

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд, представен за защита пред научно жури, сформирано със заповед № РД 38-58/02.2012 на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски”

за получаване на образователната и научна степен “доктор”

Автор на дисертационния труд: Дафинка Колева

Тема на дисертационния труд: “Регулация и експресия на гени от антиоксидантната защита при дрожди с различен тип метаболизъм”

Рецензент: проф. Мария Ангелова, д.б.н.

В последните години сме свидетели на огромния интерес на обществото и учените към различни аспекти на оксидативния стрес. Терминът „оксидативен стрес” много бързо се превръща в ключова фраза за 21 век. Теоретичната важност на посоченият феномен е свързана с възникването на повече от 70 хронични заболявания, със стареенето на клетките, с адаптацията към екстремни условия на живот, с вредното въздействие на факторите на околната среда и много други. Ако можем да контролираме баланса между оксидантите и антиоксидантите, ако намалим нивото на свободните радикали, ще намалим риска от заболяване, ще забавим процеса на стареене. Един от начините да постигнем тази цел е да се управлява нивото на ензимните и неензимните антиоксиданти, като се проучат механизмите на регулация. Дрождите са много подходящ модел за такива изследвания и информацията от тях нараства лавинообразно. Въпреки това, все още има редица въпроси, които чакат своето решение. Към тази изключително актуална проблематика са насочили вниманието си докторантката Дафинка Колева и нейният научен ръководител доц. Анна Куюмджиева. Нещо повече, те са намерили своята научна ниша, в която могат да проучат нови аспекти на проблема, да получат нова информация. И правят това като използват най-съвременни подходи от протеомиката и биоинформатиката. Включването на компютърна стратегия е не само предвестник на нова ера в биомедицинските изследвания, но и предпоставка за по-детайлно изясняване на регулаторния механизъм на антиоксидантната защита на молекулно ниво. Всичко казано до тук подчертава актуалността и перспективността на докторската теза. Искам да добавя, че Дафинка Колева е още един млад учен, израснал в школата на доц. Куюмджиева, която е пионер в изследванията на този проблем в България.

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 219 стандартни компютърни страници, които включват 182 страници текст и 357 страници литература. Литературният обзор е изготвен

целенасочено и конкретно, с творческо използване на литературните данни. В него са отразени 377 публикации на латиница, кореспондиращи напълно с всяка една от поставените задачи. Искам да отбележа, че това е един задълбочен анализ на съвременното състояние по проблема в световен мащаб, който запознава читателя с всички аспекти на изследването и дава необходимата информация за постигнатото и за нерешените въпроси. Обзорът звучи много актуално, тъй като над 60% от статиите в него са от последните 10 години. Искам да подчертая, че е отделено необходимото внимание и на българските учени, включително и на колектива, в който е разработена дисертацията.

Целта на дисертационния труд съответства на актуалността на проблема, подчертава иновативния характер на разработката и насочва вниманието към ново, съвременно ниво на проучване проблемите на оксидативния стрес и антиоксидантната защита. За реализиране ѝ са формулирани конкретни, взаимно обвързани и логически следващи задачи, които включват всички задължителни етапи на подобно проучване. Още тук се вижда сериозният обем работата, който е включен в разработката.

Разделът “Материали и методи” включва методи, които са подбрани целенасочено според изискванията на експеримента. В този раздел прави впечатление следното:

- методите са описани прецизно, без излишни подробности, но достатъчно пълно, за да бъдат възпроизведени;
- в експериментите е включен широк набор от рутинни и съвременни микробиологични, биохимични и биоинформатични методи, които включват идентификация на гени, включително и ортолози и вътревидови паралози; вътреклетъчна локализация на антиоксидантни ензими, разпознаване на белтъци в различни клетъчни компоненти, определяне на изоензимен профил и др.
- прави впечатление разнообразието и взаимното допълване на различни методи.

Разделът „Резултати и обсъждане” в научния труд на Колева очертава едно сериозно научно изследване, което е онагледено с 22 таблици и 27 фигури. Разработката се отличава с мащабност и ясно изразена логическа последователност.

Основната част от експерименталната работа е свързана с разработването на *in silico* модел, предсказващ клетъчния отговор на респираторни и оксидативни дрожди срещу оксидативен стрес. Тази част обхваща около 50% обема на собствените резултати. С методите на биоинформатиката са получени нови данни за наличието в клетките на използваните модели на гени за експресия на антиоксидантни ензими,

ортолози на тези, описани при *Saccharomyces cerevisiae*. Доказано сходство и различие в аминокиселинната последователност на ензимите в рамките на вида. Получени са данни за регулацията на синтеза на тези ензими на ниво транскрипция в присъствие на стрес фактори. Получена е информация за наличието на специфични сигнали при *K. lactis*, *P. pastoris* и *S. cerevisiae*, които насочват синтеза на каталаза А в пероксизомите. Дискутира се и въпросът за доказаната по-рано от същия колектив двойна локализация на този ензим в митохондриите и пероксизомите. Трябва да се отбележат и резултатите, получени за пероксидазите. Впечатление правят архитектурните модели на домени, причисляващи различните антиоксидантни ензими, (пероксидаза, глутатион-синтетаза, глутатион трансфераза) към съответния клас, доказването на броя на гените за тези ензими и тяхната хомоложност с тези при *S. cerevisiae*. Представени са доказателства за участието на катаболитната репресия при синтеза на някои от изследваните ензими.

В следващият раздел докторантката е проучила много подробно биосинтезата на основните антиоксидантни ензими супероксид дисмутаза (СОД) и каталаза (КАТ) при дрожди от двата типа метаболизъм и техният изоензимен профил. Заслужават особено внимание обясненията за феномена мултимерни ензимни форми на СОД и КАТ.

Разделът, третиращ влиянието на въглеродния метаболизъм върху експресията на гените за СОД и КАТ е пример за съвременен прочит на основен микробиологичен проблем. Читателят получава нова информация за влиянието на различните въглеродни източници, температурата и β -меркаптоетанола върху специфичната активност и електрофоретичния ензимен профил на двата ензима чрез използването на биохимични подходи и интерпретация на базата на резултатите от биоинформатичните изследвания.

Като изключително добро постижение в раздел „Резултати и обсъждане” искам да отбележа дискусията на резултатите. Тази дисертация се отличава от много други именно по тази си характеристика. Направено е задълбочено и професионално обсъждане на данните като са използвани подходящи литературни източници. Дискусията е умело преплетена със собствените данни, което създава впечатление за увереност и съизмеримост с публикуваното от други автори. Това, разбира се, е възможно благодарение на много доброто познаване на проблема и задълбочената научна разработка. Искам със задоволство да подчертая много доброто оформление на дисертацията, стегнатия научен стил, на който е написана, коректното отразяване на резултатите в таблици, както и тяхното професионално представяне. Изводите са логично следствие от експерименталните данни и дават необходимата информация за стойността на проведените изследвания.

Искам да отбележа, че докторантката е взела в пред вид забележките и препоръките, посочени от мен в предварителната рецензия за апробацията.

Към Колева имам следните въпроси:

1. Как виждате значението на Вашите научни приноси в приложен аспект?
2. Какви са предимствата на биоинформатичните методи при проучване проблемите на оксидативния стрес?

В дисертационния труд на Дафинка Колева се открояват както научни, така и научно-приложни приноси. По същество те се отнасят до следното:

Научни приноси

1. Създаден е *in silico* модел, предсказващ клетъчния отговор на респираторни и оксидативни дрожди срещу оксидативен стрес.

2. Получена е нова информация за гените участващи в антиоксидантната защита при ферментативни, респираторни и облигатно оксидативни дрожди. Доказан е броя на гените, кодиращи ензимите СОД и КАТ и постраницационната модификация на експресията на тези гени.

3. За първи път са доказани причините за експресията на допълнителни мултимерни форми на Mn-СОД и КАТ.

4. Направена е детайлна характеристика на ензимите СОД и КАТ при респираторни и оксидативни дрожди и техния изоензимен профил и е определена тяхната термостабилност и устойчивост на редуциращи агенти.

5. Доказано е използването на специфични сигнали за насочване локализацията на антиоксидантни белтъци в допълнителни субклетъчни структури.

6. Доказано е наличието на силно консервативни домени при ключови ензимни и неензимни белтъци при респираторни и оксидативни дрожди.

7. Доказано е, че броят на гените, кодиращи съответен антиоксидантен ензим не е определящ за специфичната активност на този ензим.

Научно-приложни приноси

1. Въпреки, че разработката на Колева се причислява към фундаменталните изследвания, направените научни приноси имат и своето приложно значение. Получените резултати са принос в насочената биосинтеза на антиоксидантните ензими СОД и КАТ, което може да доведе до повишаване на добива от тях.

Данните, представени в дисертацията са включени в 4 научни статии, отпечатани в списания с IF (1 в *Can J Microbiol* и 3 в *BBEeq.*) Общият IF е **2.5** Следователно, резултатите от разработката са получили и международно признание. Освен това, докторантката е на първо място във всички статии, което ми дава

основание да считам, че тя има решаващо участие в проведените експерименти. Освен това, Колева е съавтор на 6 участия в научни форуми.

В заключение искам да отбележа, че е налице едно добре обмислено научно изследване, осъществено на съвременно методично ниво, със силно изразен фундаментален характер, но и с потенциално практическо приложение. Под ръководството на научния си ръководител и с помощта на колегите от лабораторията, докторантката Дафинка Колева предлага нова информация за механизмите, участващи в регулиране активността на антиоксидантната защита. То този начин тя е придобила практически умения и теоретични познания в областта на микробиологията, биохимията и биоинформатиката. Получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки, открояват се оригинални научни и приложни приноси.

Въз основа на направения разбор и на личните ми впечатления от работата на докторантката през тези години, предлагам на уважаемите членове на научното жури, сформирано със заповед на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски” да присъдят на Дафинка Иванова Колева образователната и научна степен “доктор”.

26. 03. 2012 г

София

Рецензент:.....

/проф. М. Ангелова д.б.н./