

РЕЦЕНЗИЯ

от член кор. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн
на дисертационния труд на Горица Веселинова Раклеова *“Анализ на екстрацелуларни белтъци от суспензионни култури на *Dactylis glomerata* L. във връзка с тяхната роля в соматичната ембриогенеза”*, представен за присъждане на образователната и научна степен *“Доктор”* по научната специалност *„Биохимия”* в направление *„Биологични науки”*

Горица Веселинова Раклеова е родена на 06.09.1982 г. Тя е възпитаник на БФ на СУ „Св. Кл. Охридски”, откъдето през 2005 г. получава *бакалавърска степен* по *„Молекулярна биология”*, а през 2007 г. *магистърска степен* по *„Генно и клетъчно инженерство”*. От 2008 г. е редовен докторант към катедра *„Биохимия”*, където под научното ръководство на доц. д-р Магдалена Чорбаджиева разработва дисертация на тема *“Анализ на екстрацелуларни белтъци от суспензионни култури на *Dactylis glomerata* L. във връзка с тяхната роля в соматичната ембриогенеза”*.

Дисертационният труд на Горица Раклеова обхваща 148 страници, съдържа 318 литературни източници и е илюстрирана с 44 цветни фигури, 8 таблици и 6 приложения.

Ще започна рецензията си с отличните впечатления които остави у мен рецензирания труд. Той е оформен безупречно, написан е на точен научен език и логично представя получените резултати и тяхната интерпретация. Дисертацията е посветена на изясняване молекулните механизми на изумителната способност на растенията да регенерират от единична клетка. Въпреки че явлението соматична ембриогенеза е известно отдавна, като научен проблем то се възроди в следгеномната ера, когато след 2000-та година науката се обогати с нова мощна методология за изследване на генома и протеома, както и на молекулните механизми управляващи биологичните процеси. Освен като чисто научен проблем, соматичната ембриогенеза привлече вниманието на изследователите и с това, че тя стои в основата на растителното генно инженерство и представлява ключов етап от създаването на трансгенни растения. Като количествена мярка за актуалността на разработвания проблем бих привел справка от Google, където при ключови думи *„plant somatic embryogenesis”* се появяват около 2 млн показания. С други думи, актуалността и значимостта на представената дисертация не буди никакво съмнение.

Литературният обзор е кратък и конкретен. Въпреки обемистата литература, той е развит на 28 страници и условно може да се раздели на две части – *обща и специална*. Първата представлява кратко въведение в соматичната ембриогенеза при растенията като биологичен феномен, а втората е посветена на компонентите на външната клетъчна стена и на секретираниите от соматичните клетки биомолекули. С други думи, разгледан е *секретомът* на соматичните ембрионални клетки и неговото значение за клетъчната диференцировка. Тъй като от компонентите на секретома най-голямо значение имат протеините и по-специално ензимите, тежестта на обзора пада именно върху тях. Подробно са разгледани растителните цистеинови протеази и ролята им за растежа и развитието на растенията; растителните цистатини, тяхната класификация, функция и механизми на инхибиране, както и растителните алфа-амилази и значението им за ембриогенезата.

От краткия, но съдържателен литературен обзор, са изведени лаконично и **Целите и задачите** на дисертацията. Целта е да се анализират екстрацелуларни белтъци от суспензионни култури на *Dactylis glomerata* L. във връзка с ролята им в соматичната ембриогенеза, а от представените задачи става ясно, че докторантката планира да извърши значителна по обем фундаментална изследователска дейност,

насочена към изолиране и охарактеризиране на протеини от културалната среда на суспензионни култури на *Dactylis glomerata* L. Задачите включват също така изолиране, клониране, секвениране и експресия на гените на новите белтъци, както и изучаване на техните биологични свойства.

Разделът **Материали и методи** е много богат и включва методите за получаване и култивиране на ембрионални клетки, изолиране и пречистване на секреторни протеини от културалната среда на суспензионни култури, протеомен анализ чрез двумерната електрофореза, мас-спектрален и N-краен секвенционен анализ на протеини, изолиране на РНК от растителни клетки, получаване на кДНК, амплификация на ДНК посредством PCR, клониране на кДНК, секвенционен анализ на ДНК, конструиране на експресионни вектори и експресия на кДНК клонове в бактерии, ELISA, имуноблотинг и т.н. Детайлното описание на използваните методи дава възможност, при необходимост, експериментите да бъдат повторени без необходимостта от допълнителна методична литература и придава на дисертацията характер на полезно методично пособие за бъдещи дипломанти, докторанти и специализанти към катедрата. Не мога да подмина и богатството на биоинформатични методи, които са използвани за идентифициране на протеини по данни на нуклеотидните им секвенции, за моделиране, както и да виртуално изследване на молекулни параметри и предсказване на свойства и функции на непознати белтъци.

Резултати и обсъждане е основният раздел от дисертацията. Той обхваща повече от 80 страници, богат е на фактологичен материал и описва логиката на научното дирене. В планирането на своите изследвания докторантката е мотивирана както от чисто научни подбуди, така и от желанието ѝ да открие ранни молекулни маркери за оценка на ембриогения и регенеративен потенциал на растителни клетки култивирани *in vitro*, които да намерят приложение при получаването на култури с високи регенеративни свойства за нуждите на растителното генно инженерство. Безспорно, изследванията ѝ до голяма степен са предопределени от опита, знанията и постиженията на нейните научен ръководител (доц. М. Чорбаджиева) и консултант (доц. И. Панчев), които през последното десетилетие имат сериозен успех в изследването на хидролитичните ензими секретирани от ембрионални клетъчни култури и изясняване на функцията им в соматичния ембриогенез.

В своята дисертация Раклеова характеризира чрез 2D електрофореза екстрацелуларния протеом на ембрионалните клетки от *Dactylis glomerata* L. култивирани в суспензионни култури и успява да определи чрез MS анализ и Едмандово разграждане N-крайните последователности на 9 белтъка, от които 5 са идентифицира като цистатини, 2 като катепсини В и L, 1 – ендохитиназа и 1 - α -амилаза. По данни от секвенционния анализ са конструирани праймери за амплификация на кДНК получена от тотална РНК от калуси и микрокластерни клетки на ембрионални суспензионни култури. За получаването на пълноразмерна ДНК за клониране, докторантката прилага различни подходи, в зависимост от специфичността на съответните 3'-праймери. Там където тя е ниска, както е случая с алфа-амилазата и катепсините В и L, е приложен двустъпален подход за амплификация, с междинно секвениране на първичните ДНК продукти (с оглед да бъде получена информация за създаването на по-високоспецифични праймери), а в останалите случаи амплификацията е осъществена директно чрез RACE PCR.

Пълноразмерните кДНК са клонирани и първичната им структура е доказана чрез секвенционен анализ, а данните от анализа са използвани за биоинформатични изследвания, включващи: а) идентифициране на протеините и отнасянето им към съответните белтъчни класове и б) моделиране на предполагаемите белтъчни структури с цел предсказване на техни свойства и биологични функции. По този начин

Раклеова определя изолираните белтъци като: а) две цистеинови протеинази (катепсин В и катепсин L); б) инхибитор на цистеиновите протеинази (фитоцистатин); в) две ендохитинази (от които едната от клас III и една от клас IV) и г) една алфа-амилаза. Последната е определена като идентична с по-рано описания екстрацелуларен гликопротеин EP48 с предполагаеми клетъчно-адхезионни функции. Анализът на секвенциите показва, че всички изследвани белтъци съдържат N-крайни сигнални последователности, което е доказателство за тяхната секретиремост.

Наличието на пълноразмерни ДНК секвенции кодиращи екстрацелуларните белтъци разкрива възможност за тяхната експресия в бактериални гостоприемници и изолиране на препаративни количества рекомбинантни белтъци за изследване на техните биологични свойства и функции. За целта синтетичните (кДНК) гени са модифицирани и адаптирани към подходящи експресионни вектори, с които са трансформирани клетки на *E. coli* BL21(DE3). За щастие, рекомбинантните белтъци са нетоксични за бактериите клетки, което е предпоставка за успешната им експресията и висок добив на рекомбинантен протеин. Прибавянето на C-крайна хистидинова опашка позволява прилагането на афинитетна хроматография върху Ni-съдържаща смола за бързо пречистване на протеините.

Анализът на биологичните свойства на експресирани протеини сочи, че *цистатинът* и α -амилазата са биологично активни, което е указание първо за това, че те са правилно нагънати и второ, че те са активни в негликозилирано състояние. Неактивни са рекомбинантните катепсини, от които единият (катепсин L) се автопроцесира при рН 5. Това обаче не важи за втория (катепсин В), откъдето докторантката прави извода, че той най-вероятно се активира от друга протеаза.

Значителен дял от изследванията (около половината от раздел Резултати и обсъждане) са посветени на протеиназния инхибитор *цистатин*. Една от причините за голямото внимание към него е факта, че той е нов за *Dactylis glomerata* L., а другата е свързана със странните свойства, които той проявява в сравнение с останалите изследвани белтъци. Нуклеотидната последователност на цистатина е депозирана в базата данни на NCBI, което само за себе си е принос на дисертацията, а също така е използвана за многостранни биоинформатични изследвания. Чрез тях докторантката демонстрира своята компетентност и умения да работи с разнообразни компютърни програми за обработка на биологични данни и се представя като задълбочен изследовател, умеещ да извлече максимална информация от своите експериментални резултати.

Анализирайки нуклеотидната секвенция на цистатина, Раклеова предсказва, че той е съставен от 122 ак и съдържа сигнален пептид от 20 ак. Предсказано е и мястото на процесирание. Тъй като суспензионните клетки секретират поне 5 изоформи на белтъка, а генът е един, тя допуска, че те се дължат на пост-транслационни модификации. Последното я стимулира да приложи специализиран софтуер за виртуално изследване на постранслационните модификации по данни на аминокиселинната последователност на белтъка и установява, че най-вероятно изоформите са свързани с различната степен на фосфорилиране, водещо до появата на белтъци различна изоелектрична точка (наблюдавано при природните изоформи). Според нейните данни, ацетирилането и метилирането са малко вероятни процеси. Интересни са данните относно съдържанието на домени в цистатиновата молекула. Търсенето на домени е сравнително ново и модерно направление в биоинформатиката, което помага при изучаване на еволюцията и предсказване функциите на нови протеини. Тъй като домените са къси аминокиселинни последователности, те се откриват практически във всеки белтък. В цистатина, освен домените типични за цистеиновите протеиназни инхибитори, докторантката открива и липокалинов домен,

мотиви за действието на аминокептидази, хидрофобни домени за (евентуално) закотвяне към мембраната и т.н. Също така, Раклеова открива в цистатина и аминокиселинни участъци отговарящи на условието за обмен на домени в димерни и мултимерни комплекси. Биоинформатичните методи са приложени и за предсказване на пространствената структура на фитоцистатина, която пък е използвана за интерпретация на експериментални резултати.

Една от наблюдаваните странности на цистатина е неговата склонност към димеризация и образуване на тетрамерни и мултимерни форми, както и неговата N-крайна молекулна хетерогенност. Изследванията върху биологичната активност на рекомбинантните протеини експресирани в *E. coli* показват, че от всички форми на цистатина, биологично активен е само мономерът. С цел да изследва влиянието на първичната структура на цистатина върху неговата склонност да образува мултимерни форми, Раклеова създава мутантни (делеционни) форми на гена, които също експресира в *E. coli*. Тя показва, че отстраняването на 19 N-крайни аминокиселини предотвратява образуването на мултимери, но не и на димери. Фактът че цистатинът (по биоинформатични данни) отговаря на условието за обмен на домени, дава основание на докторантката да обясни неговите странности именно с това новописано явление.

Изхождайки от нашия дългогодишен опит в експресията на еукариотни белтъци в *E. coli*, ще си позволя да погледна на резултатите на Раклеова от друг ъгъл и на им дам друга (алтернативна) интерпретация, която може да насочи бъдещите ѝ изследвания в друга посока. В серия от статии публикувани през последните години (Mironova, et al., *Evidence for non-enzymatic glycosylation in Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 39(2001)1061-68; Mironova, et al., *Glycation and post-translational processing of human interferon-gamma expressed in Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 278 (2003) 51068-51074; Mironova, et al., *Evidence for non-enzymatic glycosylation of Escherichia coli chromosomal DNA*. Mol. Microbiol. 55 (2005) 1801-1811) ние убедително доказахме, че много рекомбинантни протеини експресирани в *E. coli* са подложени на неензимно гликозилиране (гликиране) засягащо страничните аминокиселини на Lys/Arg, както и N-крайните аминокиселини. Веднъж започнал *in vivo*, този процес протича и *in vitro* (дори и след изолиране и съхранение на белтъка) и води до появата на високо реактивоспособни продукти (AGEs), които пък са причина за образуване на ковалентни димери, тетрамери и мултимери. Тъй като за последните не е необходим Cys, те се наблюдават и в безцистеинови протеини. Според мен, такъв е и случаят с цистатина, който не съдържа цистатин, но образува димери и мултимери, които не се разрушават в условията на денатурираща гел-електрофореза (SDS-PAGE). Достоверността на тази хипотеза може да се провери лесно по два начина: а) чрез измерване на характеристичната флуоресценция на AGEs ($\lambda_{ex} = 370 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$) и б) чрез анализ на продуктите с ELISA или имуноблот използвайки AGEs-специфични антитела.

Задълбочавайки се в изследването на цистатина, Раклеова скринира фагова библиотека, за цистатин-специфични клонове. Тя открива такива, от които изолира ДНК, която също експресира в *E. coli*. По този начин са създадени високоспецифични рекомбинантни антитела, които частично са използвани в настоящата дисертация, но със сигурност ще намерят приложение в бъдещи изследвания свързани с цистатина. Накрая трябва да отбележа и особено информативните резултати относно диференциалната експресията на цистатина в растителни клетки и тъкани в различни фази от тяхното развитие.

Добро впечатление прави и предпоследният раздел от дисертацията **Обобщение**, където въз основа на свои собствени и литературни данни, докторантката

предлага модел описващ ролята на екстацелуларните протеини в регулацията на процесите свързана със соматичната ембриогенеза при растенията.

Въз основа на получените резултати е съставен и последният раздел - **Изводи**. Те са формулирани добре и са в пълно съответствие със съдържанието и постиженията на дисертацията.

Резултатите от дисертацията са отразени в **4 статии** публикувани в периода 2008-2012 г., от които една е пълен текст на доклад изнесен на международна конференция, а останалите са статии в рефериращи се списания с общ **ИФ = 1.201**. Във всички статии Раклеова е първи автор. Резултатите са докладвани и на **10** международни научни форуми. Забелязан е и **1** цитат.

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

Заключение: Със своята дисертация Горица Раклеова се представя като зрял и ентусиазиран научен работник овладяла до съвършенство методологията на съвременната молекулярна биология, биохимия и биоинформатика, способна сама да провежда изследвания на високо научно ниво и да анализира сложни научни резултати. Със своите научни знания и постижения, тя удовлетворява напълно изискванията на Закона за развитие на академичния състав в РБ, Правилника за неговото приложение и вътрешните критерии на СУ за образователната и научна степен “**Доктор**” и аз убедено препоръчвам на уважаемото Научно жури да ѝ я присъди.

14.04.2012 г.

Подпис:



/Член кор. Проф. Иван Иванов/