

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на **Любен Иванов Загорчев** на тема: „**Биохимични промени в състава и структурата на клетъчна стена на ембриогенни калусни култури от *Dactylis glomerata L.*, третирани с NaCl**” за присъждане на образователната и научна степен „**Доктор**” по професионално направление 4.3. Биологическа наука (Биохимия)

Рецензет: доц. д-р Тренка Аргирова Гетова

Представеният за рецензия дисертационен труд третира актуален, интересен и труден за разработване проблем. Изследванията целят изучаване механизмите на адаптация на растенията към солеви стрес. Световната селското стопанство и създаването на солево толерантни линии културни растения е актуален от теоретична и практическа гледна точка въпрос. Избран е интересен експериментален модел – ембриогенни калусни култури от *Dactylis glomerata L.* от сем. Житни. Изследванията са центрирани върху промените в състава и структурата на клетъчната стена под влияние на различни солеви концентрации през различните етапи на реализиране на ембриогенния потенциал. Соматичната ембриогенеза е уникален за растенията процес, чието успешно приложение е перспективен подход за селекция по биотехнологичен път на растения с желани качества. Трудността произлиза, до голяма степен, от обекта на изследванията - клетъчната стена, която е един от най-малко изучените и трудни за изследване компоненти на растителната клетка. Доскоро тя бе считана за механична опора на растителните клетки, изпълняваща пасивни защитни функции. Появявилите се нови данни за клетъчната стена като динамична структура, реагираща активно на промените в околната среда са провокирали изследванията в представената дисертация. При изследване на белтъците на клетъчната стена, които имат активна роля в мвтаболизма и преструктурирането ѝ, традиционните подходи за пречистване и идентификация често са неприложими и изискват остроумни модификации. Макар че са идентифицирани редица гени, кодиращи белтъци на клетъчната стена, не е ясно кои от тях се експресират и каква е динамиката на тази експресия във времето. Белтъците на клетъчната стена са в ниски концентрации, подложени са на разнообразните следсинтетични модификации и са асоциирани и маскирани с различни съпътстващи ги високомолекулни съединения и.

Любен Загорчев е задочен докторант към катедра Биохимия на Софийския университет. Той е представил по процедурата всички необходими документи, изисквани от Закона за присъждане на научни звания и степени и Правилника за приложението му.

Дисертационният труд е структуриран по класическия модел с много добре балансирани помежду си дялове: Увод – 2 стр.; Литературен обзор - 19

стр.; Цел и задачи - 1 стр.; Материали и методи - 15 стр; Резултати - 23 стр.; Дискусия - 24 стр.; Заключение - 1 стр.; Изводи - 2 стр. и Приноси - 2 стр.

Цитирани са 227 литературни източници, в голямата си част от последните години. Работата е илюстрирана с 34 фиг. и 6 таблици.

Литературният обзор е сравнително кратък, но задълбочен и аналитичен, умело представящ съвременното състояние на проблема. Характеризирана е соматичната ембриогенеза, като процес при който дадена соматична клетка се репрограмира, дедиференцира и формира соматичен ембрионид; описани са етапите през които преминава и връзката между генотипа и ембриогенния потенциал на дадена клетка, сумирано са представени гените, чиято експресия се индуцира в процеса на реализиране на ембриогенния потенциал. Следва компетентно разглеждане на понятието стрес и фазите на стресовия отговор, особеностите при растенията, повишените концентрации на солите като вид абиотичен стресов фактор, който води до големи загуби при отглеждане на културните растения, модерните стратегии за мониторинг и селекция на солево толерантни линии. Нагледно са представени съвременните схващания за етапите и механизмите за отговор към осмотичен и солеви стрес. Особено внимание е отделено на разглеждане съвременното състояние за структурните и функционални белтъци на клетъчната стена и евентуалното им участие в адаптационния отговор на клетката към солеви стрес. От литературния обзор проличава дълбокото познаване на проблема и научната терминология от докторанта. От прегледа на състоянието и нерешените въпроси в изследваната област логично произтичат целите, поставени при разработването на дисертационния труд и задачите за постигането им. Те са формулирани лаконично и ясно.

Главата „**Материали и методи**” ясно демонстрира богатия методичен арсенал, използван от докторанта. Голямата гама от техники започва от клетъчно култивиране, минава през метаболомен анализ, включващ разнообразни препаративни и аналитични техники, ДНК рекомбинантни и имуно-техники за получаване на антитела срещу избран белтък, имунолокализация на определени белтъци в клетъчната стена, голямо разнообразие от електрофоретни техники и др. и стига до определяне функционалната активност на избрани белтъци и секвенционен анализ. Описанието е грамотно и пълно, позволяващо въпроизвеждане на отделните методики, значителна част от които са подходящо модифицирани. От прегледа на използваните методи става ясно, че дисертационният труд е разработен в една работеща, модерна лаборатория. Използвани са и възможностите на няколко чуждестранни лаборатории, с които научният колектив е в тясно сътрудничество.

В раздела „**Резултати**„ на фона на резултатите за влиянието на солеви стрес върху ембриогенния отговор и нарастването на суспензионните култури, докторантът изследва динамиката в количествения и качествения състав на две групи съединения: 1. Нискомолекулни осмопротектанти и антиоксиданти - L-

пролин, токохроманоли и компонентите на тиол-дисулфидните редокс-системи (глутатион-глутатион дисулфид и цистеин-цистин) в клетката.

2. Високомолекулни съединения - структурни и функционални белтъци на клетъчната стена. Крайната цел е идентифицирането на промени или съединения, потенциални маркери за фазите на соматична ембриогенеза и /или солева толерантност на *Dactylis glomerata*. Получени са многобройни, значими резултати. По-голямата част от експерименталните резултати са оригинални и малка част са с потвърдителен характер. Резултатите показват, че експериментите са планирани системно, в логична последователност, целяща постигане на отговор на поставените задачи. Без да разглеждам всички резултати, бих открила само някои, които са особено интересни и оригинални: На първо място това са данните за връзката между фазите на соматичната ембриогенеза и окислително-редукционния потенциал на ниско-молекулните тиоли в клетката. Показано е, че по-съществени са промените на общия редокс-потенциал на нискомолекулните тиоли, отколкото промените поотделно на редокс-потенциалните на системите глутатион-глутатион дисулфид и цистеин-цистин. Намерено е, че през фазите на интензивно натрупване на растителна маса вътрешната среда е по-редуцираща, отколкото през фазата на формиране на зрели ембриоиди. Тези резултати показват важната регулаторна роля на редокс-системата цистеин-цистин, чиято роля в растенията не е добре изучена. Изказана е хипотезата, че е възможно една от причините за инхибирането на соматичната ембриогенеза, наблюдавано при третиране на културите с 0.17 M NaCl, да е отклонението на стойностите на редокс-потенциала на нискомолекулните тиоли (и тяхната активност като антиоксиданти) в сравнение с контролите и културите, третирани с 0.085M NaCl. Би бил интересен и въпросът за връзката на соматичната ембриогенеза с промените на общия редокс-потенциал на цитоплазмата, формиран с участието и на други редокс-системи и на първо място на цитоплазмените никотинамидни редокс-системи. Метаболомният анализ на някои осмопротектанти показва увеличение на аминокиселините пролин и цистеин в резултат на третиране с високи концентрации на соли. Друг много интересен резултат са намерените чрез електрофоретичен анализ количествени и качествени разлики в белтъчния състав на клетъчната стена в отговор на третирането с умерени и високи концентрации на NaCl. Установено е, че като цяло наборът от белтъци, изолирани от клетъчната стена на култури, третирани с високи концентрации на сол е редуциран. Променя се и наборът от белтъци при третиране с ниски концентрации. Някои белтъци, характерни за контролните култури изчезват, а се появяват нови белтъци. Особено внимание е отделено на белтъци, присъстващи в клетъчната стена на третираните с 0.085M NaCl култури (при които се наблюдава увеличено количество ембриоиди), но преминаващи в хранителната среда на третираните с 0.17 M NaCl култури (условия на силно инхибирана соматична ембриогенеза). Тези белтъци се предполага, че са асоциирани със процеса на соматична ембриогенеза и са негови потенциални

молекулни маркери. Доколкото част от тях – особено от тези с pI в киселата област – са били обект на предишни изследвания, докторантът се насочва към изследването на един белтък от алкалната област със молекулна маса 72 kD. Електрофоретичната характеристика на този белтък не дава задоволителни данни за наличие на подобни белтъци в базата данни за *Dactylis* и за други житни. Докторантът се насочва към пречистване на избрания белтък, необходима стъпка за масспектрометричен анализ и секвениране. За целта той генерира чрез фагов дисплей няколко клона, продуциращи едноверижни моноклонални антитела. Селекционира чрез няколко рунда клон получавайки антитяло, което използва освен за идентифициране на белтъка след електрофореза и за получаване чрез оригинален вариант на афинитетна хроматография на изследвания белтък в пречистен вид. Обработката на резултатите от масспектрометричния анализ и „мас-фингерпринт” анализ сугестира хомологията му със серин/треонинова протеин-киназа. Макар, че тези данни не са достатъчни за категоричното идентифициране на този белтък като протеин киназа, тъй като геномът на *Dactylis* не е секвениран, тълкуването на резултата, основано на няколко частично припокриващи се секвенции със сходен по електрофоретична характеристика белтък от базата данни е логично. Известно е, че много от серин/треониновите протеин кинази имат сходни каталитични домени и се различават главно по регулаторните си домени (респективно субединици) и биха дали подобни резултати при “мас” – фингерпринт. Модифицирането на съществуващи методи се е оказало плодотворно и при друг важен дял от изследванията на дисертанта. Използването на електрофореза в комбиниран полиакриламидно-агарозен гел е позволило получаването на важна информация за динамиката на високомолекулните арабиногалактанови белтъци, които са важен компонент на клетъчната стена. Използването на търговски препарати от белязани с флуоресцентно багрило моноклонални антитела е позволило получаването на интересна информация относно локализацията на избрани белтъци в клетъчната стена. Данните от изследванията на друга група функционални белтъци – експанзините, които модулират растежа и развитието на клетъчната стена като я реструктурират, също са оригинални. Използвани са няколко различни експериментални постановки за определяне активността на експанзините през различните фази на соматичната ембриогенеза, както и за чувствителността на клетъчната стена към действието им. Показано е, че експанзините от клетъчните стени на *Dactylis glomerata* L. проявяват различна активност при използване като субстрат на клетъчни стени от различни растителни видове, в зависимост от филогенетичната близост на съответния вид и от наличието на пектин и хемицелулози в състава на неговата клетъчна стена. От своя страна клетъчните стени на култури от *Dactylis glomerata* третиран с високи солеви концентрации (0.17 M NaCl) проявяват най-висока чувствителност към действието на екзогенно добавени експанзини.

Резултатите са много добре документирани, обработени са по начин, позволяващ извличане на цялата информация от тях, но описани по мое мнение, прекалено лаконично. Илюстративният материал е с високо качество. Където е възможно резултатите са обработени статистически, което гарантира тяхната достоверност. Финансирането на дисертационния труд чрез участие на докторанта в научни проекта е позволило реализирането на тези скъпо струващи експерименти в условията на тотална бедност на научно-преподавателските звена на Софийския университет.

Дискусията е задълбочена и грамотна. Собствените резултати се обсъждат в светлината на наличните данни в литературата. Обосновават се евентуалните причини за различията в собствените резултати с данните на други автори. В повечето от случаите данните в литературата са получени при изследването на други растителни обекти или въобще няма такива. Прави се успешен опит да се разтълкуват получените резултати. Макар, че в някои случаи, разсъжденията са доста спекулативни, поради липсата на допълнителни данни в литературата, те са творчески и ползотворни, защото чертаят пътя за бъдещи изследвания за потвърждаване или отхвърляне на изказаната хипотеза.

Приемам направените изводи и формулираните приноси на труда. Като най-съществени приноси на дисертационния труд бих открито следните:

Фундаментални приноси:

- За първи път при растения е установена връзка между общия окислително-редукционен потенциал на ниско молекулните тиоли и фазите на развитие на соматичните ембриони - през фазите на интензивно натрупване на растителна маса вътрешната среда на клетката е по-редуцираща, отколкото през фазата на формиране на зрели ембриони. Показано е значението на редокс-системата цистеин-цистин като регулатор на общия окислително-редукционен потенциал на ниско-молекулните тиоли.
- С помощта на получено от докторанта специфично едноверижно моноклонално антитяло е изолиран 72kD алкален белтък, асоцииран с клетъчната стена, потенциален молекулен маркер за реализиране на ембриогенния потенциал, който е идентифициран като вероятна серин/треонинова протеинкиназа.
- Намерено е, че активността на експанзините от суспензионни клетъчни култури на *Dactylis glomerata L.*, изследвана в хетероложна система – при субстрат клетъчни стени от различни растителни видове или аналози на клетъчна стена е в пряка зависимост от филогенетичното родство на съответния вид и от съдържанието на пектин и хемицелулози.
- Чувствителността на клетъчните стени на ембриогенни култури от *Dactylis glomerata L.* спрямо екзогенни експанзини се променя в отговор на солевия стрес и е най-висока при култури, третирани с инхибиращи соматичната ембриогенеза концентрации на NaCl.

Научно- приложни приноси:

- Разработен е бърз метод за получаване на пречистен антиген чрез афинитетна хроматография с имобилизирано върху нитроцелулозна мембрана антицяло.
- Разработен е модел за растителна стена, базиран на продуцирани от *Acetobacter xylinum* полизахаридни комплекси от целулоза, хемицелулоза и пектин, който е приложен за изследване активността на експанзини.

Авторефератът отразява адекватно съдържанието на дисертационния труд.

Въпроси и забележки:

- По какви съображения е използвано модифицирано уравнение на Нернст, което в крайна сметка дава същите стойности?
- Би следвало стандартните редокси-потенциали да се означават E'° , както е по конвенция, а не E° .
- Вместо за „по-положителен” редоксипотенциал при сравняване на редоксипотенциали с отрицателен знак по-добре би било да се говори за „по-висок”
- Никъде не е посочено колко дневни суспензионни култури са използвани при изследванията на белтъчните профили и индивидуалните белтъци..
- Дискусията за токохромоанолите трябва да се свързва по-скоро с данните в литературата за интензитета на 2-хидрокси-2-метил глутариловата метаболитна верига, отколкото с тази на синтезата на хлорофила въобще, защото фитолът от молекулата на хлорофила се синтезира в тази верига, отделно от синтезата на порфириновия пръстен.
- Пептидът Cys-Gly неправилно е посочен като междинен метаболит при биосинтезата на глутатиона. Той, както правилно е посочено в публикуваната съответна статия на докторанта, е междинен метаболит при разграждането на глутатиона.
- На места е използван лабораторен жаргон: „O/N” вместо „за една нощ”, „пробов буфер”, „стоков” буфер и др.
- Би били по-добре съображенията, по които е избран за изследване белтъка b21 да се опишат още в глава „Резултати”. Те са описани доста по-късно в „Дискусия”
- Макар, че броят на правописните и печатни грешки в труда е минимален, на доста места липсва пълен член

Заключение: Дисертационният труд съдържа оригинални резултати и отговаря на всички изисквания на Закона за присъждане на научни звания и степени и Правилника за приложението му. Той отразява едно завършено оригинално научно изследване, което трасира път за бъдещи изследвания. Съществената част от резултатите са публикувани вече в 4 научни статии, 2 от които са с импакт фактор. Във всички докторантът е първи автор, което

документира личния му принос в изследванията. Трудът съдържа и резултати, които все още не са публикувани. Много от резултатите са докладвани от докторанта на 8 научни форуми у нас и в чужбина. Цитиранията показват, че макар и излезли наскоро, работите получават вече признание от научната общност.

Научната стойност на труда и зрелостта, с която е написан характеризират докторанта като един изграден изследовател. Той познава детайлно разработвания проблем, владее и умело използва голям арсенал от биохимични и молекулярно-биологични техники и има значителен личен принос в изследванията. За цялостното му оформяне като научен работник несъмнено са допринесли и научният колектив и лабораторията, в които работи вече 8 години - първоначално като специалист, а понастоящем като асистент, както и командировките и сътрудничеството с чуждестранни лаборатории.

Като дългогодишен преподавател в Катедрата по биохимия, познавам добре докторанта отдавна. Той беше отличен студент, мотивиран е, отговорен, добре възпитан, добронамерен и успешно работи в колектив. Преподавателската му дейност също е дала отпечатък и е допринесла за цялостната му биохимична и молекулярно-биологична подготовка и оформянето му като изграден научен работник и преподавател.

Всичко това ми дава основание да препоръчам убедено на уважаемото Научно жури да гласува положително за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” на Любен Иванов Загорчев.

Рецензент:

(Тренка Аргирова Гетова)