

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:
**„СТРУКТУРНА СТАБИЛНОСТ И МЕЖДУМОЛЕКУЛНИ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВНИТЕ СВЕТОСЪБИРАЩИ
КОМПЛЕКСИ В ТИЛАКОИДНИ МЕМБРАНИ НА ВИСШИ РАСТЕНИЯ И
ЦИАНОБАКТЕРИИ”**

Автор: **Ния Златкова Петрова**

Научен ръководител: проф. д-р Сашка Крумова
Научен консултант: проф. дбн Стефка Танева

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 № 1112/ 16.12.2019 г. на директора на ИБФБМИ - БАН

Ния Златкова Петрова е завършила Софийски университет „Св. Климент Охридски“, София, през 2015 г. с магистърска степен по специалността: Растителни биотехнологии. В началото е започнала работа като специалист-биолог в ИБФБМИ-БАН, след което от 01.01.2016 г. е била зачислена като задочен докторант по специалност „Биофизика” към секция „Биомакромолекули и биомолекулни взаимодействия” към ИБФБМИ – БАН. В момента е отчислена с право на защита и работи като асистент в същата секция. По процедурата тя е представила всички необходими документи, в съответствие с Правилника за приложението на ЗРАСРБ в ИБФБМИ - БАН.

По време на своята докторантура, Ния Петрова е спечелила стипендии за три специализирани курса по: „Молекулни и биофизични основи на фотосинтезата“ - Венеция, Италия; „Биофизични методи за изследване на биомолекулните взаимодействия“ - Сао Пауло, Бразилия и Практическо обучение по програма „Еразъм+“ в Лаборатория по фотосинтетични мембрани, Сегед, Унгария. Тези

обучения, свързани с темата на дисертационния труд, несъмнено са били от голяма полза на докторантката за придобиване на опит в международни лаборатории и обучение със съвременни биофизични техники за изследване на фотосинтетични мембрани. Освен това, Ния Петрова е била и ръководител на един проект към Програмата за подпомагане на млади учени и докторанти в БАН – 2017 г., който е получил награда за най-успешен младежки проект.

Актуалност и значимост на дисертационния труд:

През последните години все повече усилия в световен мащаб са насочени към изясняване на защитните механизми на растенията към променящите се условия на околната среда и по-специално към изясняване механизмите на адаптация на фотосинтетичния апарат с цел подобряване ефективността на фотосинтезата. Известно е, че оптималната активност на фотосинтетичния апарат на висшите растения при стресови условия се определя от сложни структурно-функционални зависимости, включващи динамични промени в състава и структурата на фотосинтетичните мембрани, в които съществена роля играе светосъбиращия комплекс на фотосистема 2 (ССК2), който освен светосъбираща има и регулаторна функция като балансира потока на енергията, насочена към реакционните центрове на двете фотосистеми, чрез промяна на своята макроорганизация. При цианобактериите, фикобилизомите са тези светосъбиращи комплекси, които поддържат и балансират работата на фотосинтетичния апарат в условия на стрес. Въпреки дългогодишните интензивни изследвания върху молекулните механизми на адаптацията на фотосинтетичния апарат на висшите растения, формирането на макрокомплекси, тяхното междумолекулно взаимодействие и специфично разпределение в различните участъци на тилакоидните мембрани, все още не са изяснени напълно. Тези изследвания придобиват все по-голяма важност с настъпващите интензивни промени в климата и в обкръжаващата ни среда, при които растенията трябва да оцеляват. Ето защо считам за актуална темата на представения ми за рецензия дисертационен труд, свързана с изучаване на структурната стабилност и междумолекулните взаимодействия на основните светосъбиращи комплекси при висши растения и

цианобактерии, корелиращи с различната структурна организация на фотосинтетичните мембрани, за по-пълно разбиране отговора и адаптацията на фотосинтетичния апарат към променящите се светлинни условия.

Описание на дисертационния труд:

Представеният дисертационен труд е написан на 114 страници и е структуриран по стандартния начин, състоящ се от разделите: I. Увод - 1 страница, II. Литературен обзор - обхващащ 26 страници и 12 фигури, III. Цел и задачи - 1 страница, IV. Материали и методи - 16 страници и 3 фигури, V. Резултати – 34 страници с 17 фигури и 7 таблици, VI. Дискусия - 11 страници, 7 Извода, 4 Приноса и Литературна справка, включваща 223 литературни източника.

Литературният обзор е добре систематизиран и представя обстоен научен преглед на съвременните литературни данни, свързани с процеса фотосинтеза, състава, структурата и функционална активност на фотосинтетичния апарат при висши растения и цианобактерии. Представеният обзор е онагледен с подходящи модели и фигури, цитирани са актуални и съвременни литературни източници, което показва, че докторантката има добра теоретична подготовка и е запозната с последните научни изследвания и хипотези в областта.

Литературният обзор е написан в тясна връзка с целта на проведените изследвания в дисертацията и показва актуалността на поставените задачи.

Целта и задачите са формулирани ясно и конкретно. Целта на настоящата дисертация е да се изследва задълбочено корелацията между специфичната архитектура на фотосинтетичния апарат при висши растения и цианобактерии, и структурната стабилност на техните основни светосъбиращи комплекси (ССК2 и фикобилизоми). За постигането на тази цел са формулирани **2 основни задачи**:

1. Изследване на степента на стиковане на мембраните като фактор, който повлиява стабилността на ССК2 чрез модулиране на протеин-протеин и протеин-липидните взаимодействия на комплекса, и контролира функционалността на фотосинтетичния апарат.

2. Прилагане на калориметричен подход за изследване на структурната стабилност на фикобилизоми в интактни клетки на цианобактерии. Установяване ролята на структурната организация и протеиновия състав на тилакоидните мембрани, и физическото взаимодействие между фикобилизомите и фотосистемите за структурната цялост на тези антенни комплекси.

За изпълнението на поставените задачи са използвани **съвременни биофизични и биохимични методи**, които включват: абсорбционна спектроскопия, диференциална сканираща калориметрия (ДСК), кръгов дихроизъм (КД), бърза хлорофилна флуоресценция (ОJIP тест), нискотемпературна (77К) флуоресценция, методи за изследване флуидитета на тилакоидни мембрани (с флуоресцентните маркери – MS540 и лаурдан), както и различни методи за изолиране и третиране на тилакоидните мембрани, изолиране на фикобилизоми, определяне на хлорофилно и белтъчно съдържание. В раздела „Материали и методи” подробно е описано отглеждането на граховите растения и култивирането на *Synechocystis* PCC6803 див тип и мутантни клетки. Овладяването на всички тези изброени методи ще е от изключителна полза за бъдещата научна дейност на докторантката.

В разделите **Резултати** и **Дискусия** е описана и обсъдена извършената значителна по количество експериментална работа във връзка с поставените задачи. Експерименталните резултати са разделени и представени в две основни части.

По първата задача е изследвана ролята на различната архитектура (степен на стиковане) на тилакоидните мембрани за термодинамичните свойства на ССК2 и функционалните характеристики на фотосинтетичния апарат на висши растения. За целта са изследвани грахови растения, адаптирани към умерен или нисък светлинен интензитет и тилакоидни мембрани, изолирани от тях (съответно MS или LS тилакоиди); *in vitro* разстиковани тилакоидни мембрани от грахови растения, отглеждани при умерен (MU) или нисък (LU) светлинен интензитет и MS тилакоиди, инкубирани в среда с pH 5.2. Експериментално е установено повишено образуване на грани (стиковане, с около 37%) при LS тилакоидите в

сравнение с MS тилакоидите, както и още по-значително увеличение на количеството на граните (с около 70%) след ресуспендирането на MS тилакоиди в среда с рН 5.2. Чрез диференциална сканираща калориметрия и кръгов дихроизъм е установено, че промяната в микрообкръжението на ССК2, предизвикана от разстиковането на тилакоидните мембрани, води до стабилизация на мономерите и тримерите на ССК2. От друга страна, повишената степен на стиковане на тилакоидите е свързана с понижаване на термодинамичната стабилност на ССК2, както и цялостна дестабилизация на тилакоидните мембрани, след ресуспендирането им в среда с рН 5.2. Доказано е, че наблюдаваното стабилизиране на ССК2 се дължи на свързването му с ФС1, а не на формирането на ССК2 агрегати и е асоциирано с повишен флуидитет на липидния матрикс на мембраните. Потвърден е научния факт, че увеличеното количество на граните при тилакоиди, адаптирани към нисък светлинен интензитет, е придружено с реорганизация на ФС2 и понижена ефективност на електронния транспорт към ФС1. Експериментално е установено, че фотозащитната форма на ССК2, индуцирана чрез инкубиране на тилакоидните мембрани при рН 5.2, се характеризира с по-ниска термодинамична стабилност, отколкото светосъбиращата конформация на ССК2.

По втората задача са изследвани изолирани фикобилизоми от *Synechocystis* PCC6803 див тип и мутанта СК, при който фикобилизомите се състоят единствено от трицилиндричен алофикоцианинов комплекс. Интактността на изолираните фикобилизоми е оценявана посредством нискотемпературна флуоресценция. Проследена е температурната зависимост на абсорбционните спектри на изолирани фикобилизоми и интактни клетки *Synechocystis* PCC6803 див тип и мутанта СК. Показани са термограмите на изолирани фикобилизоми от див тип и мутанта СК като са анализирани техните термодинамични параметри.

В тази задача са сравнени и калориметричните профили на фотоавтотрофни и фотомиксотрофни клетки див тип, и подбрани мутанти, при които липсват фикобилизоми (PAL) и/или някоя от двете фотосистеми (BE, PSII-, PSI-/ArcE-). Установено е, че термодинамичната стабилност на фикобилизомите зависи от свързването им към ФС1 или ФС2, като това води до тяхното стабилизиране.

Получените резултати ясно доказват, че ДСК методът е приложим за определяне на структурната цялост на фикобилизомите както в изолирано състояние, така и в интактни клетки на цианобактерии.

В раздела **Дискусия**, докторантката е обсъдила подробно получените нови резултати и с какво те допринасят за обогатяване на вече известните научни факти и хипотези. Задълбоченото познаване на обширната литературна информация по изследваните проблеми е позволило на докторантката да представи целенасочено и добре аргументирано обсъждане на получените резултати в дисертационния труд.

Накрая резултатите са обобщени в **7 извода** и са посочени **4 приноса** на дисертационния труд, които са формулирани кратко и ясно, и напълно съответстват на получените експериментални резултати.

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

Проведено е детайлно проучване на факторите, определящи зависимостта на термостабилността на ССК2 от промяната в архитектурата на тилакоидните мембрани. Показано е значението на протеин-протеиновите взаимодействия и флуидитета на липидния матрикс за термодинамичната стабилност на ССК2. Демонстрирана е корелация между степента на стиковане на тилакоидните мембрани и температурната стабилност на ССК2. Оригинален принос на дисертационния труд е изследваната за пръв път в нативно мембранно обкръжение кинетична стабилност на ССК2 в две функционални състояния - светосъбиращо и фотозащитно.

Чрез сравнение между термодинамичните профили на интактни изолирани фикобилизоми с тези на цели клетки от различни мутанти на *Synechocystis*, е идентифициран термодинамичният преход, отразяващ денатурацията на фикобилизомите. Доказана е приложимостта на ДСК метода за оценка на структурната цялост на фикобилизомите в цели клетки *Synechocystis* PCC6803 див тип и негови мутанти.

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

Бележки, препоръки и въпроси по дисертационния труд:

- Тук ще отбележа, че липсва описание за статистическата (софтуерна) обработка на експерименталните резултати в раздела Материали и методи, но в надписите на таблиците е посочено, че статистиката е правена според „тест на Стюdent“. Бих препоръчала на докторантката в бъдеще да използва ANOVA за оценяване на статистически значимите разлики при множествени сравнения между всички представени стойности в таблиците.

- По отношение на представения списък на научните публикации по темата на дисертационния труд, в първата статия липсва името на професор Z. Gombos като съавтор, вместо това са поставени точки.

- В литературата е известно, че липидният състав на тилакоидните мембрани се променя, когато растенията са подложени на различни стресови условия, което води и до промяна в макроорганизацията на мембранните комплекси. Тъй като в поставените задачи се акцентира върху протеин-липидните взаимодействия на ССК2 считам, че в дисертацията трябва да има по-подробно описание как различните липидни класове и/или мастно-киселинен състав влияят върху температурната стабилност и макроорганизацията на ССК2. Това много бегло е споменато в литературния обзор като само са посочени литературните източници.

- Дали има някакви данни за промяна в липидния състав на тилакоидните мембрани или в количеството на двете фотосистеми при двата светлинни интензитета на отглеждане на растенията?

Въпросите ми са уточняващи и направените забележки не засягат приносите на дисертацията.

Собствените ми впечатления от докторантката Ния Петрова са, че тя е много трудолюбива, запозната е много добре с използваните методи, притежава необходимата компетентност и експериментална подготовка. Считам, че тя може отговорно и самостоятелно да провежда научни експерименти.

Във връзка с дисертацията са публикувани **3 научни статии** в международни реномирани списания с импакт фактор: 1 в *Photosynthesis Research* – IF 3.057 (Q1), 1 в *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* – IF 2.548 (Q2), която вече има 1 забелязан цитат, и 1 в *Acta Physiologiae Plantarum* – IF 1.608 (Q2). Тези публикации потвърждават наличието на нови и оригинални резултати в дисертационния труд. Трябва да се отбележи, че и в трите публикации Ния Петрова е първи автор, което показва нейния личен принос в тях. Материалите от дисертацията са представени общо на 8 научни форума, от които 3 международни в чужбина. Тези наукометрични данни напълно изпълняват изискванията на ИБФБМИ - БАН за присъждане на образователната и научна степен „доктор”.

Заключение:

Дисертационният труд е актуален. Извършена е значителна по обем и качество научно-изследователска работа с подходящи и съвременни биофизични и биохимични методи. Получените нови и оригинални резултати са публикувани в 3 международни реномирани списания с импакт фактор (1- Q1 и 2- Q2).

Считам, че дисертационният труд на Ния Златкова Петрова до голяма степен е лично дело на докторантката и показва нейната много добра теоретична и практическа подготовка в областта на биофизичните изследвания на фотосинтетичните мембрани. Дисертационният труд отговаря напълно 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 кандидатката **Ния Златкова Петрова** образователната и научна степен „доктор” по научната специалност „Биофизика”, професионално направление 4.3. „Биологически науки”.

21.02.2020 г.
гр. София

Рецензент:
/ Доц. д-р Анелия Добрикова/