

РЕЦЕНЗИЯ

от доцент д-р Анастас Димитров Пашов, Департамент по имунология, Институт по микробиология „Акад. Стефан Ангелов“, БАН

Относно: Дисертационен труд за защита и придобиване на образователната и научна степен „Доктор“, по Професионално направление: 4.1. "Физически науки", По научна специалност: "Биофизика" - 01.06.08.

Тема на дисертационния труд: „РАЗРАБОТВАНЕ НА ФИЗИЧЕСКИ МОДЕЛИ НА ИМУНОАКТИВНИ МОЛЕКУЛИ“

Автор на дисертационния труд: Елисавета Любомирова Миладинова, редовен докторант във катедра „Атомна физика“, Физически факултет, СУ, София

Научен ръководител: проф. д-р Леандър Литов

Актуалност и значимост на дисертационния труд

Дисертационният труд на Елисавета Миладинова представлява структурно-биологично изследване *in silico* с много силен интердисциплинарен характер. Биофизично по същността си, то е инструктирано от и обслужва медицината. Обект на изследване са две лиганд-рецепторни двойки – окситоцин и окситоцинов рецептор, и интерферон гама и интерферон гама рецептор. Хормонът окситоцин контролира процеса на раждане, както и редица аспекти на поведението, свързани с репродуктивната дейност. Липсва кристална структура на рецептора за окситоцин и създаването на модел на взаимодействието на този хормон с рецептора му е предпоставка за разработката на лекарства, например за предотвратяване на преждевременното раждане.

Интерферон гама е цитокин, инициращ много сложна генетична програма с основна функция – организация на клетъчен имунен отговор при повечето инфекции, но най-вече срещу тези причинени от вируси. Той е и ключов фактор в противотуморния имунитет. Интерферон гама е прототипния провъзпалителен цитокин и чрез възпалението той организира противодействието и елиминирането на инфекциозните причинители. Патологията на имунния отговор, водеща до автоимунни процеси, също включва като централен регулаторен фактор интерферон гама. Ето защо липсата на знания за детайлния механизъм на взаимодействието на интерферон гама с рецептора му прави моделирането на това взаимодействие изключително актуално.

Така, и двата сигнални механизма са от ключово значение за медицинската наука. Дори е открита и връзка между тях в рамките на компетентността на лимфоцитите да реагират на повечето известни хормони и медиатори, включително и окситоцин, слабо проучен факт известен от 30 години.

Структура на дисертационния труд

Представеният за защита дисертационен труд е на 137 страници. Разделен е на следните секции: Заглавна страница, Съдържание, Използвани съкращения, Увод - 2 стр., Въведение (в качеството на обзор на молекулярно-биологичната фактология от предшествашки изследвания) на 20 стр. както и секция озаглавена „Компютърно моделиране на биологични макромолекули и методи за анализ на получените резултати“ в качеството на обзор на биофизичните методи. По-нататък дисертацията съдържа четири секции описващи експериментите *in silico* и съответните резултати на общо 50 стр., последвани от : Заключение – 4 стр., Научни приноси – 2 стр., Научни публикации, въз основа на които е написана дисертацията – 2 стр., Благодарности и Библиография на 17 стр. Използвани са източници от 184 публикации, като 18% от тях са публикувани в последните 10 години. Дисертацията е богато онагледена с 58 фигури и съдържа 1 таблица.

Уводът на дисертацията представя актуалността на проблемите и необходимостта от това изследване. Поради липса на обособени секции с цел и задачи, тази функция се изпълнява от увода, в края на който те са маркирани. От друга страна, както движещият мотив за подобно изследване – попълване на белите полета в структурната биология на изследваните лиганд-рецепторни двойки, така и хипотезата за структурно-функционалните зависимости в молекулярната биология са тривиални. Все пак усилието да се формулира теоретичната мотивация би било полезно за докторанката като бъдещ самостоятелен изследовател. Дори само за да се различат формите на научно търсене – наука движена от хипотези от наука, генерираща хипотези с условието - последната да не бъде просто описателна.

Литературният обзор не е обособен, но секции 1 и 2 изпълняват тази функция. Въведението е богато на информация и адекватно представя състоянието молекулярно-биологичния аспект на научния проблем на окситоциновата сигнализация. То демонстрира познаване на предмета на изследване, което включва твърде далечните за докторанта и екипа био-медицинските аспекти. Обобщено е известното за окситоцина като структура, биосинтез и метаболизъм, както и рецепторите, свързани с G протеин и в частност – окситоциновия рецептор. Обхванати са и релевантните аспекти на сигнална трансдукция и генетиката на окситоцина и рецептора му. Доста кратък вариант на обзор на сигнализацията при интерферон гама е включен към раздела описващ съответните експерименти.

Третата част е обзор на биоинформатичните и структурно-биологичните методи. Тя разглежда методите за моделиране *in silico* на молекулната динамика (силови полета, гранични условия, минимизация на енергията, алгоритми за интегриране, симулиране на постоянна температура и налягане както и софтуерния пакет GROMACS), хомоложно моделиране на протеинови структури, докинг и методи за анализ на модели на лиганд-рецепторни взаимодействия. Това е и най-задълбочената и най-изчерпателната част на

обзора, която показва задълбоченото познаване от докторантката на собствената методология в тази мултидисциплинарна работа. Като цяло обзорните части на дисертацията съдържат 27 фигури и изобщо изложението е много богато илюстрирано, което улеснява възприемането на сложната и разнопосочна (понякога много абстрактна) информация.

Следващите части на дисертацията са организирани по задачи, като включват едновременно методична част и резултати. Задачите не са формулирани експлицитно, но са очевидни от структурата на текста: - Изследване стабилността комплекса от окситоцин и двувалентен цинк, моделиране структурата на окситоциновия рецептор, моделиране на взаимодействие между окситоцина и рецептора му и изследване участието на хепаран сулфат в свързването на интерферон гама към рецептора му.

Оценка на използваните методи на изследване

Прави впечатление изобилието от структурно биологични и биоинформатични методи усвоени и използвани от дисертантката. Детайлното физическо и математическо описание на методите показва задълбоченото разбиране на методологията, въпреки че за повечето от приложените методи типично се използва стандартен софтуер (GROMACS, Modeller, BLAST алгоритъма на NCBI, AutoDock с vsLab, VMD, HBonanza, Glycan Reader and Modeller и др.). Приложената технология е стандартна и широко прилагана в тази област на науката. Тя включва както моделирането на молекулите и рецепторните взаимодействия включително в контекста на билипидната мембрана на клетките, така и анализа на моделите чрез молекулна динамика, изчисляване на свободната енергия на свързване на комплекса чрез метода MM-PBSA, Discrete Optimized Protein Energy и др. Документирани са и скриптовете използвани за програмиране на анализите извършени с помощта на използвания софтуер. По-задълбочена оценка не ми е възможна поради различната ми специализация, но получените публикуеми резултати са атестат за овладяна state of the art методология.

Оценка на получените резултати

Всяка една от задачите е изпълнена и получените резултати са с високо качество. Това обуславя и положителния краен резултат защото много от задачите са организирани в pipeline където следващата задача зависи от резултата на предишната (например моделът на рецепторното взаимодействие на окситоцина зависи от успешното моделиране поотделно на конформацията на комплекса на окситоцин с цинков йон така и на структурата на окситоциновия рецептор). Всеки от тези модели и анализите им са резултати с приносен характер, както е очевидно и от формулираните 9 приноса. Пет от тях са чисто структурни – генериране и валидация на модели, които до сега не са били изследвани. Другите 4 са нови научни факти като: 1) Измерена е стабилността на комплекса от окситоцин с метален йон, 2) Установени са конкретните аминокиселинни остатъци участващи във взаимодействието на рецептора с окситоцин,

което е предпоставка за търсене на фармакологични агенти (както антагонисти, така и агонисти), 3) Показани са конформационните промени в рецептора, които съставляват механизмите на предаване на сигнала на ниво рецептор и 4) Изяснена е ролята на безструктурния С-край на молекулата на интерферон гама при взаимодействие с рецептора, която обяснява наблюдаваната зависимост на сигнализацията от отрицателно заредени компоненти на мембраната като хепаран сулфат.

Дискусията на резултатите не е обособена. Частта заключение има смисъл и на дискусия, като са обобщени получените резултати. В рамките на отделните части на дисертацията, описващи работата по отделните задачи има добавени и елементи на дискусия. Цитирани са източници, чиито резултати са в потвърждение на получените от дисертантката, но като цяло критичното обсъждане на резултатите в контекста на известното от литературата е оскъдно.

Авторефератът е на 62 страници с 25 фигури и 130 цитата. Той представя адекватно методологията и изцяло резултатите, както и приносите.

Критики и въпроси

Това е една дисертация структурирана по начин, необичаен у нас, но представляващ преход към начин на изложение на научните изследвания широко разпространен в други държави, които са водещи в науката. Заслужава да се отбележи смелостта на дисертантката да предложи такъв формат, който, въпреки особеностите си (най-вече липсата на критично сравнение на резултатите с подобни от други групи). Редно е подобен подход за изложение да бъде придружен с копия на статиите, защото те съдържат, това което липсва в дисертацията. В този случай изложението би могло да се съкрати.

По-неприятни са редица неточности, особено в уводните части, които засягат биологията на процесите. Например: -

- 1) Неправилно е да се характеризира интерферон гама като противовъзпалителен цитокин. На практика, функцията му е точно обратната – той е централен провъзпалителен цитокин.
- 2) Не е правилно да се охарактеризира хормонът окситоцин като ключов регулатор на имунната система. Влиянието му върху имунните клетки е показано отдавна, но то не съставлява съществен регулатор в сравнение с много други хормони.
- 3) Наистина съществуват повече от 100 неuropeптида и те са най-големия клас сигнални молекули в централната нервна система, но в никакъв случай не са най-многобройния клас молекули в човешкото тяло, както твърди дисертантката.

Причината да се допуснат подобни неточности вероятно се крие в мултидисциплинарността на работата, която може да се окаже твърде голямо

предизвикателство за млад и неопитен изследовател. Показателно е, че подобни неточности не са допуснати в биофизичната част.

Публикации.

Резултатите от дисертацията са включени в три публикации в списания с импакт фактор (едното е с IF над 6), на които дисертантката е първи автор. Те описват 1) Стабилността на окситоциновия комплекс с двувалентен цинков йон, 2) Изследване на участва на свързване в модел на окситоцин с окситоцинов рецептор и 3) Ролята на хепаран сулфат за сигнализацията при интерферон гама. Цитирани са и три публикации от участия в конгреси – два в България и един в Португалия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Критиките в настоящата рецензия са насочени към формата. Те не засягат съществено значимостта на дисертационния труд и не поставят под съмнение валидността на резултатите и изводите. Дисертацията, по съдържание и актуалност, отговаря на изискванията на Закона за развитие на Академичния състав в РБ. Оценявам дисертацията положително и убедено препоръчвам на останалите членове на научното жури да подкрепят присъждането на научно-образователната степен „доктор“ на Елисавета Миладинова. Аз категорично гласувам ЗА присъждането на степента и пожелавам на докторантката да продължи със заниманията си в полето на структурната биология.



Анастас Пашов

12.03.2023, София