

РЕЦЕНЗИЯ

От: **проф. Искра Витанова Иванова, дбн**

Относно: оценка на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен “Доктор” по област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, докторска програма „Биохимия“

Със заповед № РД-21-2469 от 18.12.2023 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определена за член на научното жури.

Автор на дисертационния труд: **Станимира Ангелова Ангелова**

Заглавие на дисертационния труд:

„ИЗСЛЕДВАНЕ СВОЙСТВАТА НА БИОИНЖЕНЕРНИ АЛФА-D-ГЛЮКАНИ, СИНТЕЗИРАНИ ОТ МУТАНТНА ГЛЮКАНЗАХАРАЗА URE 13-300“

Научен ръководител: **проф. д-р Илия Илиев**

1. АКТУАЛНОСТ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТВАНИЯ ПРОБЛЕМ

Групата от глюканзахаразите, които са отговорни за синтезата на глюкановите полимери са класифицирани в семейството на гликозид хидролазите 70 (GH70). Глюкановите полимери се различават по размер, тип връзки и степен на разклоняване. Тези характеристики влияят върху физико-химичните свойства на полизахаридите. Според типа на α -гликозидните връзки в полимерите, синтезирани от глюканзахаразите, се различават: глюкан, мутан, реутеран, декстран и алтернан. Молекулната организация на глюканзахаразите е доменна, като в каталитичния домен се различават пет различни района, притежаващи допълващи се функции в хода на глюкановия или олигозахаридния синтез – А, В, С, IV и V. В последните години са направени множество изследвания с аминокиселинни замествания чрез сайт-насочен мутагенез, доказващи функцията на различни аминокиселини, разположени в или около каталитичния център на глюканзахаразите, които са ключови за ензимната активност и типа на връзките между глюкозните остатъци в съответните глюкани. Методът сайт-насочен мутагенез (SDM) включва въвеждането на т. нар. точкови мутации, при които дадена аминокиселина при

предварително определено място в белтъчната молекула се заменя с една от другите 19 аминокиселини. Необходимо условие е наличието на достатъчно богата база данни за структурните особености на съответното ензимно семейство. Също така, разбирането за ензимния каталитичен механизъм повлиява точността и степента на успех на рационалния дизайн. Задълбоченото разбиране на молекулярните аспекти отваря нови пътища за проектиране на стратегии за метаболитно инженерство на микробни гостоприемници и инженерство на биокатализатори, впоследствие постигане на по-висок добив на EPS и намаляване на производствените разходи.

Всичко това ми дава основание да оценя като актуална представената научна разработка, с потенциал за научни постижения, които да имат бърза практическа реализация.

2. ОБЕМ И СТРУКТУРА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Дисертацията е изложена на 157 стандартни страници текст. Спазена е общоприетата схема и препоръчителните съотношения между отделните части на труда, както следва: *Въведение* – 1 стр.; *Литературен обзор* – 31 стр.; *Цел и задачи* – 1 стр.; *Материали и методи* – 14 стр.; *Резултати и обсъждане* – 51 стр.; *Дискусия* - 1 стр.; *Изводи* - 1 стр. Получените резултати са илюстрирани с 37 фигури, 5 таблици, 12 приложения и 175 литературни източника.

3. ЛИТЕРАТУРНА ОСВЕДОМЕНОСТ И ПОСТАНОВКА НА ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ

Настоящата дисертация е комплексна и предполага добро познаване на литературните източници и методите за решаването ѝ. Докторантката е направила обстоен преглед на постиженията на други изследователи, които е успяла да предаде и анализира върху 31 страници в литературния обзор. Обзорът представя детайлно състоянието на проблема и доказва необходимостта от разработването на дисертационната теза. Литературният обзор се състои от четири раздела. В общата характеристика на глюканзахаразите (GS), наричани още гликозилтрансферази (ГТФ), са представени данни за екстрацелуларни ензими, които в присъствие на захароза, катализират синтезата на глюкозни полимери, наречени глюкани. Характеризирани са различните глюкани. Представена е информация за каталитичния механизъм на синтеза на глюкановите продукти и глюканзахарази с два каталитични домена. В следващите раздели последователно и подробно са описани структурната и функционална

организация на глюканзахаразите и значението на сигналния пептид, и N-терминалния домен както и глюкан–свързващия домен V. Докторантката представя в разработката си влиянието на мутациите в гените кодиращи глюканзахаразите от семейството GH70. Тези мутации имат ефект върху ензимната активност и върху измененията в структурата на глюканите и олигозахаридите. Дискутирани са мутации с промяна в разтворимостта на синтезирания полизахарид и инженеринг на полизахарид с контролирана дължина, както и тяхното влияние на разклоняващите захарази. Приложението на алфа-глюканите и олигозахаридите е дискутирано.

Литературният обзор е конкретен, структуриран е правилно, следва логическата обвързаност на информацията. Данните от справката са послужили за ясното и правилно определяне не само на целта, но и за формулировката на задачите. Поставени са за решаване добре обосновани 7 експериментални задачи.

Литературата (както в обзора, така и в целия труд) е тясно свързана с темата на дисертационния труд. Литературният списък включва внушителния брой от 175 заглавия на латиница. Те са основно от последните години. Това говори за отлична теоретична осведоменост на докторантката и с цел намиране на ново научно предизвикателство.

4. ОЦЕНКА НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ МЕТОДИ И МАТЕРИАЛИ

Разделът "Материали и методи" демонстрира внушителен набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експериментите. Те са съвременни и адекватни за реализацията на дисертационния труд. Описани са точно и подробно, като изцяло покриват многостранните области на работата: от класическите до модерните изследвания. Използвани са микробиологични и биохимични методи, включващи определяне на ензимна активност, полиакриламидна електрофореза и др. Проведен е ензимен синтез и анализ на α -глюкани, синтезирани от мутантна глюканзахараза U13M1, като и пречистване на синтезирания полизахарид и ЯМР анализ на α -глюкан, синтезиран от мутантна глюканзахараза U13M1. Авторката използва ензимен синтез на олигозахариди с HPLC анализ на получените олигозахариди. Проведен е анализ на ензимни реакции в присъствие на малтоза като акцептор в присъствие на органични разтворители. Молекулярно-биологични методи и биоинформатичен анализ включват изолиране на плазмидна ДНК от рекомбинантни клетки *E. coli* BL21, провеждане на сайт-насочен мутагенез, основан на биоинформатичен анализ и изграждане на хомоложен модел. Сайт-насоченият мутагенез е основан на сравняването на аминокиселинната последователност на URE 13-300 с други глюканзахарази, което е

извършено чрез уеб-базираните инструменти Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), Pairwise Sequence Alignment (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>) и ESPript v3.0. (<https://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>). За потвърждаване на правилната аминокиселинна замяна е извършено секвениране на частта от гена на URE 13-300, в която се намира мутацията.

Всичко това ми позволява да дам висока оценка на научното ниво и на отличната подготовка на докторантката, която успява правилно да съчетае многообразие от класически със съвременни методи за целите на дисертацията, успешно решавайки поставените експериментални задачи.

5. ОЦЕНКА НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ

Целта на настоящата дисертация е да се изследва взаимовръзката на структурата на синтезираните глюкани и промяната на аминокиселинната последователност на каталитичен домен 1 на глюканзахараза URE 13-300 чрез сайт-насочен мутагенез.

Раздел „*Резултати и обсъждане*“ е добре структуриран, подкрепен с табличен и графичен материал, с подходяща интерпретация на получени резултати от чужди научни колективи. Авторката последователно представя доказателствен материал по своята научна теза, като по този начин логически финализира експериментална работа. Извършена е голяма по обем и разнообразна експериментална работа в рамките на комплексно биохимично изследване. Ангелова изследва продължителността на култивиране с цел оптимизиране времето за постигане на максимална продукция на глюканзахараза URE 13-300 и влиянието на органични разтворители върху активността на глюканзахараза URE 13-300. С цел установяване техният ефект на хетерогенна среда върху активността на глюканзахараза URE 13-300 са изследвани девет органични разтворителя. Изследвани са различни органични разтворители върху трансферазните реакции в присъствието на малтоза като акцептор. Стойностите на K_m и V_{max} са изчислени чрез уравнението на Михаелис-Ментен, използвайки нелинейния регресионен подход. Органичните разтворители имат ефект върху степента на полимеризация на глюкоолигозахаридите, синтезирани от глюканзахараза URE 13-300. Получените резултати показват, че синтезът на олигозахариди в резултат на трансферазната реакция не се повлиява значително в хетерогенна среда с 5% или 20% ДМСО, n-хексан и октанол. Проучено е и влиянието на три монотерпеноидни съединения от етерични масла карвакрол, тимол и ментол върху общата активност на гликозилтрансфераза URE 13-300. Заедно с модификацията на съотношението акцептор: донор, добавянето на различни

органични разтворители към трансферазната реакция може да се окаже подходящо за по-нататъшни приложения за персонализирани продукти. Някои от тези разтворители оказват влияние върху синтеза на олигозахариди по време на трансферазната реакция към GOS с по-висока степен на полимеризация, като не инхибират трансферазната реакция. Гликозилирането на терпеноиди, производни на етерични масла като ментол, могат да бъдат включени в моделирането на хранителни добавки с добавена стойност. Особено важни са изследванията във връзка със сайт-насочения мутагенез в гена, кодиращ глюканзахараза URE 13-300. В първата стъпка за получаване на молекулярен мутант със замяна на една аминокиселина е извършен подробен биоинформатичен анализ. Аминокиселинната секвенция на глюканзахараза URE 13-300 е сравнена с тези на някои изучени глюканзахарази, подложени на мутация. Идентифицирани са седем консервативни мотива, съдържащи важни аминокиселини за специфичността на връзките в синтезираните продукти. След преглед на ефектите, получени в следствие на аминокиселинна замяна в някои от посочените ензими, е избрана аминокиселината глицин, намираща се на позиция 449. Тази позиция не е строго запазена в тях, но се появява най-често при анализа на множество секвенции. От получените резултати, от проведеният *in situ* анализ е доказано, че двете форми на глюканзахараза URE 13-300 показват еднакви ивици, около 300 kDa. Замяната само на една аминокиселина не довежда до видима промяна в молекулното тегло, следователно вследствие на проведената мутация не са настъпили допълнителни промени в аминокиселинната последователност на ензима. На основата на получените резултати са оптимизирани условията на получаване на мутантна глюканзахараза U13M1 и условията на ензимната реакция. Полученият мутантен ензим U13M1 притежава забележителна промяна в кинетичните параметри в сравнение с изходния тип глюканзахараза URE 13-300. Стойностите на K_m за мутантен ензим U13M1 са почти 7 пъти по-високи от тези на изходната глюканзахараза, като същевременно се запазва идентичната максимална скорост. Намаленият афинитет към субстрата, може да се дължи на промяна във формата на свързващия сайт в мутантния ензим. В съответствие сполучените резултати, мутантни форми на глюканзахараза GTF180-ΔN показват повишен K_m за захароза. Оптимумът на рН на U13M1 се измества с една единица по-високо от изходния тип ензим – до 6.5. След аминокиселинното заместване с лизин, температурният оптимум на U13M1 се измества при 20°C. Такива разлики в оптималните условия между изходния и мутантен ензим не са докладвани преди това. Последващите изследвания са върху структурата на α-глюкан и олигозахариди, синтезирани от мутантна глюканзахараза U13M1. При използване на

20% захароза (оптималната субстратна концентрация за мутантния ензим) полизахаридът, синтезиран от мутантния ензим U13M1 показва намалено съотношение на α -(1 \rightarrow 3)/ α -(1 \rightarrow 6) гликозидни връзки с около 30% в главната верига в сравнение с изходния тип глюкан. От своя страна, модулираната структура влияе върху специфичните физикохимични свойства на полимера и неговото приложение като носител на биологично активни вещества. Повишено е количество на α -(1 \rightarrow 3) гликозидните връзки в полимера, когато той се синтезира в присъствие на 10% захароза. Полимерът U13M1 е запазил свойството на неразтворимост във вода, което е интересно в светлината на повишеното количество на α -(1 \rightarrow 6) връзките в неговата структура. Тази успешна мутация на глюканзахараза URE 13-300 в цялост, без скъсяване дължината на гена, е база за изучаване на взаимодействието между двата каталитични домена, действащи съответно като декстранзахараза и разклоняваща захараза.

Получените резултати представени в „Резултати и обсъждане”, логично следват хода на решаването на поставените задачи. Те са обобщени и дискутирани в светлината на публикуваните данни от последните години. Висока оценка заслужават както идеята, така и обемът от изследвания проведен по изпълнението на тази задача и в целия труд. Направената дискусия по всеки експеримент, съпоставката на резултатите и съпоставката с литературните данни, още веднъж подчертава качествата на докторантката във владенето на експерименталната теория. С това тя доказва, че е овладяла напълно третата степен на обучението си и е завършен експериментатор.

6. ПРИНОСИ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТКАТА ЗА НАУКАТА И ПРАКТИКАТА, ЗАБЕЛЕЖКИ И ВЪПРОСИ

Приемам направените приноси.

За особено значими считам представените данни за сайт-насочения мутагенез, чрез който за първи път е осъществена мутация на глюканзахараза URE 13-300 при замяна на глицин на 449-та позиция с лизин, и за първи път е осъществен сайт-насочен мутагенез на глюканзахараза, съдържаща два каталитични домена без да бъде редуцирана дължината на гена, което се демонстрира с повлияване на цялостната 3D структура на протеина и неговите каталитични свойства.

Ангелова е автор в 3 научни публикации, като в две от тях е водещ изследовател и шест участия в научни форуми, което показва творческата и изследователската ѝ активност при изработването и оформянето им. Докторантката успешно участва в 6 научно изследователски проекта. Ангелова има специализация в Центъра по синтетична

биология към Департамента по Биотехнология на Университета в Гент, Белгия, за периода 01.09. – 31.10.2022 г. Тема на работата: Получаване на библиотеки с мутанти чрез сайт-насищащ мутагенез.

Към дисертанта имам няколко въпроса:

- ✓ Какви методи и техники се използват при пречистване на глюканзахаразите?
- ✓ Какви фактори влияят на каталитичната активност на глюканзахаразите и каква е ролята на калция? Какви са най-известните химични инхибитори на този ензим?
- ✓ Кои са най използваните методи за анализ на структурата на екзополизахаридите?
- ✓ Какви нови техники за генетична манипулация допринасят за напредък в механизмите на синтеза на екзополизахаридите?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Темата е актуална, докторантката е усвоила съвременни методи, експериментите са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Открояват се изключително оригинални научни и приложни приноси. Въз основа на гореизложеното уверено мога да заявя, че рецензията дисертационен труд представлява оригинална научна разработка, с теоретично и приложно значение. Предложената дисертация е доказателство, че Ангелова е развила компетентности, необходими за присъждане на образователната и научна степен „доктор“, включващи теоретична подготовка, методологични познания, самостоятелност и опит за планиране на експерименти и способност за анализ на резултатите.

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“, поради което давам своята висока оценка и препоръчвам на членовете на научното жури да присъдят на **Станимира Ангелова Ангелова** образователната и научна степен „**Доктор**“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма „**Биохимия**“.

15.02.2024 г.

Рецензент:

Проф. дбн Искра Иванова