

РЕЦЕНЗИЯ

от член кор. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн
на дисертационния труд на Иван Добрев Димитров *“Генна секвенция на хемоцианин от *Helix lucorum*”*, представен за присъждане на образователната и научна степен **“Доктор”** по научната специалност *„Биоорганична химия, химия на физиологично-активни вещества”* (шифър 01.05.10)

Ще започна рецензията си с отличните впечатления които остави у мен четения дисертационен труд. Освен че е оформен много добре, той изобилства с отлично представена и интерпретирана фактология – нещо, което не се среща особено често в защитаваните днес докторски дисертации. Трябва да отбележа и друго – дисертацията на Иван Димитров не би била толкова богата на експериментални данни без активното научно сътрудничество поддържано от неговия научен ръководител - доц. Павлина Долашка, което пък е добър пример за модерен стил при провеждане на съвременни научни изследвания.

Дисертацията на Иван Димитров обхваща 106 стр. и включва 137 литературни източници, по-голямата част от които са публикувани след 2000 г. Тя е илюстрирана с 36 цветни фигури и 3 таблици и е структурирана по традиционната схема – Литературен обзор, Материали и методи и Резултати и дискусия.

Литературният обзор обхваща 40 стр. и включва 3 подраздели, посветени съответно на структурата на кислород-пренасящите белтъци (хемоцианини) у членестоноги и мекотели, както и на определянето на първичната им структура чрез ДНК секвенционен анализ. Обзорът се основава на последни литературни данни и е богато илюстриран с цветни фигури, което значително улеснява разбирането на сложната материя. Литературният обзор разкрива големите структурни различия между хемоцианините на двата големи класа безгръбначни – членестоноги и мекотели, въпреки тяхната еднаква (кислород-пренасяща) функция. От този раздел става ясно и това, че познанията ни за структурата на хемоцианините са еволюирали паралелно с методите за тяхното изследване. До известна степен това важи за всички биополимери, но поради гигантските размери и специфична структура на хемоцианините, литературата свързана с тях остарява най-бързо. Това се отнася особено за литературата отнасяща се до първичната структура. Директно белтъчно секвениране тук е трудно приложимо, поради което в по-ново време първичната структура на хемоцианините се определя чрез РНК/ДНК базирано секвениране. На него е посветен и последния раздел от литературния обзор, от който пък са изведени Целите и задачите на дисертацията.

Целта е формулирана лаконично: *Да се изолира хемоцианин от градинския охлюв *Helix lucorum* и да се определи структурата и антивирусния му ефект спрямо различни видове вируси.* Заедно с нея са формулирани и 7 задачи, от които само една се отнася до определянето на генната секвенция на хемоцианините. Тук трябва да отбележа очевидното

несъответствие между заглавието (“Генна секвенция на хемоцианин от *Helix lucorum*”) и съдържанието на дисертацията. Дисертационният труд на Иван Димитров е значително по-богат на фактологичен материал, отколкото следва да се очаква от заглавието.

Разделът **Материали и методи** обхваща 10 страници. Използваните разнообразни методи могат да се подразделят на: а) методи за изолиране и пречистване на белтъци (екстракционни, хроматографски и електрофоретични); б) методи за анализ на белтъци (секвенционни, спектрални и др.); в) методи за изолиране, пречистване и анализ на нуклеинови киселини (екстракционни, амплификационни и секвенционни); г) биоинформатични методи (multiple alignment, similarity search, компютърно моделиране на белтъчни структури); д) клетъчно-биологични и вирусологични методи. Подробното описание на методите позволява експериментите да бъдат възпроизведени при необходимост, без за това да е необходима допълнителна методична литература.

Разделът **Резултати и дискусия** е съставен от 7 подраздели, от които първите 3 описват изолирането и охарактеризирането на хемоцианин от *Helix lucorum*, а четвъртият (III.4) е посветен на изолиране и секвениране на гените на хемоцианина. Следващите два подраздели са биоинформатични. От тях първият (III.5) представя резултатите от компютърното моделиране на β -субединицата на хемоцианина, а вторият (III.6) – филогенетичното изследване на известните хемоцианини и определяне мястото на новия хемоцианин от *Helix lucorum* в общото еволюционно дърво. Последният (III.7) подраздел е посветен на изследването на антивирусната активност на хемоцианина от *Helix lucorum*.

Прилагайки класически, но добре адаптирани към обекта процедури за екстракция и утаяване на белтъци, докторантът успява да получи препаративни количества от хемоцианин на *Helix lucorum* и установява, че той е представен в 3 изоформи - две α и една β . Втората е получена в кристално състояние след продължителна диализа срещу ацетатен буфер, рН 5.8, а двете α -изоформи (αD и αN) са пречистени чрез анионообменна хроматография. Установено е, че αD и β -изоформите са кисели протеини с рI съответно 4.3 и 5.2, а αN е неутрален белтък с рI = 7.0. Трите изоформи имат различно поведение при дисоциация и реасоциация в присъствие на Ca^{++} . Докато β -формата реасоциира в дълги тубули представляващи дидекамери на основната субединица, αD -формата образува къси тубули. Докторантът установява също, че β -формата е съставена от 8 функционални единици с молекулна маса около 50 kDa, чиито N-краища са най-близки по структура до тези на американския охлюв *Aplisia californica*. Неговите изследвания показват, че изолираният хемоцианин е гликопротеин, но точните места за гликозилиране той определя по-късно, след изясняване на пълната аминокиселинна последователност въз основа на данните от ДНК-секвенционния анализ.

Най-съществения принос на дисертацията е свързан със секвенирането на гените на хемоцианина от *Helix lucorum*. За целта е изолирана тотална РНК от крак на градински охлюв, която е използвана като матрица за получаване на кДНК чрез PCR амплификация.

Поради това, че генната секвенция на хемоцианина от *Helix lucorum* е неизвестна, при дизайна на правите (5'-крайни) праймери Димитров е използвал данните от частичния секвенционен анализ на N-крайните домени на трите изоформи проведен чрез едмандово разграждане. С помощта на така конструирани праймери, кодиращите части на гените на трите протеина β , αD и αN са амплифицирани и секвенирани. Тъй като познавам добре естеството на подобен тип изследвания, си позволявам да кажа, че тук докторантът е извършил огромна по обем работа, която е завършила успешно и е довела до получаването на важни оригинални резултати. Той успява да определи пълната (на 100%) нуклеотидна последователност от кДНК на β и αD полипептидите и 88% от секвенцията на N-изоформата на изследвания хемоцианин. Дължините на първите две секвенции са съответно 10 929 и 10 474 нуклеотида и те кодират белтъци с дължина на полипептидната верига 3412 ак за β , и 3374 ак за αD протеините. Предполагаемата дължина на N-изоформата е 3031 ак. Дължината на 8-те субединици изграждащи трите протеина варират от 409 до 424 ак за β , 410-427 ак за αD и 410-422 ак за αN изоформите.

Данните от секвенционния анализ са използвани по-нататък за биоинформатични изследвания целящи да изяснят висшите нива на организация, функция и филогенеза на изследваните молекули. Търсейки характерни функционални участъци в първичната структура на протеините, докторантът открива 13 центрове за N-гликозилиране в β -изоформата, 14 в αD и 7 в αN протеина, и идентифицира кислород-свързващите им домени. Използвайки кристалографски данни за хемоцианини от други молюски и собствени данни, той създава и пространствен модел на β -изоформата, върху който картира главните функционални области на белтъка.

Интересни са и данните от филогенетичния анализ. Те показват, че хомологията между осемте функционални единици на хемоцианина от един и същ вид е по-голяма от тази на една функционална единица сравнена със себеподобните от различни животински видове, както и това, че по първична структура хемоцианинът от *Helix lucorum* е най-близък до този на американския охлюв *Aplisia californica*.

Непряко свързани с описаните структурни проучвания са изследванията представени в последната глава на Резултати и дискусия (III.7 „Антивирусен ефект на хемоцианин от *Helix lucorum*”). По мое мнение, дисертацията не би загубила с нищо ако този раздел липсваше. Тук докторантът показва, че изследваният нативен хемоцианин, както и неговата изоформа β , имат слаб антивирусен ефект срещу *Herpes simplex* вирус Тип 1.

Резултатите от изследванията по дисертацията са отразени в **5 статии**, от които **3** са публикувани през периода 2009-2010 г. в рефериращи се списания с ИФ, **една** - в *Списанието на БАН* и **една** е представена за печат. Общият **ИФ** на публикуваните статии е **4.2**. Резултатите са докладвани и на **11** национални и международни научни форуми през периода 2006-2010 г.

Към дисертационния труд нямам забележки по същество.

Запознат съм с проекта за автореферат и намирам, че той отразява адекватно съдържанието и приносите на дисертацията.

Заключение: Със своята дисертация Иван Добрев Димитров се представя като отлично подготвен специалист в областта на биоорганичната химия, който може да провежда комплексни изследвания в граничните научни области *химия, молекулярна биология и биохимия*, и да интерпретира сложни научни резултати. Имайки предвид всичко това, както и значителните му научни приноси в изследването на хемоцианините, си позволявам **убедено да препоръчам** на уважаемото Научно жури да му присъди образователната и научна степен “**Доктор**”.

01.08.2011 г.
София

Рецензент:

/Член кор. Проф. Иван Г. Иванов/