

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Магдалена Иванова Чорбаджиева

Катедра Биохимия, Биологически факултет, СУ "Св. Кл. Охридски"

Относно: дисертационен труд на задочен докторант **Мартин Валериев Иванов** на тема "Молекулярно-биологични изследвания на хемоцианини и актини от безгръбначни организми, представители на Черноморската фауна" за присъждане на образователната и научна степен "Доктор" по професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Генетика“.

С непрекъснатото усъвършенстване на молекулярно-биологичните техники броят на геномни, протеомни и транскриптомни анализи на различни организми от животинския и растителен свят постоянно нараства. В това отношение представителите на морската фауна са все още слабо проучени, а следва да се подчертае, че те са не само източник на храна за човешката популация, но също така представляват и своеобразен резервоар на потенциално биологично-активни вещества с медицинско и фармакологично значение. Хемоцианините са белтъци с кислород-пренасяща функция при безгръбначните, които допринасят и за техния вроден имунитет. Същите привличат засилен научен интерес през последните години, свързан със силните им имуномодулиращи свойства при човека. Хемоцианините от мекотели и членестоноги се използват за разработване на антители и ваксини, а също така и като неспецифични имуномодулатори за редица онкологични заболявания. Охарактеризираните гени, кодиращи хемоцианини при безгръбначните животни, са все още малко на брой и това определя актуалността на дисертационния труд на Мартин Иванов, посветен на изолиране и охарактеризиране на гени от представители на различни безгръбначни организми, обитаващи Черно море – актин от морския охлюв *Rapana venosa* и хемоцианин от рака *Eriphia verrucosa*.

В литературния обзор е обобщена наличната литература относно структурата и функцията на актини при низши еукариоти, безгръбначни и гръбначни животни, включително и човека. Проследени са филогенетичните взаимовръзки между основните групи белтъци, включени в състава на суперсемейството на хемоцианина при тип членестоноги. Подобаващо внимание е отделено на тяхното приложение в медицината. Обзорът е добре онагледен с фигури от актуалната литература, част от които не са цитирани, но този пропуск, както и редица правописни грешки не намаляват съществено неговите качества. Цитираната литература обхваща 207 литературни източника, повечето от които са от последните 5-10 години. От литературния преглед произтича логично целта, за чието постигане са поставени 5 конкретни задачи.

Във връзка с целите на изследването са подбрани съответните експериментални подходи, описани коректно и достатъчно подробно в раздел "Материали и методи". В този раздел липсва описание на метода за изолиране на нативен хемоцианин.

Основните резултати от експериментите са документирани убедително със 17 фигури и една таблица.

В резултат на удачно избраната методология на RACE успешно са клонирани пълноразмерните кДНК на гените за актин от *Rapana venosa* и хемоцианин от *Eriphia verrucosa* и тяхната първична структура е доказана чрез секвенционен анализ. Имам следната забележка: при описание на отделните етапи на клониране и на двата гена се наблюдават различия в използване на а/ anchor primer – на едни места е на английски език, на други места е написан на кирилица като анхорен/анхор праймер или б/ нестед-праймер. Редно би било чуждиците, ако нямат добър аналог на български език, да се изписват на английски език.

Сравнителният анализ на аминокиселинните секвенции на актина от *Rapana venosa* с тези от 6-те актинови изоформи при човека установява съвпадение на 15 от 20-те диагностични АК, характерни за цитоплазмените актини, което дава основание клонираният *RvAct1* да бъде класифициран като цитоплазматична актинова изоформа. Допълнително потвърждение за тази класификация е наличието на консервативни АК в райони, отговарящи за свързване на нуклеотиди; АТФ и Ca^{2+} ; DNase I. Сравнителният анализ разкрива интересна особеност, а именно, че диагностичният за цитоплазматични актинови изоформи при човека Cys²⁷² се наблюдава и при изследваните актини от членестоноги и липсва при актините от мекотели, което може да служи като специфичен белег за отличаване на цитоплазмените актини от двата типа безгръбначни организми. Филогенетичният анализ, проследяващ филогенетичните връзки на актина от *R. venosa* с тези от представители на безгръбначни и гръбначни животни, очаквано го групира с цитоплазмените актини в субкластера на актините от мекотели, което е допълнително потвърждение за голямото сходство на актините от мекотели с тези от гръбначните организми.

Анализът на АК последователност в клонираната пълноразмерна кДНК за хемоцианин от *Eriphia verrucosa* (Хц) показва наличието на 6-те консервативни хистидилови остатъка, както и на двата високо консервативни района CuA и CuB, които го определят като същински хемоцианин, способен да пренася кислород. В тази връзка имам следната забележка: общоприето е коментирани и маркирани конкретни аминокиселини, както е в случая с консервативните хистидилови остатъци на Фиг. 22, извод номер 6 и евентуалните места за О-гликозилиране на Фиг. 26, да бъдат представени с тяхната позиция, напр. Н²¹⁷, Н²²³ и т. н., а не със съответните им кодони. Проведеното сравнение на АК последователност на клонирания хемоцианин с криптоцианини от три различни представители на членестоноги установява висока хомология между тях, но също така и липса при последните на някои от 6 - те високо консервативни хистидилови остатъка, отговарящи за свързване на медни йони. В тази връзка имам една забележка – тези хистидилови остатъци липсват, а не се намират на други места, както се твърди в дискусията. Именно тяхната липса води до невъзможност криптоцианините да пренасят кислород, което ги отличава от хемоцианините. Наличната най-висока хомология със субединица 5 на хемоцианин от *Metacarcinus magister* позволява клонираната кДНК да се квалифицира като субединица 5 на Хц от *E. verrucosa*. Резултатите от кръговия дихроизъм определят нативния Хц като стабилен белтък, устойчив в широк диапазон на промени в рН и

температура, както и на относително високи концентрации на денатуриращия агент гуанидин хидрохлорид. Към тази част от дискусията имам следната забележка – при коментара за поведението на Хц, сравнен с това на други хемоцианини при различна температура и гуанидин хидрохлорид (стр. 82), както и спрямо различни рН стойности (стр. 83), напълно липсва препратка към съответните литературни източници.

Изводите от работата са формулирани в съответствие с получените експериментални резултати. Изолирането и характеризирането на гени за актинови изоформи от мекотели би допринесло за обогатяване на познанията ни за тяхната структура, функция и еволюция. Завършен е един етап от изследователската работа, който е предпоставка за по-задълбочено изучаване на механизмите на действие на хемоцианините, което е от изключително значение за подобряване на клиничната им ефективност и за по-добро разбиране на някои техни ендегенни имунологични функции.

Бих желала да задам на докторанта следните въпроси: 1) Възможно ли е, съдейки по секвенциите на клонираната кДНК за Хц от *E. verrucosa*, същият да има сигнален пептид, какъвто присъства в други хемоцианини и как би могъл такъв да бъде установен? 2) От какви съображения са използвани праймери на база на консервативни последователности от субединица 6 на хемоцианин от *Metacarcinus magister* за клониране на хемоцианин от *E. verrucosa*, а за същата цел не са използвани наличните последователности от вече частично клониран Хц и секвенциите от N-крайното секвениране (публикувани в статия номер 3), което би съкратило целия процес на клониране?

Част от резултатите, свързани с дисертацията, са представени в три публикации, както и в 1 участие на международна научна конференция. Една от публикациите е с импакт фактор (IF=3.269). В две от публикациите докторантът е на първо място, което е доказателство за неговия личен принос както в изработването, така и в публикуването на получените резултати. Според представени от автора данни са забелязани 4 цитирания без автоцитирания.

Авторефератът съдържа основните резултати и изводи и по обем и съдържание отговаря на изискванията.

В заключение: Считам, че дисертационният труд отговаря напълно на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България и Правилника за неговото приложение. Докторантът Мартин Валериев Иванов демонстрира добра методична подготовка, като е овладял широк набор от съвременни молекулярно-биологични техники, както и задълбочени теоретични познания в областта на съвременната молекулярна биология с критичен подход при представяне и обсъждане на резултатите от научните си изследвания.

Въз основа на гореизложеното си позволявам да препоръчам на уважаемото Научно жури да присъди образователната и научна степен „Доктор“ на Мартин Валериев Иванов.

16.02.2018 г.
София

Изготвил становището:
/проф. д-р Магдалена Чорбаджиева/