

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р, инж. Павлинка Александрова Долашка, дхн

на дисертационния труд на Юлиана Маринова Райнова, на тема: “Структура и биологична активност на кислород-пренасящи протеини от безгръбначни”, представен за присъждане на образователната и научна степен “Доктор” по научната специалност „Биоорганична химия, химия на физиологично-активни вещества” (шифър 01.05.10)

Научен ръководител: доц. д-р Красимира Идакиева

Дисертацията на Юлиана Маринова Райнова представя изследвания върху хемоцианини от Средиземноморски рак *Cancer pagurus* и от градински охлюв *Helix aspersa*, които са представители на двата вида Артроди и Молюски. Интересът към тези протеини е свързан не само със сложната им структура и свойства, но и доказаното им приложение в медицината.

Представеният материал обхваща 118 стр. и включва 169 литературни източници, по-голямата част от които са публикувани след 2000 г. Изследванията са илюстрирана с 47 цветни фигури и 5 таблици и са структурирани по традиционната схема – Литературен обзор, Материали и методи, и Резултати и дискусия.

Литературният обзор обхваща 16 стр. и включва 5 подраздела, представящи структурата и свойствата на тип-3-мед-съдържащи протеини, като кислород-пренасящите хемоцианини, изолирани от Артроди и Молюски, както и ензимите фенолоксидази. Обзорът се основава на последните литературни данни и е богато илюстриран с цветни фигури, което значително улеснява разбирането на сложната материя. Показани са съществените структурни различия между хемоцианините на двата големи класа безгръбначни, въпреки тяхната еднаква функция. Подробно и ясно е показана сложната четвъртична и третична структура на огромните молекули на хемоцианините и методите, чрез които са анализирани. Също така е описано и различието между хемоцианини и фенолоксидази, които

въпреки, че включват медни йони в активния център, изпълняват различна функция. Отделено е внимание и на активните центрове, които са свързани с функцията на тези протеините, като е описано и другото свойство на хемоцианините, а именно фенолоксидазна активност. На този процес е посветен и последния раздел от литературния обзор, като е обяснено активирането на хемоцианините и проявената фенолоксидазна активност *in vivo* и *in vitro*.

Въз основа на задълбочения литературен обзор, много добре е формулирана целта на докторантската работа, а именно да бъдат получени нови данни за структурата, конформационна стабилност при повишена температура и биологична (ензимна) активност на кислород-пренасящи протеини от двата вида Артроди и Молюски. За постигане на тази цел са формулирани 7 конкретни задачи.

Критични бележки към литературния обзор:

1. В литературния обзор липсва справка за проведените изследвания върху конформационната стабилност на хемоцианините, за което е поставена отделна задача за изпълнение.
2. На *стр. 25* е написано, че „Хемоцианинът от *Helix aspersa maxima* не е изучен и единственото научно съобщение относно идентифициране на три вида хемоцианинови изоформи е публикацията на Gielens, 1987).“

Много задълбочено са изучени трите вида изоформи на хемоцианин от *Helix lucorum*, който е от същия клас, като е защитен дисертационен труд в ИОХЦФ-БАН. Докато за хемоцианина от *H. aspersa* са изучени проявените антитуморен и антибактериален ефект.

Разделът **Материали и методи** обхваща 13 страници, като подробно са описани методите и проведените експерименти. Те могат да се разделят на: а) Методи за изолиране и пречистване на белтъци (екстракционни, хроматографски и електрофоретични); б) Спектрални методи за анализ на белтъци (абсорбционна спектроскопия, флуоресцентна и инфрачервена спектроскопия, кръгов дихроизъм и диференциална сканираща калориметрия; в) Анализ на фенолоксидазна активност на хемоцианини.

В съдържанието Материали и методи липсва точка 2.5

Разделът Резултати и дискусия е разделен на 7 подраздели, от които първите 5 описват изолирането и характеризирането на хемоцианин от артродния организъм - Средиземноморски рак *Cancer pagurus*.

В Раздел III.6 и в три подраздела са представени резултатите от изолиране и характеризиране на хемоцианин от Молюски, от градински охлюв *Helix aspersa*.

Докторантката е приложила различни методи и техники за проследяване на промените във вторичната и третична структура на двата хемоцианина, което допълва информацията за конформационната стабилност на тези протеини.

Последният (III.7) раздел е посветен на възможностите за приложение на NaN , като е доказан потенциалът за използването му като биосензор за количествено определяне на катехол във водна среда.

Критични бележки към резултатите и дискусията

1. Проведен е само частичен анализ на структурата на CrH и NaN , защото не са идентифицирани отделните субединици чрез N-крайните им аминокиселинни последователности.

2. Легендите на много фигури са непълни и неясни, като:

А) Фиг.15. „Нативна електрофореза в 7.5% PAGE. 1-хемолимфа от *Cancer pagurus*; 2- хемоцианин“. Кой е вторият хемоцианин? Също така резултатите на фигурата показват, че в хемолимфата има по-малко на брой протеини в сравнение с линия 2 – на хемоцианина. Известно е, че в хемолимфата се съдържа хемоцианин и други протеини, а на фигурата е показано точно обратното.

Б) Фиг. 16. А. „SDS-електрофореза на 7,5% PAGE“. Правилно е да се каже SDS - PAGE. Също така е написано „пътека 2, пречистен CrH “, но от фигурата се вижда, че масата на пробата е около 75 μg , което не съответства на масата на хемоцианин CrH , а на някоя от субединиците.

В) Фиг. 23А отразява о-дифенолоксидазната активност на CrH към субстрат L-Dopa (3.0 mM) с повишаване на температурата, но не е посочен температурният интервал на изследване.

Г) Фиг. 25А. „Промени в инфрачервения спектър на СрН в зависимост от температурата. Инфрачервените спектри (деконволюирани) записани в областта 25-95°C. СрН е разтворен в 50 mM Tris–HCl (pH 8.2) буфер».

Трябва да се напише „Промени в температурен интервал от 25-95°C на инфрачервените спектри на СрН, разтворен в 50 mM Tris/HCl буфер, с pH 8.2.

Д) Написано е: „Температурна на зависимост на β -листовата структура на СрН и LpН. Интензитет на ивицата при $\sim 1618\text{ cm}^{-1}$ в зависимост от температура за СрН (●) и LpН (○)».

По-правилно е да се напише „Температурна зависимост на промяната на β -лист структурите на СрН и LpН, изразена чрез промяна на интензитета на инфрачервените спектрите при 1618 cm^{-1} .

3. Допуснати са някои грешки и неточности в текста, като:

А) На *стр. 45* е написано „III.3. Изследване на монофенолоксидазна и о-дифенолоксидазна активност на хемоцианините от артоподни организми», а се изследва само един хемоцианин от *Cancer pagurus*.

Б) В два раздела III.4. и в III.3.5. също не са конкретизирани за кои хемоцианини се отнасят тези изследвания. Написано е само „Изследване на термичната стабилност на хемоцианините» и «Активиране на фенолоксидазна активност чрез повишаване на температурата».

4. Някои от резултатите и интерпретирането им трябва да се променят, като:

А) На *стр. 62* е написано: «... че LpН притежава по-висока термична стабилност ($T_m \sim 92^\circ\text{C}$), отколкото СрН ($T_m \sim 80^\circ\text{C}$)». Това е доста висока стойност за стабилност на протеини. Щом средната температура на денатуриране е 92°C , при каква температура се достига пълно денатуриране на протеина? Също така е написано неправилно „тъй като е стабилизирана от голям брой **хидрофилни** и полярни връзки“.

Б) На *стр. 67* е представена структурата на HaН, анализирана чрез електронен микроскоп, но не е посочен буферът и pH, в който е разтворен протеина. Известно е, че и малката промяна на тези параметри води до съществени промени в

четвъртичната структура на протеина и ТЕМ-снимките (Фиг.30) ще изглеждат съвсем различни.

В) Резултатите от нативната електрофореза на Фиг. 32. А показват, че масите на трите структурни субединице съществено се различават, което не е вярно, (пътека 2 – α D+N-HaH; пътека 3 – β -HaH); и че масата на нативен HaH – (пътека 4) съответства на масите на α D+N HaH, което също не е възможно.

Г) Резултатът във Фиг. 33 показва, че след активиране на нативната молекула на HaH има отместване на максимума, но ако е запазена точно концентрацията на протеина, то трябва да се повишава и интензитетът на флуоресцентния спектър на ензимно активираната форма, в резултат на излагане на „погребаните“ триптофани, както е написано на стр. 78-79.

Д) Неправилно е интерпретиран резултатът от Фиг. 39, че промените във вторичната структура показват «преместването на минимума при 208 nm към по-ниските дължини на спектъра». На фиг. 39 ясно се вижда не отместване на максимума, а промяна в интензитета на спектрите, а минимумът се запазва при 208 nm.

Е) Докторантката правилно е констатирала, че по-висока ензимната активност на HaH след активиране със субтилизин DY, в сравнение с други хемоцианини може да се дължи на различните условия, при които са проведени анализите. За да може, обаче да се направи правилен извод, трябва едновременно да се изследват поне трите хемоцианина HaH, HpH и *R. thomasi* при едни и същи условия.

Обобщение:

1. Въпреки, че двата хемоцианини от *C. pagurus* и *H. aspersa maxima* са познати обекти, то след проведените задълбочен проучвания, ръководителят доц. Красимира Идакиева и докторантката Юлиана Райнова са намерили много точно областите за допълнителни изследвания.

2. Чрез редица добре адаптирани методи и техники са получени препаративни количества от двата хемоцианини и е представен задълбочен анализ за структурната им организация, конформационната стабилност, както и за ензимната им активност, и субстратна специфичност.

3. Показано е, че хемоцианинът от *H. aspersa maxima* може да се използва не само в медицината, но и като биосензор за количествен анализ на дифенол.

4. Резултатите от проведените изследвания по дисертацията са публикувани през периода 2012-2014 г. в **4 статии**, в списания с общия **ИФ = 3,503**. Резултатите са докладвани на **10** национални и международни научни форуми през периода 2011-2014 г.

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

6. Докторантката е извършила изключително голяма по обем работа и считам, че поставената цел и задачи са изпълнени успешно.

Заключение: Дисертационният труд на Юлиана Маринова Райнова отразява най-важните резултати от експерименталната ѝ работа. Докторантката се представя като отлично подготвен специалист и е овладяла редица методи и техники. Тя притежава квалификация да провежда комплексни изследвания в научни области *биохимия и биофизика*, и да интерпретира сложни научни резултати. Ето защо, аз си позволявам **убедено да препоръчам** на уважаемото Научно жури да ѝ присъди образователната и научна степен “**Доктор**”.

05.01.2015 г.

София

Рецензент:

/проф. д-р, инж. Павлина Долашка/