АГРОБИОИНСТИТУТ - Костинброд
София, бул. "Драган Цанков" 8
тел.: 963 54 07/факс: 963 54 01
Вх. №. 21 /24.01.2018 г.

РЕЦЕНЗИЯ

от Акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн

на дисертационния труд на **Мартин Валериев Иванов** на тема ***„Молекулярно-биологични изследвания на хемоцианини и актини от безгръбначни организми, представители на Черноморската фауна”***, представен за присъждане на образователната и научна степен **„Доктор”** в Област на висшето образование: 4. „Природни науки, математика и информатика”; Професионално направление: 4.3. „Биологически науки”; Научна специалност **„Генетика”**

1. Обща част

Дисертационният труд на Мартин Валериев Иванов на тема: *„Молекулярно-биологични изследвания на хемоцианини и актини от безгръбначни организми, представители на Черноморската фауна”* е изработен в АБИ при ССА под съвместното научното ръководство на проф. д-р Елена Тодоровска и проф. д-р Павлина Долашка. Дисертацията обхваща 108 страници и съдържа 2 таблици, 32 фигури и 207 цитирани литературни източници. От представените документи е видно, че процедурата по провеждане на докторантурата и допускане на докторанта до защита е проведена в пълно съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в РБ и Правилника за неговото приложение.

2. Кратки биографични данни

Мартин Валериев Иванов е роден на 28.08.1987 г. Той е възпитаник е на БФ при СУ „Св. Кл. Охридски”, който завършва през 2010 г. с бакалавърска степен по „Молекулярна биология“, а през 2012 г. придобива и магистърска степен по специалността „Генетика”. През 2013 г. е зачислен като редовен докторант в Агробиоинститута при ССА, а през периода 2014 - 2016 г. след преобразуване на формата на обучение е бил задочен докторант. По време на своето обучение той е бил на двумесечна специализация в Университета на Тюбинген, Германия.

3. Актуалност на разработваната тема

Дисертационният труд на Мартин Иванов е посветен на изучаването на гени кодиращи актин от черноморския охлюв *Rapana venosa* и на хемоцианин от декаподния рак *Eriphia verrucosa*. Изследванията му са фундаментални и целят да запълнят съществуваща празнина в молекулярно-биологичната характеристика на черноморските безгръбначни, както и да хвърлят повече светлина върху произхода и молекулната еволюция на тези протеини. Имайки предвид нарастващия интерес на медицината и козметиката към хемоцианините, актуалността на дисертационната тема не буни никакво съмнение.

4. Познаване на проблема

Задълбочено написаният литературен обзор е индикация за отлично познаване на литературата върху разработвания проблем. Обзорът обхваща 30 страници и се основава на повече от 200 литературни източници. Той е съставен от три раздела, първият от които е посветен на актините и техните гени, вторият - на хемоцианините гени, а третият е методичен.

В първата част на обзора докторантът разглежда особеностите в структурата и организацията на актиновата молекула, след което фокусът се пренася върху еволюцията на актиновите гени. Тук последователно са представени структурата на актиновите гени при низшите еукариоти, безгръбначните, гръбначните и човека. Тяхната съпоставка показва видима тенденция към увеличаване както на броя на гените, така и на техните интрони при преминаване от дрождите към човека. Докато *S. cerevisiae* има един актинов ген, съдържащ само един интрон, то при човека гените са 6 и съдържат 9 екзона и 8 интрона.

Аналогичен преглед е направен и върху хемоцианините и техните гени. Те формират хемоцианиново суперсемейство, в което представителите на отделните таксони имат специфични структурни особености, проявяващи се главно на висшите нива на организация на

молекулата. По тази причина, освен че разглежда филогенетичните взаимовръзки между представителите на хемоцианиновото суперсемейство при целия тип членестоноги (Arthropoda), докторантът се спира подробно и на тези от подтиповете *Chelicerata, Myriapoda, Crustacea и Insecta*. Във втория раздел на обзора са представени и подобните по структура на хемоцианините хексамерини (изпълняващи функцията на резервни протеини при насекомите), псевдо-хемоцианините при *Crustacea*, както и фенолоксидазите. Не е пропуснато и приложението на хемоцианините в съвременната медицина.

В третия (методичен) раздел на литературния обзор са разгледани съвременните методи за целево изолиране на избрани нуклеотидни секвенции от генни и геномни библиотеки чрез така наречените Expressed sequence tags (ESTs), а също така съвременните методи за генно и геномно секвениране с помощта на секвенатори от второ и трето поколение.

Прегледът на литературата показва, че данните за структурата на актините и хемоцианините, и на техните гени при голям брой безгръбначни са твърде оскъдни, което пречи на изясняването на техния произход и еволюция. Това важи с особена сила за обитателите на Черно море. Последното мотивира докторанта да избере за обект на своите изследвания именно актините и хемоцианините на *Rapana venosa* и *Eriphia verrucosa*.

5. Цели и задачи

Целта на дисертацията е формулирана лаконично: *„Изолиране и характеризиране на хемоцианин и актин кодиращи последователности от черноморския рак Eriphia verrucosa и черноморския охлюв Rapana venosa чрез използване на съвременни молекулярно-биологични подходи"*. Адекватни на целта са поставени пет задачи, които включват изолиране на транскрипти (кДНК), кодиращи хемоцианин от вида *Eriphia verrucosa* и *Rapana venosa*; проучване на еволюционните връзки на хемоцианини от вида *E. veruccosa* с такива от други членестоноги и молюски, както и филогенетичните връзки между актини от гръбначни и безгръбначни; определяне на структурата и биологичните свойства на нативната молекула на хемоцианина. Намирам целта за амбициозна, но постижима за срока на докторантурата.

6. Методика на изследването

Методичният раздел обхваща 12 страници и включва твърде разнообразни методи като: съхранение и подготовка на животински материал за изолиране на тотална РНК; пречистване и анализ на нуклеинови киселини на агарозен гел; провеждане на PCR; конструиране и скрининг на кДНК библиотеки; секвенционен анализ на ДНК; кръгов дихроизъм (CD); изследване на четвъртичната структура на хемоцианини чрез електронен микроскоп; биоинформатични анализи и др. Методите са описани подробно, което позволява експериментите да бъдат възпроизведени без нужда от допълнителна методична литература. Това прави дисертационния труд ценно методично пособие за други студенти и докторанти, специализиращи в областта на молекулярната биология и молекулярната генетика.

6. Оценка на резултатите

Резултатите от проведените изследвания са представени на около 30 страници и са богато илюстрирани с фигури и таблици. Изследванията на Иванов започват с изолирането на актинов ген от черноморския охлюв *Rapana venosa*. За целта той екстрахира тотална РНК от мускулна тъкан, която използва като матрица за получаване на актинова кДНК. Процедурата е проведена двуетапно, първият от кото включва получаване на кДНК съответстваща на централната част на актиновата иРНК, която впоследствие е „достроена" с липсващите й 5'- и 3'-участъци. Първият етап на реакцията е проведен с използването на два дегенерирани актинови праймери, а във втория - синтезираната кДНК е използвана като праймер (прав или обратен, в зависимост от това коя част на молекулата се достроява), а вторият е дегенериран. В резултат на проведените експерименти, докторантът получава кДНК съставена от 1565 нд, съдържаща 111 нд 5`-крайна нетранслираща се област, отворена рамка на четене от 1131 нд и

323 нд, съответстващи на 3`-крайна нетранслирана област (включително и 30 нд поли-А опашка). Отворената рамка на четене кодира протеин с дължина 376 АК, кореспондиращ по размер и състав на актините на други молюски. Подобно на последните, първите 3 АК от актина на *R. venosa* се различават от тези на актините от гръбначни. Провеждайки филогенетичен анализ, докторантът определя изолирания от него ген като кодиращ протеин от типа бета-цитоплазмен актин.

Същата стратегия е приложена и за изолиране на кДНК на хемоцианина на черноморски рак *Eriphia verrucosa*. В този случай тотална РНК е изолирана от хепатопанкреас, а дегенерираните праймери за обратно-транскриптазната реакция са синтезирани в съответствие с вътрешната високо консервативна област на иРНК на 6-та субединица на родствения рак *Metacarcinus magister* (единствения вид рак, при който са дефинирани всичките 6 хемоцианинови субединици). В резултат на това е получена кДНК с дължина 540 нд, която е клонирана, секвенирана и секвенцията й е използвана за дизайн на специфични праймери за реакциите, целящи да генерират кДНК съответстваща на липсващите 5'- и 3'-крайни области на иРНК. След клониране, скриниране и секвениране на получените кДНК последователности, те са асемблирани в рамката на четене. Така получената кДНК е с дължина 2254 нд и включва 15 нд 5'-нетранслираща се област, отворена рамка на четене от 2025 нд и 214 нд 3'-нетранслираща се област (включително и поли-А опашка от 13 нд). Отворената рамка на четене кодира полипептид съставен от 675 АК. Чрез съпоставяне с други известни хемоцианинови секвенции на представители от клас *Malacostraca*, докторантът идентифицира и Cu^{++} свързващите домени CuA и CuB, намиращи се съответно в позиции 625-801 нд и 1108-1269 нд. Локализирани са и шестте хистидилови остатъци, характерни за този тип хемоцианини, пряко отговорни за свързването на медните йони. Проведеният филогенетичен анализ разкрива висок процент на покритие (99%) и идентичност (85%) със субединица 5 на хемоцианина от *Metacarcinus magister*, което е дало основание на докторанта да класифицира изолираният от него транскрипт като кодиращ субединица 5 на хемоцианина от *Eriphia verrucosa.* Биоинформатичният анализ на аминокиселинната последователност разкрива наличието на 11 възможни центрове за О-гликозилиране. За да провери дали това е гликопротеин, Иванов провежда орциол/H_2SO_4 тест използвайки нативен хемоцианин от *E. verrucosa*, който е отрицателен. С този тест докторантът доказва, че субединица 5 на изследвания от него хемоцианин не съдържа гликани. Нативният протеин е наблюдаван и посредством електронна микроскопия, която показва, че същият се характеризира с хексамерна структура - характерна за ракообразните.

Стабилността на нативния хемоциан от *Eriphia verrucosa* при различни стойности на pH, температура и денатурация под въздействие на гуанидин хидрохлорид е изследвана с кръгов дихроизъм. Така докторанта определя предполагаемото съдържание на α-спирали, β-структури, неподредени структури и бримки при различните параметри на изследването. При неутрално pH и стайна температура те са 27.8% α-спирали, 6.8% β-структури и по 33% за неподредените структури и бримките, което характеризира молекулата като високо стабилна.

Резултатите от изследванията са интерпретирани задълбочено в светлината на многобройните литературни данни и въз основа на това са формулирани и изводите на дисертацията, които приемам като точни и адекватни на получените експериментални данни.

7. Публикации

Резултатите от изследванията свързани с дисертациата са отразени в **3** научни статии, **2** от които са публикувани в реферирани списания с общ **ИФ = 5.284**, а една е доклад отразен в сборника с материали от 33-тия пептиден европейски симпозиум (2014 г.). В две от статиите докторантът е водещ автор. Резултатите са представени и на **1** международен научен форум.

9. Автореферат

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

10. Критични бележки и препоръки

Към докторанта имам следните въпроси свързани с неговия дисертационен труд:

1. Какво е обяснението му на факта, че дизайнът на дегенерираните праймери използвани за изолиране на хемоцианиновия ген от *Eriphia verrucosa* е базиран на първичната структура на 6-та субединица на хемоцианина от *Metacarcinus magister*, а *де факто* той изолира 5-та субединица?
2. В дисертацията са описани изследвания върху нативни хемоцианини, чието получаване не е описано в раздела Материали и методи. Какъв е техния произход?
3. При изследване денатурацията на природните хемоцианини под въздействие на нарастващи концентрации гуанидинхлорид, последният е категоризиран като детергент. Каква е дефиницията за детергент и детергент ли е гуанидинхлорида?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на редовния докторант при АБИ Мартин Иванов е посветен на изучаването на два нови гени, изолирани от черноморските обитатели *Eriphia verrucosa* и *Rapana venosa*, първият от които кодира актин, а вторият - хемоцианин. кДНК съответстваща на техните зрели транскрипти е секвенирана и депозирана в базата данни на NCBI, което само за себе си е принос в изследването на геномите на двата вида безтръбначни. При разработката на дисертацията са използвани много знания и практически умения от различни области на природни науки, като зоология, таксономия, молекулярна биология, молекулярна генетика и др. Изследванията са довели до значими научни резултати публикувани в **3** научни статии в списания с общ **ИФ = 5.284** и на **1** доклад представен на международен научен форум. Чрез своите научни постижения и умения Мартин Иванов се представя като зрял изследовател, който напълно удовлетворява изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото прилагане и Правилника на Агробиоинститута за придобиване на образователната и научна степен **„Доктор"**. Това ми дава основание убедено да препоръчвам на Научното жури определено да проведе защитата на неговия дисертационен труд ***да му я присъди.***

23.01.2018 г.

Рецензент:

/Акад. проф. дбн Иван Г. Иванов/