

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на Юлиана Маринова Райнова, докторант в лаборатория „Химия и биофизика на белтъци и ензими” към Института по органична химия с Център по фитохимия на БАН.

Рецензент: проф. дхн Николай Христов Генов

### 1. Обща характеристика на дисертационния труд – обем и структура.

Дисертационният труд е в областта на биоорганичната химия, химията на природните и физиологично активните вещества. По-конкретно, той третира въпроси свързани със структурата и функцията на дихателни протеини разтворени в хемолимфата на безгръбначни – хемоцианини. Написан е на 118 страници и съдържа 47 фигури. Дисертацията е подходящо структурирана така, че дава възможност за детайлно запознаване с проблема, проведените изследвания и получените резултати. Целта и задачите на труда са ясно формулирани. Те целят решаването на някои страни от общия проблем: структурно и функционално охарактеризиране на два слабо проучени до започването на докторантурата хемоцианини от артроподен, *Cancer pagurus* и гастроподен, *Helix aspersa* *maxima* организми. Онагледяването с фигури е подходящо и изчерпателно. Трудът представя в достатъчен обем най-важните резултати от експерименталната работа на докторантката. Написан е стегнато, без излишни отклонения. Изследванията върху структурната организация и свойствата на хемоцианини са актуални защото тези протеини обратимо свързват, съхраняват и транспортират кислород до тъканите на артроподи и молюски, т. е. участват в жизнено важния процес дишане. Наред с това те намериха приложение в медицината за приготвяне на ваксини, като имуномодулатори и при терапията на рак на пикочния мехур. Всичко това определя актуалността на разработвания проблем. Охарактеризирането на хемоцианина от *Helix aspersa* *maxima*, намирането на условия при които той проявява фенолоксидазна активност и разработеният на тази база модел на биосензор за количествено определяне на феноли във водни разтвори е значително достойнство на дисертацията защото този протеин може да бъде получаван в големи количества за биотехнологични и медицински цели след отглеждане на охлювите в специализирани ферми.

## **2. Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата.**

Литературният обзор включва 168 източника като материала е творчески оценен от докторантката. Вижда се, че тя познава добре проблема и публикуваната литература в областта в която работи. От големия брой публикувани статии върху структурата и функцията на хемоцианините са подбрани най-важните и свързани с непосредствените цели и задачи на дисертацията. Теоретичната подготовка на г-ца Райнова може да бъде оценена като много добра.

## **3. Методичен подход.**

Методиката на изследванията е подходящо подбрана и може да даде отговор на поставените задачи. Използвани са съвременни методи за пречистване и охарактеризиране на протеини като молекулно-ситова и йонообменна хроматография, електрофореза в гел, абсорбционна и флуоресцентна спектроскопия, кръгов дихроизъм и диференциална сканираща калориметрия както и кинетичен анализ на ензимно катализирани реакции. Експериментите са проведени прецизно което добре е илюстрирано с подходящи фигури. Усвояването на тези методи ще бъде от голяма полза за докторантката в бъдещата и научна работа.

## **4. Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретациите и изводите.**

Резултатите са съществен принос към разбирането на структурно-функционални зависимости при голяма група протеини изпълняващи важна биологична функция при артроподни и моллюсков организми като свързват обратимо кислород и го транспортират от обкръжението в което се намира организъмът до тъканите. Наред с това, хемоцианините могат да осъществяват и каталитична функция като окисляват феноли. Тази реакция обикновено се изпълнява от природни фенолоксидази и инициира биосинтезата на меланин който участва в имунния отговор на безгръбначни организми, при склеротизирането на артроподи и в оцветяването на организми. Всичко това определя значимостта на получените резултати. Предложеният модел на биосензор за количествено определяне на феноли във водни разтвори има биотехнологично значение. Резултатите са формулирани на базата на убедителен експериментален материал и са правилно интерпретирани. Изводите са адекватни на получените резултати.

## **5. Критични бележки към дисертационния труд.**

- На стр. 7 е казано, че „за разлика от хемоцианините фенолоксидазите окисляват фенолни субстрати”. Известно е, че хемоцианините също могат да окисляват феноли. По-правилно е да се отбележи, че основните природни функции на двете групи протеини са различни, като дихателните биополимери свързват обратимо и пренасят кислород докато фенолоксидазите катализират окислението на фенолни субстрати. При определени условия, обаче хемоцианините проявяват фенолоксидазна активност.

- На фиг. 15 можеше да бъде показана електрофореза на пречистен хемоцианин от *Cancer ragurus* или да бъде дадено обяснение за отделните ивици.

- Стр. 62: Казано е, че структурата на LpH е стабилизирана от голям брой хидрофилни и полярни връзки? Може би от „хидрофобни и полярни” връзки? Голямата стабилност на този хемоцианин най-вероятно е свързана с високата степен на олигомеризация. LpH е най-комплексната структура от известните артроподни хемоцианини, изградена от 48 субединици (8 хексамера).

- Стр. 88: В какъв температурен интервал е изследвана о-дифенолоксидазната активност на NaH при различни температури? Двукратното нарастване на тази активност при повишаване на температурата до 40 °C в сравнение с активността при колко °C е било наблюдавано? Нарастването е обяснено с конформационни промени. Трябвало е по-обстойно да се опише този експеримент.

- Заглавието на фиг. 16.A е неправилно формулирано: „SDS-електрофореза на PAGE”. Правилно е да се каже „SDS-електрофореза в полиакриламиден гел на ...”.

- Стр. 45, ред 2 отгоре: „Артроподни” а не „артоподни” организми.

## **6. Характер на научните приноси.**

- Получени са нови данни за структурата и функцията на хемоцианини, протеини изпълняващи важна физиологична функция – пренос и съхранение на кислород в безгръбначни организми.

- Представени са оригинални резултати за структурната организация, конформационната стабилност, субстратната специфичност и фенолоксидазната активност на два слабо проучени до момента на започване на дисертационния труд дихателни протеина от артропода *Cancer pagurus* и гастропода *Helix aspersa maxima*.

- Предложена е хипотеза за наличието на корелация между структурна и термична стабилност при артроподни хемоцианини и между конформационната стабилност на техните активни центрове и проявяваната ензимна активност.

- Описани са методи за съществено увеличение на фенолоксидазната активност на изследваните хемоцианини чрез ограничена протеолиза, третиране с детергент и повишаване на температурата.

- Предложено е решение на проблема за количествено определяне съдържанието на феноли във водна среда чрез създаването на модел на биосензор на базата на хемоцианин от *Helix aspersa maxima*.

- Приемам справката за научните приноси. Авторефератът правилно отразява основните положения в дисертационния труд.

## **7. Оценка на качеството на научните трудове, отразявящи изследванията по дисертацията.**

Резултатите от изследванията по дисертацията са описани в 4 научни статии публикувани в списания с импакт фактор. 2 от статиите са в реномирани международни списания, *Comp. Biochem. Physiol. B* и *Protein J*. И двете списания публикуват статии на високо научно ниво в областта на биоорганичната химия. Една статия е публикувана в *Compt. Rend. Acad.* и друга в *Bulg. Chem. Commun.* Считам, че статиите са на високо научно ниво. Има забелязани 2 цитата от чужди автори на статии публикувани през 2014 г. което показва, че тези съобщения веднага са предизвикали интерес. Резултатите са докладвани на 10 международни и местни научни форума.

## **8. Доколко изследванията по дисертацията са предимно лично дело на докторанта.**

Считам, че изследванията са в необходимата степен лично дело на докторанта. В 3 от публикуваните статии, свързани с дисертацията, г-ца Райнова е първи съавтор а в четвъртата е втори съавтор което недвусмислено говори за нейното най-активно участие и значителен принос в разработките. Докторантката е първи съавтор в 10-те съобщения докладвани на международни и местни научни конгреси, конференции и семинари.

## **9. Заключение.**

Дисертационният труд представлява съществен и оригинален принос към опознаването структурата и функцията на кислород-пренасящи протеини в безгръбначни организми. Този проблем има научно, медицинско и биотехнологично значение. Резултатите от проведените изследвания имат не само научна стойност но е предложено и практическо приложение на част от тях. Предвид на това, че образователната и научна цели на докторантурата са постигнати, препоръчвам присъждане на научната и образователна степен „доктор” на Юлиана Маринова Райнова.

01.12.2014 г.

Рецензент:

София

/проф. дхн Николай Христов Генов/