

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Сашка Бойчова Крумова
Институт по биофизика и биомедицинско инженерство - БАН, София

Относно Дисертационен труд на тема: „Структура и биологична активност на кислород-пренасящи протеини от безгръбначни”, представен от **Юлиана Маринова Райнова** за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ по професионално направление 01.05.10, научна специалност: „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества”
с научен ръководител доц. д-р Красимира Идакиева
съгласно Заповед № НО-05-05-8Д/30.10.2014 г. на Директора на ИОХЦФ-БАН

Дисертационният труд на **Юлиана Райнова** е насочен към структурно и функционално (ензимна активност) характеризиране на кислород-пренасящите белтъци хемоцианини, изолирани от слабо проучени представители на типовете членестоноги (два вида рак) и мекотели (един вид охлюв). Хемоцианините са тип-3 медсъдържащи протеини с разнообразна четвъртична структура, но със сходна структура на активния център при различните видове. Те често притежават латентна ензимна активност, която може да бъде активирана от различни фактори.

Изучаването на структурните и функционални особености на хемоцианините представлява интерес не само поради важната им биологична функция, но и поради приложението им в медицинската практика като имуномодулатори и противоракови агенти.

Като принос в тази насока дисертационният труд изследва промените в структурата и фенолоксидазната активност на хемоцианините, настъпващи при взаимодействието им с различни субстрати (катехол, L-Dopa, допамин и др.), както и възможностите за повишаване на ензимната им активност посредством ограничена протеолиза, третиране със SDS и повишена температура. За целта са приложени хроматографски техники за пречистване на препаративни количества хемоцианини, спектроскопски методи за структурен анализ (флуоресценция, кръгов дихроизъм, инфрачервена спектроскопия) и за термодинамично характеризиране на пробите (диференциална сканираща калориметрия).

Установено е, че нативният хемоцианин от рак *Limulus polyphemus* (LpH) е латентен в нативно състояние, докато този от *Cancer pagurus* (CrH) проявява о-дифенолоксидазна активност при субстратите катехол, L-Dopa и допамин. Ензимната активност на CrH нараства при третиране със SDS, ограничена протеолиза и повишаване на температурата, в резултат на конформационни промени в протеина, които правят активните центрове по-достъпни за молекулите на субстрата. Демонстрирана е корелация между структурната и температурната стабилност на хемоцианините от артроподни организми, както и между конформационната стабилност и подвижността в областта на активните центрове, и проявяваната от тези протеини ензимна активност.

Характеризирана е ензимната активност на хемоцианина от *Helix aspersa maxima* (HaH) и неговите изоформи. Установено е, че катехол е предпочитан субстрат за моллюсковите хемоцианини в нативно състояние. Посредством ограничена протеолиза на HaH със субтилизин DY е постигнато 60-кратно увеличение на ензимната му ефективност. Установени са и оптималните условия за активиране на ензимната активност на HaH при третиране със SDS при субстратите катехол и допамин. Натрупаният опит при характеризирането на хемоцианини от безгръбначни е послужил

като основа за разработването на прототип за биосензор на базата на NaN за количествен анализ на катехол във водна среда.

Дисертацията включва значителни по обем изследвания и резултати, разкрити са нови научни факти с фундаментален и приложен характер, оформени са 6 извода и 3 приноса, които очертават най-важните аспекти на изследването.

Дисертационният труд е представен на 118 страници и е илюстриран с 47 фигури, от които 7 са включени в Литературния обзор, 4 - в Материали и методи и 36 - в Резултати и дискусия. Цитирани са 167 източника. Структурирането на тезиса (15 страници Литературен обзор, 11 – Материали и методи и 53 – Резултати и дискусия) покриват изискванията за научен труд за придобиването на образователната и научна степен “доктор”.

Въпреки че работата създава добро общо впечатление за мащабен експериментален труд с ясно дефинирани цели и правилен подход за постигането им, се забелязват и редица неточности като излишни повторения на едно и също твърдение, прекалено описателно представяне на литературния обзор и резултатите, липсата на обширна критична дискусия, правописни и печатни грешки, недостатъчно информативни легенди към фигурите и таблиците (обратно, в легендите често е представена излишна информация) и др.

Качеството на дисертацията би било значително по-високо без тези неточности, но трябва да се отбележи, че те не влияят значително върху валидността на направените заключения. Научната стойност на получените резултати е видна и от представянето им на международни и национални научни форуми, и публикуването им в реномирани списания. Докторантката представя 4 публикации (общ импакт фактор 3.468), две от които вече са цитирани. Юлиана Райнова е първи автор в три от статиите и втори в една от тях. Участвала е с доклади на 5 конференции и има 5 постерни съобщения.

Въз основа на гореизложеното смятам, че представеният дисертационен труд отговаря на правилника на ИОХЦФ-БАН и препоръчвам на членовете на научното жури да присъдят образователната и научна степен ”Доктор” на Юлиана Райнова.

9.01.2015 г.

Подпис:

доц. д-р Сашка Б. Крумова