

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд: **Регулация и експресия на гени от антиоксидантната защита при дрожди с различен тип метаболизъм**

За придобиване на научната и образователна степен „доктор”

от **Дафинка Иванова Колева**

Научен ръководител: Доц. А. Куюмджиева

Рецензент: доц. Маргарита Камбурова, Институт по микробиология, БАН

Въпросът за оксидативния стрес е от особен интерес за човека във връзка с доказаното му значение на за развитие на редица болести като нервно дегенеративни (Алцхаймер, Паркинсон); кардиоваскуларни, образуването на плаки в кръвоносните съдове, исхемична каскада, инфаркти. В резултат на оксидативен стрес се нарушава балансът между продукцията на силно реактивните кислородни видове и способността на клетката лесно да обезвреди реактивните междинни метаболити или да поправи получените клетъчни повреди. Реактивните кислородни видове (ROS) като супероксидни и хидроксилни радикали, хидропероксиди, водороден прекис се генерират от външни източници и повреждат клетъчните компоненти, като ДНК, белтъци, липиди. Почти всички клетки изложени на действието на кислорода са изработили еволюционно многостъпална антиоксидантна защита. Антиоксидантните ензими и не-ензимни средства на клетката за защита прекратяват каскадата от неконтролируеми реакции в органелите или цитозола. Ключовата роля на ензими като супероксид дисмутаза, каталаза, пероксидаза е установена при редица организми. Дрождите са най-удобни за такива изследвания заради лесното им култивиране и факта, че са едноклетъчни еукариотни организми.

Дрождите са особено подходящи и за ин силико анализ на ензимите, участващи в антиоксидантната защита поради най-малките еукариотни геноми при тези организми. Благодарение на секвенираните в последните години дрождеви геноми могат да се предположат гените, кодиращи белтъците от антиоксидантната защита. Въз основа на съхраняваната в банките база данни информация за аминокиселинната

последователност на белтъците може да се предскаже тяхната функция, физични и химични свойства и еволюционна близост въз основа на ортоложни гени. Тези изследвания са инициирани в края на 80-те и началото на деветдесетте и стават все по-актуални с натрупването на нова информация в банките. Ето защо в предлагания ми за рецензиране труд се дискутира актуален проблем, какъвто е оксидативния стрес, чието разрешение се търси с избора на подходящ обект (дрожди) и с използването на модерен биоинформатичен подход (ин силико анализ).

Дисертационният труд е представен на 219 стандартни страници, от които 182 са текст и 36 - литература. Включва 44 фигури и 22 таблици. Цитирани са 377 литературни източника с пълни библиографски данни като близо половината от тях са от последните десет години. Дисертационният труд е конструиран стандартно с основни раздели: Литературен обзор (71стр.), Цел и задачи (2 стр.), Материали и методи (9 стр.), Резултати и обсъждане (92 стр.). Въз основа на получените резултати са направени седем извода и са посочени шест научни приноса на дисертационния труд.

Литературен обзор

Литературният обзор се състои от пет основни части и е структуриран в съответствие с поставената цел. Той отразява заслуженото място на дрождите като моделни организми за изследване на клетъчната защита срещу увреждане от свободни кислородни радикали. Демонстрирано е отлично познаване и в детайли на катаболитните пътища при дрожди с различни типове метаболизъм, влиянието върху тях на оксидативния стрес и клетъчния отговор на този стрес чрез превключване на метаболитни пътища и повишена експресия на ензими от антиоксидантната защита. Специално внимание е отделено на звената от тези катаболитни пътища, където става генерирането на супероксидни радикали, причиняващи увреждания на клетъчните макромолекули. Разгледани са групите ензими, участващи в защитата, тяхната компартиментализация и кодиращи ги гени. Приятно впечатление прави фактът, че докторантът познава достиженията на българските учени, работещи в областта на антиоксидантната защита както от БФ, така и от ИМ, БАН.

Поставената цел е ясно формулирана и отговаря на получените резултати. В съответствие с поставената цел са дефинирани шест задачи, отнесени към две групи, като е демонстриран добър баланс между двата типа изследване - три от тях са биоинформатични и три са свързани с лабораторни експерименти. С логична

последователност докторантката дефинира задачи за *in silico* анализ, последвани от експериментално потвърждаване на резултатите от биоинформатичния подход.

Материали и методи

В раздел Материали и методи е отразено богатството от методи, използвани за изпълнение на поставените задачи, като са използвани както рутинни микробиологични и биохимични методи, така и модерния биоинформатичен подход. Те се отнасят към микробиологични методи за култивиране на различните щамове дрожди и характеризирание на микробния растеж; биохимични методи за количествено определяне на СОД и каталазна активности, както и качествено охарактеризиране на електрофоретичния профил на ензимите; биоинформатични подходи за идентификация на гени, кодиращи ключови антиоксидантни ензими и разпознаване на техните продукти. Съвместното използване на различните типове методи позволява цялостно реализиране на поставената цел с използването на теоретични и експериментални анализи. Усвояването на тези методи очертава докторантката като добре подготвен специалист в областта на биоинформатиката, микробиологията и биохимията.

Резултати и обсъждане

Около половината от раздела Резултати и обсъждане е посветена на *in silico* модели на гените от антиоксидантната защита въз основа на секвенирани геноми на дрожди с различен метаболизъм – факултативен, респираторен и оксидативен. Сравнени са първичните структури на ензимите от антиоксидантната клетъчна защита и са идентифицирани консервативните региони, структуриращи активния център на ензимната молекула. В четири различни дрождеви вида са открити предполагаемите ортолози на гените, кодиращи шест групи ензими от антиоксидантната защита – СОД, каталаза, цитохром оксидаза, пероксидаза, глутатион пероксидаза и тиоредоксин пероксидаза, както и ензимите, участващи в синтезата на не-ензимния фактор на антиоксидантната защита, глутатиона. Определена е степента на хомоложност между гените в *S. cerevisiae* и техните ортолози в други три вида (*Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris* и *Cryptococcus neoformans*). Въз основа на еволюционна дивергенция в рамките на определени граници са потърсени параложни гени в геномите на отделните микроорганизми. Разпознати са значимите сигнални последователности, определящи субклетъчната локализация на изследваните белтъци. Потърсени са обяснения за по-

високите и съответно по-ниски степени на хомоложност в разликата в метаболизма на ферментативни и респираторни дрожди.

В микробиологичната и биохимична част на работата експериментално е определена активността на СОД и каталаза за пет вида дрожди, култивирани на среди с глюкоза, етанол, метанол или глицерол. Докторантката умело интерпретира получените резултати, свързвайки ги с типа метаболизъм. Постарала се е да обясни наблюдаваните различия с посттранскрипционни модификации на белтъчните секвенции, демонстрирайки добро познаване на структурата им. Проследила е растежа и промяната в активността на СОД и каталаза при култивиране на различни въглеродни източници. Построени са растежни криви, отразяващи развитието на културата до 72 ч. като са определени максималните специфични скорости на растеж и коефициентите на добив. Умело е обяснена връзката между високия добив в резултат на интензивен растеж и повишената ензимна активност на ензимите от антиоксидантната защита. Повишената ензимна активност на среда с етанол или метанол, наблюдавана и от други автори, е детайлно разгледана в светлината на възникващите промени в метаболитните пътища на клетката. Повишените количества реактивни кислородни видове, генерирани при усвояването на метанола от метилотрофните дрожди от родовете *Pichia* и *Hansenula* по-нататък е определило подробното проучване на влиянието на високите температури и редуциращи агенти върху активността на техните СОД и каталаза.

Изводи

Въз основа на постигнатите резултати са формулирани 7 извода, отразяващи значимостта на постигнатите резултати. Пет от изводите са свързани с ин силико анализа и два - с експерименталната работа. Изводите отразяват най-важните резултати, постигнати в процеса на изпълнение

Приноси

Посочените в дисертационния труд приноси очертават предложената ми за рецензиране работа като пионерна за България в областта на използването на ин силико анализ на гените, отговорни за антиоксидантната защита на дрожди. Включването на дрожди с различен тип метаболизъм позволява да се получи цялостна картина на клетъчния отговор при тези микроорганизми срещу антиоксидантен стрес. Идентифицирани са гените на ензимите, участващи в обезвреждането на супероксидни радикали, ензимната локализация и сигналните секвенции, отговорни за клетъчната им

локализация. Като принос може да се посочи успешното идентифициране на няколко ортоложни форми за различните групи, както и на гени-паралози, доказващи еволюционната адаптация на дрождите за бърза и масирана реакция на оксидативен стрес.

Към работата имам следните **въпроси**:

1. Как би обяснила по-високата хомоложност на гените, отговорни за клетъчната защита при *S. cerevisiae* и дрождите с респираторен метаболизъм, отколкото с оксидативен метаболизъм?
2. Каква степен на хомоложност между съответните ензими ортолози и паралози е съобщена от други автори и подобни ли са получените стойности на съобщените от докторанта? Хубаво би било подобна информация да бъде включена в таблиците, представящи получените от докторантката резултати.
3. Защо ин силико анализите и експерименталните анализи не са провеждани с използването на едни и същи видове дрожди?
4. Регистрираните от авторката ензимни активности за СОД и каталаза съвпадат ли с получените от други автори резултати за същите щамове?
5. С какво може да бъде обяснена по-високата степен на хомоложност при ортоложните гени за СОД в сравнение с каталазни гени?
6. До каква степен са хомоложни N-сигналните последователности, отговорни за митохондриалното насочване при различните ортоложни гени.

Препоръки:

1. Основаната препоръка към раздел Литературен обзор е включването на глава, отразяваща концентрирано използването на ин силико анализи от други автори за идентифициране на гени от антиоксидантната защита и наблюдаваните от тях степени на хомоложност, за да изпъкне по-нататм приносът на автора, както и да се очертаят съществуващите при използването на тези анализи проблеми. Части от такава информация може да се открие в различни подточки на разделите Литературен обзор и Резултати и обсъждане.
2. Основната ми препоръка към раздел Материали и методи е неговото разширяване. Понастоящем той се състои само от 9 страници и в редица случаи би могло да се опишат по-подробно използваните методики, а не само да се посочват цитати.

3. Основна препоръка по отношение на изводите е формулиране на допълнителни такива, отразяващи немалкия обем експериментална работа. Като извод би могло да се формулира наблюдаваното образуване на мултимерни ензимни форми при метилотрофни дрожди, а приносът да акцентира на това, че ензимната мултимерност е наблюдавана за първи път. Хубаво би било белтъкът от ивиците да се изпрати за секвениране, за да се докаже дали се касае за мултимерни форми или за нов ензим. Друг възможен извод би могъл да бъде свързан с термостабилността на СОД и каталаза. Тъй като явно 75°C е твърде висока температура за ензимите СОД и каталаза, спадът в активността е много бърз и трудно могат да се направят заключения. Резултатите обаче от температурното въздействие при 50°C ясно показват тенденция за много порязък спад в остатъчната активност на СОД и каталаза при култивиране в безклетъчен екстракт от култивирани на ROS-генериращ субстрат метанол при метилотрофни дрожди в сравнение с глюкоза и глицерол.
4. Представяне на АК последователност на насочващите сигнали за всички групи ензими, а не само на участващите в глутатионовата синтеза. По такъв начин работата би могла да се използва като ръководство за лесно идентифициране на посочените домени.
5. Степента на хомоложност е сравнявана между *S. cerevisiae* и дрождите с друг тип метаболизъм. В бъдещата работа на докторантката бих препоръчала да се сравни степента на хомоложност между близкороствени дрожди, например *Kluyveromyces lactis* и *Pishia pastoris*, което би хвърлило светлина върху степента на консервативност на тези гени в еволюционното развитие на видовете.

Данните, представени в дисертационния труд са публикувани в четири работи, отпечатани в списания с ИФ – едно международно (Canadian Journal of Microbiology) и три български (В&В) като докторантката е първи автор в тях, което демонстрира активното ѝ участие в разработваните проблеми. При шестте участия в научни форуми тя е първи автор на четири от представените работи.

Заключение

Представеният ми за рецензиране труд оценявам като цялостна, логично поставена и прецизно изпълнена работа, посветена на важно научно направление, с използването на новаторски подходи и постигането на значими научни резултати, поради което си позволявам да препоръчам на уважаемите членове на журито, назначено със заповед ДО 38-58/10.02.2012 на Ректора на Софийски Университет „Климент Охридски” да присъди на Дафинка Иванова Колева образователната и научна степен „доктор” по научна специалност 01.06.12 – Микробиология.

31 март 2012 г.

София

Рецензент:

/доц. М. Камбурова/