

## РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Евгени Драганов Ананиев, Биологически факултет, СУ „Св. Кл. Охридски”

**относно:** дисертационния труд на **Горица Веселинова Раклеова**

**Тема на дисертационния труд:** „Анализ на екстрацелуларни белтъци от суспензионни култури на *Dactylis glomerata* във връзка с тяхната роля в соматичната ембриогенеза”. Дисертационният труд е представен за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” по специалност „Молекулярна биология”, направление 4.3 Биологически науки.

**Научен ръководител:** доц.д-р Магдалена Чорбаджиева

Дисертантката Горица Раклеова е родена на 06.09. 1982 г. През 2007 г. тя завъшва магистърска степен на обучение по „Генно и клетъчно инженерство” при БФ на СУ „Св. Кл.Охридски”. От 2008 г. е редовен докторант към катедра „Биохимия”, където под ръководството на доц д-р М. Чорбаджиева разработва докторска дисертация по горната тема.

Дисертационният труд е посветен на изследване молекулните механизми на соматичния ембриогенез /СЕ/ в условия *in vitro* при ежовата главица (*Dactylis glomerata* L.). Сам по себе си соматичният ембриогенез е уникален за растенията процес. При него благодарение на тотипотентността на соматичните клетки, след сигнал от нараняване се предизвиква дедиференциация с образуване на калус, от който с участието на двата основни типа хормони ауксини и цитокинини, може да се предизвиква повторна диференциация в посока на реализация на програмата за образуване на зародиши от клетки с висок ембриогенен потенциал. Този феномен е интересен не само от фундаментална гледна точка, но той е много ценен и за нуждите на съвременните растителни биотехнологии, благодарение на отсъствието на физиологичен покой, т.е той може да се инициира по всяко време за разлика от сложните и ограничени във времето и пространството процеси на образуване на зародиш при половото размножаване. Темата е традиционна за научното звено в Катедра „Биохимия”. По нея има много количествени и качествени научни натрупвания през последните 15-20 г. В този смисъл работата е естествено

продължение на изследванията на доц. Чорбаджиева и широк колектив на Катедрата, започнали съвместно с идеите на покойния вече дбн Н. Николаев.

**Литературният обзор** е фокусиран главно върху характеризирането на сложната система на клетъчната стена и междуклетъчното пространство при растенията /двете заедно формират апопласта/, които са разгледани като единна система „секретом”. Апопластът е строго специфичен за растенията и е с много важно значение не само за обезпечаване на здравината и целостта на организма, но включвайки и проводящата система на растенията, той представлява като обем най-голяма част от растението и реално представлява средата за взаимодействие и комуникация между клетките в една тъкан, в състава на отделни органи и в цялото растение. Дисертантката прави анализ на участието на широк кръг от секреторни белтъци, които съпътстват процеса на диференциация по време на СЕ. Разгледани са основно хидролитични ензими, в т.ч. протеази, естерази, хитинази, и белтъци със сигнална функция – арабиногалактонови белтъци, LRR-рецепторни протеинкинази, PRs, LTPs. В контекста на СЕ най-подробно са разгледани растителните цистеинови протеинази, фитоцистатините и  $\alpha$ -амилазите. На базата на поранни данни на колектива за участието на естрацелуларни белтъци като ембрионални маркери на СЕ, дисертантката правилно **поставя основната цел и произтичащите от нея конкретни експериментални задачи**, а именно да идентифицира секреторните естрацелуларни белтъци на ембриогенни суспензионни култури на *Dactylis glomerata*, да ги анализира в структурен и функционален аспект като визира и тяхното евентуално участие в отделните етапи на СЕ.

Разделът **Методи и материали** е много богат по съдържание. Той може да се раздели на две основни части: физиологична част /изходен растителен материал и получаване на ембриогенни клетки/ и специална молекулярно-биологична част, която включва цялата последователност на протеомния анализ /1D – нативна и SDS-PAGE, 2D електрофореза, мас-спектроскопски анализ и анализ на N-крайни групи на изолираните секреторни белтъци, както и получаване на кДНК чрез PCR, секвенционен анализ на кДНК, хетероложна експресия на кДНК клонове в *E. coli*, имунохимичен анализ посредством ELISA и имуноблотинг със специфични

моноклонални антитела. Изследването стартира от суспензионни клетъчни култури получени от ембриогенен /E1/ и неембриогенен /NE1/ калус. Калусът е получен съответно от ембрионален генотип листни експланти от базалната част на листа след развитие за 30 дни на твърда хранителна среда в присъствие на синтетичния ауксин 2-метокси-3,6-дихлорбензоена киселина /дикамба/. След суспендирането на калуса в течна хранителна среда, от него се получават различни по размер и степен на развитие суспензионни култури от клетки – глобуларни ембриоиди, проембрионални маси, микрокълъстери и единични клетки, които се събират чрез пресяване през сита с последователно намаляващ размер на порите. Интерес представлява въпроса - от кои от горните суспензионни култури и след какъв период от време са изолирани екстрацелуларните белтъци предмет на дисертационния труд, т.е от началото на СЕ /микрокълъстери и проембрионални маси/ или от по-крайните етапи на глобуларни ембриоиди? Т.е кои от резултатите се отнасят за микрокълъстери и кои за глобуларни ембриоиди? Този въпрос е важен в контекста на една от целите на изследването, а именно използването на определени екстрацелуларни протеини като специфични маркери за отделните фази на СЕ. Относно ембриогенния капацитет на листните клетки – каква е възрастта на интактното растение, донор на ембриогенния калус, т.е дали клетките в базалната част на листа са завършили своя растеж /деление и удължаване/ или се касае за млади листа със запазено клетъчно деление?

Разделът **Резултати и обсъждане** е огромен по своя мащаб и далеч надхвърля приетите изисквания за подобен род изследване. Той стартира с 2D електрофореза и анализ на 9 екстрацелуларни белтъка чрез MS анализ и N-крайно разграждане по Едман. Дисертантката определя 5 от тях като цистатин, 2 като катепсини, съответно В и L, 1 като хитиназа и последния с най-високо молекулно тегло /48 kDa/ като алфа-амилаза. Накратко, на базата на специфични праймери и двустъпална амплификация чрез PCR са получени пълноразмерни кДНКи за тези белтъци, последните са клонирани и секвенирани и първичната им подследователност е послужила за идентифицирането чрез биоинформативен анализ. На базата на този сложен анализ дисертантката определя първоначалните 9 секреторни белтъка като: 2 цистеинови протеинази /катепсин В и катепсин L/,

фитоцистатин /инхибитор на цистеиновите протеинази/, 2 ендохитинази /една от клас III и втората от клас IV/ и 1 алфа-амилаза. Всички белтъци имат N-краен сигнален белтък, характерен на секреторните белтъци. Раклеова продължава задълбочения анализ чрез експресия на съответните кДНК след трансформация в *E. coli*. Рекомбинантните белтъци са изолирани, пречистени и е показано, че фитоцистатина и алфа-амилазата са биологично активни. Накрая, но не по значение, дисертантката получава рекомбинантни моноклонални фагови антители срещу фитоцистатина, като използва човешка фагова библиотека за цистатин специфични клонове и последваща експресия на изолираните кДНК-клонове в *E. coli*.

В контекста на СЕ, от биологична гледна точка определен принос представляват данните за транзитна експресия на алфа-амилазата в клетъчната стена и в културалната течност на единични клетки и дялящи се микрокълстери до формирането на проембрионални структури. Този подход за изследване на диференциалната експресия на алфа-амилазата през различни стадии на СЕ чрез директна имунофлуоресценция може да бъде високо оценен и е пример за цялостан подход за изследваните белтъци.

От всички екстрацелуларни белтъци, фитоцистатинът е изследван най-пълно и несъмнено представлява основния принос на дисертационния труд. Чрез използване на възможностите на биоинформатиката и различни компютърни програми е направен анализ по домени на този белтък. На базата на компютърния анализ, дисертантката открива липокалинов домен, което ѝ дава основание да предположи транспортна функция на малки хидрофобни молекули от странана цистатина. Открити са домени за аминокиселини, хидрофобни домени за предполагаемо свързване с липидния бислой на мембаната /”закотвяне”/, аминокиселинни мотиви за предполагаемо формиране на димери и мултимери на цистатина. В края на дисертацията дисертантката предлага хипотетичен модел за участието на идентифицираните екстрацелуларни белтъци при СЕ на *Dactylis glomerata*, което представлява един модерен подход за завършване на такъв тип изследване и заслужава адмирация.

На базата на получените от десертантката резултати могат да се направят следните обобщения за по-важните научни приноси на дисертационния труд.

1. Депозирани са в GenBank на NCBI пълноразмерните кДНК секвенции на 6 екстрацелуларни белтъка от ембриогенни суспензионни куртури на *Dactylis glomerata* L. Това са инхибитора на цистеиновите протеази – фитоцистатин, който е показан за първи път, катепсин L и катепсин B, алфа-амилаза с предполагаеми клетъчно-адхезионни функции, ендохитиназа от клас III и ендохитиназа от клас IV.
2. Показано, че изолираният фитоцистатин притежава хетерогенен N-край, което го отличава от останалите фитостатини и предполага функция освен на инхибитор, но и на транспортен белтък.
3. Полученият за първи път от десертантката фитоцистатин показва най-висока инхибиторна активност в сравнение с други досега.

Резултатите от дисертацията са публикувани в 4 научни публикации – 1 в Zeitschrift fur Naturforschung (IF0.8), 1 в сп. Biotechnol. Biotechnol. Eq. (IF0.5), 1 в сп. Gen. Appl. Plant Physiol. и доклад от национална конференция отпечатан в пълен текст. Резултатите са добре апробирани на 9 международни научни форуми.

Представеният автореферат отразява правилно резултатите от дисертационния труд.

**Заклучение:** Най-общото впечатление от представения труд е много високото методично ниво на резултатите и техния брой, който далеч надхвърля съответните изисквания. Представените резултати са оригинални и несъмнено представляват принос в изучаването на явлението соматичен ембриогенез. Те са отлична основа за по-нататъшни изследвания в това интересно направление. С този си труд Горица Веселинова Раклеова се представя като изграден изследовател с много добра методична подготовка и солидни биологични знания в съвременната молекулярна биология на растенията. Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на уважаемото Научно жури да присъди исканата образователна и научна степен „Доктор” на Горица Веселинова Раклеова.

София, 05.05. 2012 г.

Изготвил рецензията:

/доц. д-р Евгени Ананиев/