФС1 и ФС2 в изолирани тилакоидни мембрани на *Arabidopsis thaliana*, wt и lut2, при стайна температура“, се фокусира върху изясняване ролята на лютеина в процесите на фотообезцветяване на фотосинтетичните пигменти в изолирани тилакоидни мембрани, третирани с висок светлинен интензитет в продължение на 5 ч. при стайна температура. Показано е, че липсата на лютеин увеличава степента и кинетиката на фотообезцветяване на фотосинтетичните пигменти като най-засегнати са хлорофил *a* и каротеноидите. При продължително осветяване е наблюдавано и разграждане на белтъците от антенните комплекси на двете фотосистеми, по-силно изразено при мутанта lut2. Установено е, че белтъкът PsbS, който е част от светосъбиращия комплекс на ФС2 и за който се

предполага, че играе роля в процеса на нефотохимичното гасене, също се засяга от високата светлинна интензивност.

Накрая резултатите са обобщени в **9 извода** и са посочени **5 приноса**, които съответстват на поставените задачи и на получените експериментални резултати в дисертационния труд.

Приемам **основните приноси** на дисертационния труд, които могат да се обобщят по следния начин:

Направен е детайлен анализ на фотосинтетичната активност на мутанта *lut2* на *Arabidopsis thaliana*, който не синтезира лютеин, по отношение на чувствителността му към осветяване с висок светлинен интензитет при нормална и ниска температура. Представените нови данни показват, че липсата на лютеин ускорява процесите на инактивация на фотосинтетичния апарат в резултат на фотоинхибиране *in vivo*, като наблюдаваните промени са по-силно изразени при осветяване при ниска температура. За първи път е показано, че липсата на лютеин ускорява (1) процеса на обезвреждане на излишната погълната светлинна енергия по механизъм, който не зависи от функционирането на ксантофиловия цикъл, (2) цикличния електронен транспорт около ФС1, (3) обезцветяването на фотосинтетичните пигменти и разграждането на белтъците на светосъбиращите комплекси, което е индикация, че лютеинът играе съществена роля при обезвреждане на светлинно-индуцираните активни кислородни форми.

Авторефератът отразява правилно основните резултати, получени в дисертационния труд като по обем (48 стр.) и съдържание отговаря на изискванията.

Бележки и препоръки по дисертационния труд:

- В дисертацията и автореферата се забелязват много технически и правописни грешки, както и стилистични неточности, които затрудняват възприемането на информацията. Няколко примера за това са: „ксантофиловия цикъм” вместо „ксантофиловия цикъл”, „стромали учатьци” вместо „стромални участъци” и т.н. или изрази като: „Засиленото енергетичният натиск на ФС2 под влияние на високата

светлина иницира”, „беше определено от промяната на индуцираната от червена светлина промяна на абсорбцията”, и други от този вид.

- Представената формула в дисертацията за определяне на фотохимичното гасене (qP) в раздела 4.12.1. на Материали и методи не е коректна, тъй като вместо параметъра “ F_0 ” трябва да бъде “ F_0' ”. Предполагам, че тази грешка е допусната по невнимание, тъй като в автореферата формулата е правилна.

- В автореферата са допуснати много грешки при номериране на фигурите и при тяхното цитиране в текста. Например: В надписа на Фиг. 4 е написано „Фиг. 43” и „изчислени от светлинните криви на фиг. 3”, вместо на фиг. 2. На стр. 12 са номерирани две фигури като „Фиг. 7”. Неправилно цитиране на фигурите в текста се забелязва на стр. 11 (фиг. 5 вместо фиг. 6), стр. 16 (фиг. 3 вместо фиг. 13) и стр. 20 (фиг. 15 вместо фиг. 16 и фиг. 16 вместо фиг. 17). Броят на представените таблици в автореферата е 2, а не 3.

Направените забележки не засягат приносите на дисертацията, а по-скоро имат за цел избягване на посочените грешки и неточности в бъдещата работа на докторанта. Добре е в бъдеще да проявява повече старание и да обръща повече внимание на детайлите, тъй като така ще се постигне по-ясно представяне на информацията.

Въпроси към докторанта:

- Как са определяни контролите при фотоинхибиране *in vitro*? Дали контролните тилакоидни мембрани са държани за същия период от време (1-5 часа) при стайна температура като фотоинхибираните и наблюдавана ли е разлика в тяхната активност?

- Дали получените резултати за количеството на белтъците от реакционните центрове на ФС1 (PsaB) и ФС2 (D1) показват разлика между дивия тип и мутанта? Това би помогнало при интерпретацията на някои от получените резултати, а данните в Таблица 3 от дисертацията са представени само като процент от контролите.

Наукометрични данни:

Във връзка с дисертацията са публикувани **3 научни статии** в списания с импакт фактор: 2 в международните реномирани списания *Photosynthesis Research* (IF = 3.091) и *Photochemistry and Photobiology* (IF = 2.214), и 1 в българското списание *C. R. Acad.*

Bulg. Sci. (IF = 0.27). Забелязано е и едно цитиране. Всичко това потвърждава наличието на нови и оригинални резултати в дисертационния труд. Трябва да се отбележи, че в 2 от публикациите докторантът е първи автор.

Материалите от дисертацията са представени общо на 6 научни форума, от които 4 на научни конференции с международно участие и 2 като доклади на национални научни сесии за млади учени.

Заклучение:

От представения материал се вижда, че е извършена значителна по обем и качество научно-изследователска работа с подходящи и съвременни биофизични и биохимични методи като са получени нови и оригинални резултати. Тези резултати са публикувани в 3 списания с импакт фактор. Считаю, че дисертационният труд на Константин Добрев до голяма степен е лично дело на докторанта и показва неговата добра теоретична подготовка и познания в областта на съвременната биофизика на фотосинтетичните мембрани. Дисертационният труд напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и на Правилника за приложението му в 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 **Константин Владимиров Добрев** образователната и научна степен „доктор” по научната специалност „Биофизика”, професионално направление 4.3. „Биологически науки”.

11.01.2019 г.
гр. София

Рецензент:
/ Доц. д-р Анелия Г. Добрикова/