

## РЕЦЕНЗИЯ

от д-р Иван Генов Пищийски, професор, УХТ, Пловдив, пенсионер

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'

в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика  
професионално направление 4.3 Биологически науки  
докторска програма Клетъчна биология

**Автор:** Джемал Ахмед Мотен

**Тема:** Използване на специфични клетъчни макромолекули за филогенетично моделиране при цианобактерии.

**Научен ръководител:** проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов, ПУ, гр. Пловдив

### 1. Общо описание на представените материали

Със заповед Р 33 – 1440 от 13.04.2017 на Ректора на ПУ "Паисий Хилендарски" съм определен за член на жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема "Използване на специфични клетъчни макромолекули за филогенетично моделиране при цианобактерии" за придобиване на образователната и научна степен "доктор" в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки; докторска програма Клетъчна биология. Автор на дисертационния труд е Джемал Ахмед Мотен, редовен докторант към катедра "Биология на развитието" с научен ръководител проф. д-р Балик Джамбазов от ПУ.

Представеният от докторанта Джемал Мотен комплект материали на хартиен носител е в съответствие с Чл. 36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва 17 документа, които са необходими за разкриване на процедура за защита на дисертационния труд. Те са надлежно описани в молбата на докторанта до Ректора на ПУ.

Докторантът е приложил 3 броя публикации.

### 2. Кратки биографични данни за докторанта

Докторантът Джемал Ахмед Мотен е завършил бакалаврска степен по Биоинформатика в ПУ "П. Хилендарски" през 2011 г., след което продължава обучението си и завършва магистърска степен по Медицинска биология в същия ВУЗ. От март 2015 г. е редовен докторант. Знанията и уменията, които е придобил са отлична основа за разработката на дисертационния труд, което се потвърждава и от нейния завършен вид.

### 3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Цианобактериите са организми, които съчетават в себе си структурните елементи на прокариотната клетка и на част от органелите на растителната. Тази тяхна двойствена природа, дългият им и сложен еволюционен път и голямото им биологично разнообразие съз-

дават сериозни проблеми при тяхната класификация. През дълъг период от време те се подреждат по две номенклатури – едната за водорасли, гъби и растения, а другата за прокариоти. Понастоящем тяхната таксономия е в процес на реорганизация, като приетите принципи за нея се основават на полифазния подход. При него водеща роля имат молекулярно - генетичните маркери, които се съчетават успешно с цитоморфологични, ултраструктурни, биохимични и екофизиологични показатели. С оглед постигането на по-точна и прецизна класификация наред с класическия вече маркер на гена за 16S рРНК се предлагат и тестват и други гени, подходящи за родово и видово детерминиране. Тяхното разнообразие непрекъснато расте, което е гаранция за по-качествена и стабилна таксономия на тези организми. Във връзка с това считам, че целта, която си поставя този научен труд напълно се вписва в разрешаването на настоящите проблеми по реорганизацията и преустройството на цианобактериалната класификация. Поставените конкретни задачи за постигане на целта са добре обмислени и формулирани. Последователното им подреждане е подчинено на идеята всяка предна задача да създава предпоставки за успех на следващата, а цялостното им реализиране да има силно позитивен характер.

#### **4. Познаване на проблема**

Съвременните информационни средства и технологии предоставят богати възможности за едно мащабно издирване на съществуващите литературни източници по даден проблем. В това ни убеждава и докторантът. Неговият обзор включва 125 източника, от които над 65 % са след 2000 - та година. Най-старият от тях е от 1875 година. Това не е случайно. Съществуването на цианобактериите е от преди милиарди години, а появата на по-модерни технически средства дава възможност да се надникне в света на микробите и те да започнат усилено да се изучават. Като фиксира стартова позиция на опитите за таксономия на цианобактериите в периода 1875-1892 г. докторантът умело ни превежда през лабиринта от класификации, почиващи на едни или други критерии, имащи едни или други позитиви и негативи. Така той стига до съвременните тенденции в подреждането на тази група уникални организми, за което е необходимо да се съчетаят широк набор от критерии, в основата на които стои генетичната оценка, която формира базата за таксономия. Молекулярно-генетичните методи за опознаване на видовото разнообразие и тяхното подреждане нямат алтернатива. Създаването на условия за секвениране на целите геноми е следващата скъпа, но заслужаваща усилията стъпка в перспективна посока.

Целият обзор е написан много увлекателно, като се използва много изчистен, терминологично издържан език, който позволява кратък, точен и разбираем изказ. От включените източници е подбрано най-същественото, без излишно детайлизиране. Това означава отлично познаване на материята и генетично вродена способност да предложиш и изложиш нейната квинт есенция.

## 5. Методика на изследването

Поставената в дисертацията цел предопределя естеството на методите, които се прилагат. Това са молекулярно-генетични техники - PCR амплификация на гени и тяхното секвениране, конструиране на специфични таймери. Те изискват изключително прецизна работа, тъй като се работи с микро, нано и пико количества. Изолирането на чиста ДНК и на пречистени PCR-продукти е свързано с електрофоретични методи с висока разделителна способност. Не липсва и класиката, която присъства при култивирането на цианобактериалните щамове. Съществена част от изследванията се провежда с помощта на специализирани софтуерни продукти или ръчно на компютър, с възможно най-добра конфигурация. Тази част все още не се приема като чисто експериментална, но без нея нямаше да бъдат селектирани оригиналните протеинови маркери, нито да се проверят възможностите на 5S рРНК. Цялата тази дейност не означава само натискане на клавишите на клавиатурата, а изисква отлично владение на принципите и методите на биоинформатиката, които докторантът явно перфектно е усвоил.

## 6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е от 100 страници и е онагледен с 31 фигури и 4 таблици. Неговите отделни части са съизмерими една спрямо друга, като техният обем е много добре балансиран в зависимост от същността и значението на всеки раздел за цялостното оформяне и представяне на научната разработка.

Изследователската работа на докторанта може условно да бъде разделена на две части. Първата бих означил като експериментална. В нея, след избора от колекцията (РАСС) на катедра " Ботаника и Методика на обучението по биология" при ПУ на 13 алгологични чисти култури от различни родове, повечето от които с проблематична таксономия, се провежда тяхното култивиране и от получената биомаса се изолира чиста ДНК. Тя се използва за амплификация и секвениране на гените с информация за 16S рРНК, за *srcBA-IGS* региона, за външния мембранен ефлукс протеин(OMEP) и за светлинно-инхибиращия протеин(LRP). По този начин ас. Джемал Мотен разполага със собствени, достоверни експериментални данни, получени в "домашни" условия, които ще бъдат тествани в следващия етап на разработката.

Съвременното развитие на биологическите науки премина на нов етап. По-голяма част от протичащите в живата природа процеси изискват молекулярно-генно ниво за изясняване на техните механизми и същност, в оформянето на различни типове класификации и номенклатури. В това ни убеждава и аналитична част от дисертационния труд.

Таксономията на цианобактериите има многогодишна история. Основен критерий за тяхното подреждане са морфологичните им особености, но постепенно се включват и други показатели, защото бактериалната клетка на тези организми включва и органели, присъщи на растителните видове. Двойствената им природа принуждава учените да използват ботанични и бактериологични характеристики, за да бъдат класифицирани. В последните години основен

и най-важен критерий се явява първичната структура на различни молекулярно-генетични маркери. Водеща позиция в това отношение има генът за 16S рРНК. За да ни убеди в ефикасността и надежността на този маркер докторантът сравнява данните от получените 5 секвенции за 16S рРНК на представителите от университетската колекция с подобни секвенции на добре дефинирани представители от родовете *Phormidium*, *Lyngbya*, *Leptolyngbya*, *Nodosilinea*, *Phormidesmis* и *Wilmottia*, информация за които се съхранява в GenBank. След обработка на съществуващите данни с помощта на 4 различни метода, чрез които се гарантира висока достоверност, се построяват филогенетични дървета. В резултат на техният анализ се установява, че преобладаващата част от включените представители на родовете формират отделни кледи с висока степен на поддръжка, което потвърждава родовата им принадлежност. Не липват обаче и отклонения. Съвкупността от тази информация и от допълнителната такава за филогенетичната връзка на родовете *Phormidium* и новосформираните *Phormidesmis* и *Wilmottia* дават основание на докторанта да подкрепи или оспорва предложените от други автори изменения в таскономията на част от родовете. Тези анализи показват достойнствата на 16S рРНК като молекулярно-генетичен маркер, но не и неговата универсалност, особено на подродово ниво. Недостатъчно надежден се оказва и генът на локуса *srcB-IGS-srcA*. Всички тези обстоятелства са достатъчно основание за докторанта да насочи своите усилия към търсене на нови, достатъчно надеждни молекулярно-генетични маркери за филогенетично базирана класификация на цианобактериите на родово и подродово ниво. Използвайки възможностите на съвременните информационни технологии, в частност на биоинформатиката, с помощта на различни софтуерни програми и на много ръчна обработка ас.Мотен анализира данните за съществуващите пълни цианобактериални геномни секвенции и селектира няколко клетъчни протеина. Първият от тях е външният мембранен ефлукс протеин, познат като ОМЕР. Като използва същата схема за работа, както при 16S рРНК и данните за ОМЕР от 82 вида/щамове с напълно секвенирани геноми, докторантът установява, че преобладаващата част от цианобактериалните видове/щамове се групират според тяхната таксонометрична принадлежност към съответния род. Изключенията, при които се групират видове от различни родове са намерили своето приемливо обяснение.

За да се убеди в достойнствата на ОМЕР, като генетичен маркер, докторантът прилага спрямо анализиранияте 82 вида/щамове същата процедура, но с данни за маркера 16S рРНК, приет до известна степен като стандарт. Сравняването на резултатите от двата филогенетични анализа показва, че ОМЕР е по-подходящ маркер за подреждане на цианобактериите на родово и подродово ниво. В подкрепа на този извод ще отбележа, че обхватът на анализиранияте фрагменти включва от 350 до 792 аминокиселини, което означава над 2000 нуклеотидни последователности – една доста широкообхватна извадка.

Следващият кандидат за слава е светлинно-инхибиращият протеин(LRP). Макар и слабо проучен, той се оказва много подходящ молекулярно-генетичен маркер, като подрежда анализираният видове в много ясно отдиференцирани клади, съставени от представители на определен род. Освен това той позиционира цианопрокариотните щамове по-ясно и по-изчистено, в сравнение с подреждането при секвенирането на 16S рДНК.

Третият белтък, включен във филогенетичните анализи, е цианопорин. Той обаче определено се оказва неподходящ избор, тъй като, след анализа с наличните за него данни, представители от различни родове и разрези се смесват в общи клади.

Воден от максимата, че колкото повече надеждни и стабилни маркери се прилагат в таксономията на цианобактериите, толкова по-прецизна ще бъде тя, докторантът разширява филогенетичните си анализи, като включва в тях и генът на 5S рРНК и нейната вторична структура. Размерът и масовото ѝ разпространение, лесното им секвениране са предимства, които я правят достоен кандидат за филогенетичен маркер. Получените резултати напълно оправдават положените усилия, като показват едно много по-изчистено подреждане в групи на анализираният видове, в сравнение с паралелните анализи за 16S рРНК. Установява се също, че части от вторичната структура на 5S рРНК могат да бъдат много полезни допълнителни маркери при подреждането на цианобактериите и тяхното разграничаване на родово и подродово ниво.

Накрая ще отбележа, че е направен успешен опит за валидиране на новоселектираните молекулярно-генетични маркери с щамове от РААС, но се потвърждава и необходимостта от разширяване на базата данни за ОМЕР и LRP, за да се провеждат по-задълбочени филогенетични анализи.

Заклучителната дискуссионна част показва уменията на докторанта да анализира получените от него резултати, да ги разглежда в светлината на известните до момента факти, по отношение на спорната за някои бактерии таксономия и да заема съответната позиция. Без да игнорира достойнствата на 16S рРНК, като генетичен маркер, той ни убеждава, че селектираните от него протеини ОМЕР и LRP могат да бъдат много подходящи маркери при съвременната модерна таксономия на цианобактериите, основана на полифазния подход.

## **7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката**

Протичащата в момента реорганизация на класификацията на цианобактериите изисква усилията на много учени, за да бъде завършена успешно и бъде постигнато високо ниво на нейната надеждност. Със своите изследвания докторантът допринася за постигането на тази нелека цел. Неговите приноси имат своя оригинален и потвърдителен характер.

1. За първи път е установено, че протеинът ОМЕР може да бъде ефикасен молекулярно-генетичен маркер за изясняване на филогенетичните връзки при цианопрокариотите на родово и видово ниво.

2. За първи път е доказано, че и светлинно-инхибираният протеин може да изпълнява функцията на филогенетичен маркер за полифазна таксономия на цианобактериите на родово и подродово ниво.

3. За първи път е доказано, че генът за 5S рРНК и специфични позиции във вторичните структури на тази нуклеинова киселина могат да се използват като допълнителен маркер при филогенетичните анализи на цианопрокариоти с напълно секвенирани геноми.

4. Потвърдена е коректността в самостоятелното отделяне на родовете *Nodosilinea* и *Wilmottia* от родовете *Leptolyngbya* и *Phormidium*.

5. Потвърдена е таксономията на видовете *Nodosilinea bijugata*, *Phormidium papyraceum* и *Phormidium molle*.

### **8. Преценка на публикациите по дисертационния труд**

Наличието на достатъчно интересни научни резултати в дисертацията, с преобладаващо оригинален характер, е позволило на докторанта да оформи 3 научни статии. Първата от тях е публикувана в *Evolutionari Bioinformatics* с IF - 1,452, втората е приета за печат в Доклади на БАН-*Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, също с импакт фактор. Приложена е служебна бележка, удостоверяваща приемането за печат. Третата статия е приета за печат в *Phycological Research*, но с условие за допълнителна корекция. Всички статии са на английски език. В две от тях докторантът е водещ автор, а в една е на втора позиция. По този начин изискванията на Биологическия факултет се покриват напълно.

### **9. Лично участие на докторанта**

Всеки млад учен, който тръгва по трудната пътека на научното дирене е необходимо да бъде подкрепян, за да добие нужния експериментален опит и самочувствие за самостоятелна работа. Вероятно този етап на развитие изминава и докторантът, което става ясно от изказаните благодарности към хората, които са го подкрепяли. Но този дисертационен труд едва ли би се реализирал толкова успешно, ако личното участие на ас. Мотен не е водещо. Освен това естеството на голяма част от изследванията предопределя самостоятелната работа на докторанта насаме само с компютъра. Неговият статут на редовен докторант му е позволил да се занимава изключително с научна работа. Участието на негови колеги в изпълнението на отделни задачи е било от взаимна полза, което личи от авторските колективи на публикуваните статии.

### **10. Автореферат**

Авторефератът е оформен съгласно изискванията и включва по-голяма част от резултатите, всички изводи и приноси във връзка с дисертацията и част от литературните източници. От него може да се добие достоверна и пълна представа за извършените изследвания.

## 11. Критични забележки и препоръки

От изложението дотук в рецензията личи моето изцяло положително отношение към дисертационния труд. Нямам критични бележки, а само някои доуточняващи въпроси.

1. На стр. 29 в края на точка 4.3 е записано, че пречистените продукти – 16S рРНК и *srcBA-IGS* са изпратени за секвениране. Получавани ли са такъв вид пречистени продукти?

2. На фигури от 19 до 23 в обяснителния текст е посочено, че анализът включва 35 аминокиселинни секвенции, а на стр. 34 в Материали и методи техният размер е от 190 до 220. Коя е причината за това разминаване?

## 12. Препоръки за бъдещо използване

Считам, че едва ли е нужно да давам конкретни препоръки, защото съм убеден, че получените оригинални резултати ще намерят по естествен път своето приложение за усъвършенстване на таксономията на цианобактериите чрез полагане на здрава филогенетична основа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд *съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката* и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ "Паисий Хилендарски". Представените материали и дисертационни резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания на Биологическия факултет, приети във връзка с Правилника на ПУ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантът Джемал Ахмед Мотен **притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност Клетъчна биология, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, давам убедено своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено по-горе от дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен "доктор"** на Джемал Ахмед Мотен в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки; докторска програма Клетъчна биология

03.05 2017 г.

Изготвил рецензията:

(проф. д-р Иван Пищийски)