

# РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд  
за придобиване на образователната и научна степен **„доктор“**  
в професионално направление "4.1 Физически науки",  
научна специалност "01.06.08 Биофизика",  
по процедура за защита във Физически факултет (ФзФ)  
на Софийски университет „Св. Климент Охридски“ (СУ)

Рецензията е изготвена от проф., дбн Стефка Германова Танева, Институт по биофизика и биомедицинско инженерство - БАН, член на научното жури съгласно Заповед № РД 38-661 / 16.12.2022 г. на Ректора на Софийския университет.

**Тема на дисертационния труд:** "РАЗРАБОТВАНЕ НА ФИЗИЧЕСКИ МОДЕЛИ НА ИМУНОАКТИВНИ МОЛЕКУЛИ"

**Автор на дисертационния труд:** Елисавета Любомирова Миладинова

## Данни за кандидата

Елисавета Любомирова Миладинова има бакалавърска степен по биология и химия, придобита през 2007 г. в Биологическия факултет на СУ "св. Климент Охридски", а през 2009 г. завършва магистратура по медицинска химия в Химически факултет на СУ "св. Климент Охридски". От 2014 г. е докторант в катедра Атомна физика към Физически факултет на СУ, научна специалност биофизика. Работила е като химик в Института по молекулярна биология – БАН и Национален институт за вино и спиртни напитки. Изследователската ѝ работа е свързана със синтез и анализ на биологични активни пептиди, и физико-химични изследвания на вино и спиртни напитки.

Участвала е в обучение по Оперативна програма "Развитие на човешките ресурси", проект "Младите учени – потенциал за развитие на науката и технологиите в областта на молекулярната биология". Специализирала е в Института по фармацевтични науки, Университет Карл-Францес, Грац, Австрия през 2010 г., и в Медицинския университет във Виена, Австрия през 2017 и 2018 г.

Член е на българското пептидно дружество и Institute for Systems and Technologies of Information, Control and Communication.

## Актуалност на проблематиката

Дисертационният труд е посветен на: (1) създаването на компютърен модел на хормон – рецепторен комплекс, който да позволи детайлно разбиране на механизма на взаимодействие между човешкия хормон окситоцин и неговия рецептор, определяне на местата на свързване и конформационните промени, предизвикани от свързването на лиганда; и (2) детайлно проучване на механизма на взаимодействие между цитокина интерферон гама и неговия извънклетъчен

рецептор IFN $\gamma$ R1 с помощта на компютърни симулации; изясняване на ролята на C-края на цитокина при взаимодействието му с рецептора, и на ролята на гликозаминогликана хепаран сулфат, като помощна молекула, в процеса на свързване между интерферон гама и неговия клетъчен рецептор.

Актуалността на дисертацията е безспорна, тъй като окситоцин е регулатор на имунната система и има защитни функции в организма, свързани с повишаване на производството на противовъзпалителния цитокин интерферон гама по време на вирусни или бактериални инфекции. От друга страна, инфекции на пикочо-половата система могат да доведат до преждевременно раждане и взаимодействието на интерферон гама с неговия извънклетъчен рецептор има ключова роля за спиране на инфекцията, а механизмът на това взаимодействие не е изяснен на молекулно ниво.

### **Обща характеристика на дисертационния труд**

Дисертационният труд е в обем от 137 страници, съдържа 58 фигури и 1 таблица. Библиографията е съставена от 184 литературни източника.

Структурата и биологичните функции на човешкия хормон с пептидна структура окситоцин, който действа като невротрансмитер в мозъка и хормонално върху периферните тъкани; и на окситоциновия извънклетъчен рецептор (трансмембранен протеин от групата на G-протеините); основният път на предаване на извънклетъчния сигнал към вътреклетъчните мишени след свързването на лиганда (агонист) към рецептора; ролята на метални йони като посредник за свързването хормон-рецептор, и образуването на стабилни комплекси окситоцин-метални йони са подробно описани в първа глава на дисертацията.

Втората глава на дисертацията представя основните подходи за компютърно моделиране на биологични макромолекули, разработване на физически модели на имуноактивни молекули, симулации на молекулна динамика, и анализ на взаимодействието лиганд-рецептор. Детайлно са описани методите на молекулна динамика; най-често използваните алгоритми за минимизиране на енергията на системата в молекулната динамика, налагане на периодични гранични условия и т.н.; хомоложно моделиране; молекулен докинг; MM – PBSA подход и Bonanza алгоритъм използвани за анализ на лиганд – рецепторни взаимодействия; метод за намиране на подходящи структури за темплейти и секвенционно подравняване с помощта на програми за подравняване на последователности, като например BLAST (Basic Local Alignment

Използвани са Софтуерен пакет за молекулна динамика GROMACS (Groningen machine for chemical simulations) и Софтуерен пакет за хомоложно моделиране MODELLER.

Литературният обзор (първа и втора глава на дисертацията) е написан стегнато и показва познаване в детайли на разработваната тема.

Резултатите от проведените изследвания са представени в глави 3, 4, 5 и 6, и обобщени в Заключение.

### **Публикувани статии и цитирания**

Публикувани са три статии по дисертационния труд, една от тях в списание с импакт фактор (IF 6.208, квантил Q1). Елисавета Любомирова Миладинова е първи автор в трите публикации, което показва личния ѝ принос. Материали от дисертационния труд са представени с доклади на национални и международни конференции.

### **Научни постижения и приноси на дисертационния труд**

В дисертацията са получени нови оригинални резултати:, които могат да се обобщят по следния начин:

Определена е стабилността на комплекса окситоцин-двувалентен цинков йон във воден разтвор с помощта на молекулно - динамични симулации, проведени със софтуерния пакет GROMACS 5.0.7. Сравнена е конформационната динамика на пептидния хормон в разтвор без и с цинков йон. В изградения модел на комплекса окситоцин-двувалентен цинк се наблюдава характерна за физиологично активната форма на хормона ориентация на аминокгрупата на N-края, а свързването на  $Zn^{2+}$  с окситоцина променя пространственото разположение на страничните вериги в пептидната молекула в подходящо за свързването му към рецептора. Изследването на ригидността на изградения комплекс представя доказателство за стабилизирането на пространствената структура на хормона под влиянието на двувалентения цинков йон. (Глава 3)

С помощта на метода хомоложно моделиране е изграден триизмерен модел на окситоциновия рецептор, пространствената структура на който не е известна. Като най-близък хомолог на окситоциновия рецептор е избран говежди родопсин с PDB ID 1JFP. От конструирания модели е избран този с най-ниска стойност за молекулната функция (molpdf) на Modeller или на оценката DOPE.

Изграден е двуслоен мембранен модел на гладката мускулатура на матката, състоящ се от 5 фосфолипида (фосфатидилхолин 50.3%, фосфатидил етаноламин 24.8%, сфингомиелин 13.8%, фосфатидилсерин 6.4% и холестерол 2%), с помощта на инструмента Membrane Builder. Системата рецептор - мембрана е подложена на молекулно-динамична симулация при минимизирана енергия на изградения модел на окситоциновия рецептор. (Глава 4)

Конструиран е комплекс рецептор-мембрана-окситоцин и след минимизиране на енергията и уравнивяване на комплекса е проведена молекулно - динамична симулация. Получената от симулацията траектория е анализирана, като в оценката на взаимодействието между хормона окситоцин (OT) и неговия рецептор (OTR) са

включени хидрофобните контакти и водородни връзки, които допринасят за образуването на стабилен комплекс между двете молекули. Определени са 21 аминокиселинни остатъка от изградения модел на окситоциновия рецептор като места за свързване на молекулата на окситоцин. Аминокиселинни остатъци от моделирания рецептор, които участват във взаимодействието хормон – рецептор са сравнени с експериментално определените и с тези от молекулно моделиране на други изследователски групи, и са определени съответствията в местата на свързване. От местата на свързване 10 са нови места, 11 съпадат с резултати на други групи, а 4 от тях са определени експериментално. От местата на взаимодействие между хормона и рецептора 9 са водородни връзки, а останалите са Ван дер Ваалсови контакти между двете молекули.

За да се изследва механизма на активиране на окситоциновия рецептор са проведени симулации с рецептор свързан с агонист (хормона окситоцин) и несвързан с лиганд. От определената траектория за рецептора свързан с окситоцина следва, че трансмембранните спирали TM1, TM2, TM6 и TM7 остават стабилни, а структурата на трансмембранните спирали TM3 TM4 и TM5 се разгъва, което води до стабилизирането на спиралната структура на E(D)RY мотива, разположен във вътреклетъчната част на TM3 на рецептора, и до изместването му извън полярния джоб, образуван от спиралите TM1, TM2 и TM7. (Глава 5)

Изследвано е взаимодействието на интерферон гама с неговия извънклетъчен рецептор IFN $\gamma$ R1 и ролята на хепаран сулфат за това взаимодействие. За моделиране на интерферон- $\gamma$ , рецепторната субединица IFN $\gamma$ R1 и интерферон- $\gamma$ , рецепторна субединица IFN $\gamma$ R1, хепаран сулфатни хекса- или октазахариди са използвани пространствената структура на INF- $\gamma$  и рецепторната му субединица IFN $\gamma$ R1 от PDB база данни. Компютърните модели на хепаран сулфат със степен на полимеризация 6 (dp6) и 8 (dp8) са изградени въз основа на магнитно-резонансна структура от PDB базата данни.

Представен е модел на взаимодействие между цитокина INF- $\gamma$  и неговата рецепторна субединица IFN $\gamma$ R1. Установено е, че хепаран сулфат протеогликан, който се свързва с висок афинитет с два домена D1 и D2, разположени в С-края на цитокина INF- $\gamma$ , участва в правилното формиране на комплекс между INF- $\gamma$  и субединицата IFN $\gamma$ R1 от неговия извънклетъчен рецептор. Глава 6

Резултатите от представените изследвания са предпоставка за бъдещи разработки и възможно приложение в областта на фармацевцията и медицината. Информацията за взаимодействието между окситоцин и неговия рецептор представлява интерес за разработването на по-ефективни и селективни антагонисти на рецептора, които биха имали приложение за превенция на преждевременните раждания, а тази за взаимодействието между интерферон гама и неговия рецептор до разработване на по-ефективни терапевтични стратегии за

контрол на нивата на противовъзпалителния цитокин при преждевременно раждане.

### **Критични бележки и препоръки**

Представеният автореферат отразява коректно структурата, съдържанието и приносите на дисертационния труд. Нямам съществени забележки към дисертацията.

Имам следния въпрос към дисертантката:

Как би продължила изследователската работа на базата на постигнатите резултати и какви подходи би приложила имайки пред вид възможните приложения споменати в дисертационния труд?

### **Заклучение**

Дисертационният труд на Елисавета Любомирова Миладинова представя оригинално научно изследване, проведено със съвременни методи на молекулната динамика и задълбочено интерпретиране на научните резултати. Актуалността на дисертационната тема, получените оригинални резултати и научните приноси, отговарят на препоръчителните критерии на СУ "св. Климент Охридски" и в частност на Физически Факултет за придобиване на научната и образователна степен „Доктор“, въз основа на което давам положителна оценка на дисертационния труд и убедено подкрепям присъждането на образователната и научна степен **„Доктор“** в професионално направление "4.1 Физически науки", научна специалност "01.06.08 Биофизика" на Елисавета Любомирова Миладинова.

06.03.2023 г.

София

Изготвил рецензията:

(проф. дбн Стефка Танева)