

СТАНОВИЩЕ

От доц. д-р Людмила Петрова Симова-Стоилова от Институт по физиология на растенията и генетика – БАН

върху дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ професионално направление 4.3. Биологични науки , докторантска програма - Микробиология

Автор на дисертационния труд: докторант на самостоятелна подготовка Владислава Георгиева Дишлийска от Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН

Тема на дисертационния труд: КАТАЛАЗА ОТ АНТАРКТИЧЕСКИ ГЪБИ: РОЛЯ В АНТИОКСИДАНТНАТА ЗАЩИТА, РЕГУЛАЦИЯ И СВОЙСТВА

Научен ръководител: доц. д-р Екатерина Цанкова Крумова, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН

ОТНОСНО ПРОЦЕДУРАТА:

Докторант на самостоятелна подготовка Владислава Дишлийска е насочена към официална защита с Решение на Научния съвет на ИМикб-БАН (Протокол № 7/30.07.2024 г.). Съгласно Заповед на Директора на ИМикб-БАН (№ I-107/31.07.2024 г.) съм включена в състава на Научното жури по защитата като външен член, в съответствие с чл. 4 на ЗРСРБ, чл. 30 от Правилника за прилагането и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени в ИМикб-БАН.

ОЦЕНКА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

Актуалност и значимост на научната тематика. В последно време има повишен интерес към организмите, приспособени да живеят в екстремно студени местообитания - най-често бактерии, археи и гъби. Суровите условия в Антарктика включват, освен ниската температура, високо ниво на разтворен кислород, повищена UV радиация, недостатъчно хранителни вещества, силно променлив фотопериод, често редуващи се цикли на замразяване и размразяване, които водят до силен окислителен стрес, но малко се знае за адаптацията на организмите към такива условия на живот. Гъбите, изолирани от местообитания с екстремно ниски температури, произвеждат температурно чувствителни ензими, които имат висока конформационна гъвкавост, повишен оборот на каталитично действие и висока ефективност при ниски температури. Такъв ензим е каталазата, но за нейната роля в оцеляването на екстремофилите твърде малко се знае. Освен научния интерес, свързан със значението им за оцеляване на организмите в екстремални условия на средата, температуро-чувствителните ензими могат имат и потенциал за биотехнологично приложение в някои сектори на промишлеността като напр. за отстраняване на водородния пероксид от млякото след студената пастеризация, в текстилната и фармацевтичната промишленост и други. В това отношение, представената дисертационна работа е актуална и значима и от научно-фундаментална, и от практическа гледна точка.

Литературната осведоменост и теоретична подготвеност на кандидата. Литературният обзор е целенасочен и добре структуриран, като засяга следните аспекти: характеристика на Антарктика като екстремални климатични условия, адаптивни механизми на микроорганизмите към ниски температури и класификация по отношение адаптацията им (психрофили, психротолерантни и мезофилни), оксидативен стрес и връзка между студов и оксидативен стрес, водещата роля на антиоксидантните ензими като първа линия на защита и детайлна характеристика на каталазните ензими, особености на температуро-чувствителните ензими, филаментозните гъби като

експериментална моделна система – класификация и морфология на антарктическите гъби и промени след въздействие с екстремно ниски температури на морфологично и физиологично ниво. Обзорът е стегнат, конкретен и ясен, онагледен е със 7 фигури и, заедно с методите и дискусията на резултатите, е базиран на 305 литературни източника, като завършва с очертаване на ключови нерешени проблеми по темата, които логично водят до ясно формулирани цел и задачи на дисертацията. Прави добро впечатление отличната осведоменост и теоретична подготвеност на докторанта.

Целта на дисертационния труд е да се изследва участието на антиоксидантния ензим каталаза в механизмите на адаптация към нискотемпературен стрес при филаментозни гъби, изолирани от екстремно студени местаобитания (Антарктика).

Задачите следват логическа схема, включваща първоначална характеристика на голям брой щамове антарктически почвени филаментозни гъби по отношение растеж и натрупване на биомаса при различни температури, вътреклетъчна и извънклетъчна каталазна активности. На базата на тази информация са подбрани моделни щамове от за следващите задачи – роля на каталазата при нискотемпературен стрес, изолиране, секвениране и експресия на каталазни гени, пречистване и характеризиране на температуро-чувствителна каталаза от един избран щам - продуцент.

Анализ на методичните подходи за постигане целта на дисертационния труд. Приложените методи са добре подбрани и подходящи за решаване на поставените експериментални задачи. Съчетани са класически микробиологични, биохимични и молекулярно-генетични методи, които са описани кратко, но ясно и с необходимите детайли. Промените в клетъчната морфология са проследени посредством светлинна и електронна микроскопия. Приложени са биохимични методи за определяне на ензимни активности, количество белтък и съдържание на оксидативно увредени белтъци, концентрации на глюкоза, гликоген и трехалоза, липидна пероксидация, ниво на генерираните свободни окси-радикали. Молекулярно-биологични методи са използвани за изолиране и секвениране на гените, кодиращи каталази, и генната им експресия в норма и стрес чрез Real-Time PCR. Посредством ултрафилтрация, колонна хроматография с Q-сефароза, последвана от хидрофобна хроматография на фенил-сефароза, е изолиран, пречистен и охарактеризиран температуро-чувствителен каталазен ензим от *P. Griseofulvum*. Направена е коректна статистическа обработка на експерименталните резултати. Богатият набор от класически и съвременни методи, усвоен от дисертантката по време на докторантурата, ще намери приложение и в нейните бъдещите научни изследвания.

Оценка на постигнатите резултати и приноси на дисертационния труд. Всички поставени задачи са последователно и успешно решени.

Първоначално е направен широк скрининг за оптimalна температура на растеж, натрупване на биомаса и продукция на извънклетъчна и вътреклетъчна каталазна активности (61 щама антарктически филаментозни гъби от микологичната колекция на Института по Микробиология). Щамовете са отнесени към съответните температурни класове (психрофили, психротолерантни и мезофили). От общия брой тествани щамове са избрани 19 с по-висока каталазна активност, които са изследвани в условия на дълбочинно култивиране при различни температури. Установено е, че температурният оптимум за каталазната активност съвпада с оптималната температура на растежа на повечето щамове. Добра синтеза на извънклетъчна каталаза имат 8 щама. От тях са подбрани 2 моделни щама със стабилна каталазна активност при различни условия на отглеждане – психротолерантен (*P. griseofulvum* P29) и мезофил (*P. chrysogenum* P27). Тази рутинна работа е важна и необходима за всички следващи задачи.

Изследването на промените в растежа, развитието и споролирането на филаментозни гъби в резултат на въздействие с ниски температури е направено за два моделни щама –

един психротолерантен и един мезофилен. Установено е, че генерирането на активни кислородни форми, както и окислителното увреждане на белтъци и липиди при нискотемпературен стрес е по-изразено при мезофилния щам и е силно повишено в митохондриалната фракция. При мезофилния щам има и по-високо базално ниво на двета резервни въглехидратна трешалоза и гликоген в сравнение с психротолерантния, а в условията на стрес има допълнително натрупване на гликоген и трешалоза във връзка с тяхното защитно действие към липиди и белтъци. При стрес се наблюдава силно повишаване на супероксид дисмутазната активност за мезофилния щам, докато при психротолерантния има по-голямо повишение на каталазната активност.

На база тези резултати щам *Penicillium griseofulvum* P29 е определен като по-добър и перспективен продукт на ензима каталаза и с него са анализирани морфологичните и ултраструктурни изменения в условия на студов стрес. Установява се, че основните увреждания в ултраструктурата на клетките се отнасят до митохондриите и клетъчната стена, има и съществено разширяване на ейзозомите, което е индикация за нарушен процеси на експорт и/или импорт на макромолекули, или нарушения в процесите на обновяване на клетъчната мембрана. Ултраструктурните изменения съответстват на биохимичните находки, касаещи митохондриите. Потвърждава се развитието на окислителен стрес в условия на нискотемпературен стрес, както и ключовата роля на антиоксидантните ензими и по-конкретно на каталазата.

В задачата по идентифициране на гените, кодиращи белтък с каталазна активност, първоначално са проучени генните секвенции за каталази, налични в достъпните бази данни. В публикуваната пълна секвенция на вида *P. griseofulvum*, отбелязана (GenBank GCA_001561935.1) се установяват 5 каталазни гена. Посредством специфични праймери е доказано наличието на тези гени и в щам *P. griseofulvum* P29 и са секвенирани съответните гени – cat 1 кодира бифункционален каталазно-пероксидазен ензим с очаквано молек.тегло 82 kDa, cat 2 – cat 5 кодират монофункционални хем съдържащи ензими с очаквани молек.тегла съответно 80, 55, 52, 52 kDa. Отделните каталазни ензими са с различна структура, локализация и функции. Изследвана е експресията на каталазните гени в *P. griseofulvum* P29 в норма и при нискотемпературен стрес. Установено е, че 4 от 5-те каталазни гена имат статистически значима повишена експресия при 10°C, като най-голямата разлика се наблюдава в гена cat1. Получените пълни секвенции са депозирани в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

За да бъде охарактеризиран каталазният ензим с най-съществена роля при нискотемпературен стрес у *P. griseofulvum*, необходими следващи стъпки са оптимизирането на условията за неговата продукция, изолирането и пречистването му. Добивът от ензима е увеличен чрез оптимизиране на концентрацията на глюкоза в средата, на количеството инокулум, на температурата и на количеството разтворен кислород. Контролирането на количеството разтворен кислород във ферментационната среда е неописан досега подход за подобряване на биотехнологичната продукция на каталаза от filamentozни гъби. Разработен е подход за пречистване на секретирана каталаза, включващ концентриране на безклетъчен екстракт и последователно прилагане на йонообменна и хидрофобна хроматографски техники. По данни от SDS-PAGE пречиственият ензим има молекулна маса 45.5 kDa на субединица и около 182 kDa за холоензима. Ензимът е активен в широк температурен диапазон 5 - 70°C, с оптимум за активност 20°C и с pH оптимум между 4.0 и 6.0.

Резултатите са онагледени с 12 таблици и 23 фигури. Най-съществената част от тях е включена в две публикации с импакт фактор и е докладвана на два научни форума. Авторефератът напълно съответства на изложеното в дисертацията.

Изводите са коректно формулирани, а приносите отразяват най-съществените резултати по дисертацията, а именно:

1. Нови доказателства за участието на ензима каталаза в адаптацията към нискотемпературен стрес на филаментозни гъби, изолирани от Антарктика.
2. Нови данни за разпространението на вътреклетъчна и извънклетъчна каталаза при антарктически гъби от различни термални класове.
3. Разработен е ефективен метод за пречистване на температурно-чувствителна каталаза от *P. griseofulvum*, ензим с температурен оптимум 20оС и pH оптимум 6.0.
4. Установени са 5 гена, кодиращи каталази в *Penicillium griseofulvum* P29, и са депозирани в база данни техните пълни нуклеотидни секвенции.

Въпроси и препоръки. Имам няколко въпроса към докторантката

1. Около 90% от каталазната активност е вътреклетъчна - в цитоплазмата и пероксизомите, и много рядко такава активност се установява извънклетъчно – каква е нейната функция? За активна секреция ли става въпрос? Има ли някаква връзка между извънклетъчна и вътреклетъчна каталазна активности?
2. Не става ясно пречищеният ензим продукт на кой от петте установени каталазни гена на *P. Griseofulvum* се явява. Правени ли са някакви допълнителни изследвания да се установи точната аминокиселинна последователност?
3. Става ясно, че термо-чувствителната каталаза има голям потенциал за практическо приложение в текстилната, хранително-вкусовата, фармацевтичната промишленост – какви са следващите стъпки в тази насока?

Препоръка: CV-то е много бедно откъм информация и дава слаба представа за човека. Владислава Дишлийска е завършила магистратура по биотехнология в СУ „св. Кл. Охридски“, постъпила в ИМикБ 2005 г., асистент от 2007 г. – само това. Няма информация в професионалната биография за публикации, цитати, участие в проекти, а такива има. Справка Scopus - с автор Владислава Дишлийска има 14 статии в периода 2021-2024 г., съответно 2021 – 5, 2022 – 1, 2023 – 3, 2024 – 5, цитати общо 27, h index 4 – една доста добра научна активност. Статиите по каталаза са 4 – по една за 2021, 2022, 2023 и 2024 г., като две от тях са за *Penicillium griseofulvum* и са по темата на дисертацията. Останалите 10 публикации са по други теми и по проекти, разработвани в групата, което говори за активно участие и принос в общата работа, за добро коопериране и продуктивна работа в екип. Това са качества, които би трябвало да намерят отражение в професионалната биография на докторантката. Препоръката ми е в бъдеще да се обърне внимание на CV-то, което е като визитна картичка за учения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на гореизложеното считам, че представеният дисертационен труд е оригинална научна разработка с теоретично и приложно значение, отговаряща на всички условия на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника на Институт по Микробиология - БАН. Това ми дава основание за цялостна висока оценка на дисертационния труд, въз основа на която убедено предлагам на уважаваното научно жури да присъди на Владислава Георгиева Дишлийска образователната и научна степен „ДОКТОР“ по професионално направление 4. Природни науки, Научна специалност 4.3. **Биологични науки**, докторантска програма **Микробиология**.

Дата: 10.09.2024 г.

**На основание
чл. 2 от ЗЗЛД**

(доц. д-р Л. Симова-Стоилова)