

РЕЦЕНЗИЯ

**на дисертационен труд за придобиване на научната и образователна степен
„доктор“**

на тема „Изучаване динамиката на процеси в живи клетки чрез съвременни
микроскопски подходи“,

на Александър Сергеев Атемин, редовен докторант към Лаборатория по геномна стабилност, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, Българска академия на науките, в научно направление 4.3. Биологични науки (Молекулярна биология) с научен ръководител доц. д-р Марина Неделчева-Велева и научен консултант доц. д-р Стойно Стойнов

**От проф. д-р Таня Иванова Топузова-Христова, Катедра Клетъчна биология и
биология на развитието, Биологически факултет на Софийски Университет „Св.
Климент Охридски“**

Данни за докторанта и докторантурата.

Александър Сергеев Атемин е завършил бакалавърска степен на образование със специалност Биотехнология в биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“ през 2014 година и магистърска степен по Генно и клетъчно инженерство в същия Университет през 2016 година с отличен успех. От същата година е назначен като биолог в секция „Структура и функция на хроматина“ към Института по молекулярна биология, БАН и е зачислен като редовен докторант през 2016 г. в Лабораторията по геномна стабилност на Института по молекулярна биология към Българската академия на науките, в научно направление 4.3. Биологични науки (Молекулярна биология) с научен ръководител доц. д-р Марина Неделчева-Велева. Докторант Атемин е преминал през необходимите курсове, положил е съответните изпити и е отчислен с право на защита в срок, като са спазени всички изисквания според *Правилника за прилагане на Закона за развитие на академичния състав на Република България и Правилника за развитието на академичния състав на Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ при Българска академия на науките, раздел 4 и няма допуснати нарушения.* По време на подготовката на дисертационния труд за официална защита има прекъсване на сроковете по ЗРАСРБ за срока на извънредното положение до 13.05.2020 г., на основание &24 от преходните и заключителните разпоредби на Закона за мерките и действията по време на извънредното положение от 13.03.2020 г. Аprobацията на дисертационния труд беше проведена на 22.07.2024 г. Всички присъстващи се обединиха около мнението, че трудът е дисертабилен и отговаря на изискванията според ЗРАСРБ, като се даде ход на процедурата за открита защита. Спазени са и минималните национални изисквания според *Закона за развитието на академичния състав в Република България, Обн. ДВ. бр.38 от 21 Май 2010г., изм. ДВ. бр.81 от 15 Октомври 2010г., изм. ДВ. бр.101 от 28 Декември 2010г., изм. ДВ. бр.68 от 2 Август 2013г., изм. и доп. ДВ. бр.30 от 3 Април 2018г., изм. ДВ. бр.17 от 26 Февруари 2019г., изм. ДВ. бр.17 от 25 Февруари 2020г.*

Данни за дисертацията.

Темата на дисертацията „Изучаване динамиката на процеси в живи клетки чрез съвременни микроскопски подходи“ отразява вярно нейното съдържание. Дисертацията обхваща 136 страници, съдържа 24 фигури, 1 таблица и 2 схеми. Използването на съвременни микроскопски техники в съчетание с обработка на получените данни с подходящи софтуерни продукти и създаване на бази-данни, достъпни до широк кръг изследователи е в основата на темата на дисертационния труд и е изключително актуално за изясняването на различни клетъчни процеси с фундаментално и приложно значение.

Основните части на дисертацията спазват общоприетият за такъв труд план и включват: Литературен обзор – 36 страници, Цели и задачи – 1 страница, Материали и методи – 6 страници, Резултати – 30 страници и Дискусия – 6 и Изводи и приноси – 2 страници общо.

В литературния обзор е направен преглед на процесите на навлизане на вирусните частички на SARS-CoV и SARS-CoV-2, тяхната репликация и сглобяване в клетките, като е направен акцент към терапевтичния потенциал на вирусните белтъци – мембранни, нуклеокапсидни и други, ако се използват като мишени. Тъй като процеса, който се проследява е самото навлизане на вирус-подобните моделни частици, би било по-удачно акцентът да се насочи и към вариантите на ендоцитоза и участващите в този процес белтъци. Вместо това излишно подробно са описани различните използвани в практиката медикаменти, ваксини и терапии, но не е направена връзка с основната тема на дисертационния труд. Въпреки това, като предимство мога да посоча, че е проследена е динамиката на вирусните частици и възможните варианти на навлизането им в клетките, което води логически до поставените в следващата част Цели и задачи. Като допълваща задача с идеята да се оптимизира подхода за проследяване на динамиката на различни комплекси в клетката се разглеждат и свързаните с репликацията и клетъчния цикъл белтъци ORC1, MCM6, CLASPIN, RIF1, PCNA. В увода и литературния обзор има допуснати смислови и печатни грешки по невнимание, а също и използване на ненужни чуждици, които би трябвало да се изчистят преди окончателното публикуване на труда.

Формулираните цел и задачи логически следват от направения обзор, а използваните материали и методи са описани коректно и ясно, достатъчно подробно, за да бъдат повторени. Целта на дисертационния труд е да се изследва динамиката на процесите, съпътстващи навлизането на SARS-CoV-2 вирус-подобни частици в клетки-гостоприемници и динамиката на нивата и разпределението в клетката на белтъци, участващи в репликацията на ДНК по време на клетъчния цикъл.

Използвани са 3 клетъчни линии (A549, VeroE6, U2OS) и техни варианти с повишена експресия на ACE2 и TMPRSS2 за проследяване на вирусната интернализация, както и HeLa Kyoto, която експресира стабилно RIF1, ORC1, PCNA, MCM6, Claspin, белязани с EGFP. Проследяването на навлизането на вирусоподобните частици е осъществено в клетки, трансфектирани с флуоресцентно белязани динамин, ACE2 и mNeonGreen, а ендозомния трафик е проследен с органел-специфично оцветяване с CellLight™ Early Endosomes-GFP, BacMam 2.0 и LysoTracker. Хранителните среди,

плазмидните вектори, антителата и химикалите са подробно описани, включително с каталожни номера, а наборът от методи включва както класически, така и съвременни методи (TEM, трансфекция на човешки клетки с флуоресцентно маркирани белтъци, *in vivo* наблюдения и документиране на маркирани белтъци чрез конфокален микроскоп и последваща обработка с набор от софтуерни решения в програмата „Python“, както и във Fiji, които колективно се наричат SPARTACUSS (Single-Particle Tracking Analysis in Cells Using Software Solutions). За приложените методи са дадени подробни обяснения, които биха били полезни при повторение на подхода. Експериментите са проведени прецизно, а получените резултати са интерпретирани логично и с необходимите математически и статистически анализи.

От получените резултати ясно личи, че успешно са проследени вирусните частици по време на адхезията им към клетъчните мембрани, както и при навлизането им в клетките, като този процес е съпоставен с динамиката на ключови за ендоцитозата белтъци и органели. Извършен е огромен по мащаби труд по отношение на индивидуалното проследяване на вирусоподобни частици извън и в отделните клетки, събиране на комплексни изображения, които след това могат да бъдат допълнително обработени с подходящ софтуер, измерване на интензитет на флуоресценция и рН на вътреклетъчни структури и съпоставянето им с движещите се вирусоподобни частици и т.н. Резултатите са добре илюстрирани и обяснени, като позволяват извеждането на 7 ясно формулирани извода по отношение на скоростта на SARS-CoV-2 вирусоподобните частици след навлизане в клетката гостоприемник, механизма на навлизане в клетката и освобождаването на вирусните частици от ендозомите. Последният (осми) извод е по отношение на динамиката на свързаните с репликацията белтъци през клетъчния цикъл, но не е формулиран достатъчно конкретно, а твърде общо.

Освен изводите са формулирани и пет приноса на дисертационния труд, които напълно приемам. За мен най-значимите приноси от този дисертационен труд са създадените две информационни бази данни с микроскопски изображения и видеа, които са със свободен достъп и биха били от изключителна помощ на изследователите на процесите на репликация, контрол на клетъчния цикъл, както и на вирусолозите, изследващи вариантите на SARS-CoV. Не по-малко важни са и методологичните приноси – съставени са две детайли методологии, позволяващи визуализирането и точното измерване на промените в скоростта и интензитета на белязани вирусоподобни частици; измерването *in vivo* на нивата на определен флуоресцентно маркиран белтък, както и разпределението му в клетката по време на клетъчния цикъл, както и протокол за дискретното определяне на фазите на митотичния цикъл, така и ранна S, средна S и късна S фаза на клетъчния цикъл, чрез флуоресцентно белязан PCNA, измерен след прилагане на Sobel оператор,, които със сигурност ще се използват и при бъдещи изследвания.

Научен апарат

Цитирани са 247 източника, които дават възможност да се направи изчерпателен преглед на научните достижения по темата. Всички източници са адекватно подбрани и имат пряко отношение към изследваната тема, което показва отличната осведоменост на

докторанта. Цитиранията са направени при спазване на утвърдените стандарти за цитиране на научна литература.

Автореферат

Авторефератът съдържа 75 страници и напълно отразява съдържанието на дисертационния труд. Коректно са представени основните резултати, илюстрирани с общо 24 фигури, в които са включени графики и цветни микрофотографии. Изводите са представени коректно. Включени са и публикации по темата на дисертацията, както и съкратен списък на цитирана литература, използвана основно в дискусията към резултатите.

Публикации

Основните резултати от дисертационния труд са публикувани в три публикации в научни списания с импакт фактор и с квантил (две в Q1 и една Q2). В публикациите с квантил 1 докторантът е първи автор, което отразява съществения принос в изработването им. Според изискванията на Закона за развитие на академичния състав, трите публикации носят общо 70 точки, което надвишава повече от два пъти необходимия минимум 30. Освен тези публикации, Александър Атемин е приложил списък от още три допълнителни публикации, участие в 11 национални и международни конференции, на които е популяризировал получените в дисертационните си изследвания и други научни разработки резултати. Тази значителна публикационна активност характеризира Александър Атемин като един изграден и активен млад учен с отлични перспективи за бъдещо развитие.

Научни и научно-приложни приноси

Приносите на този дисертационен труд са безспорни и значими както за фундаменталната наука, така и с научно-приложен характер. Създадени са уеб базирани бази данни COVIDynamics и DNArepairK Database, които са от полза за изследването на пътищата на интернализация на SARS-CoV-2 вирусоподобни частици, както и динамиката на белтъци, свързани с репликацията и поправката на ДНК. Разработени са методологии за проследяване и анализ на навлизането и движението флуоресцентно маркирани частици в клетката, което би помогнало при вирусологични изследвания, но и при разработването на нови наноразмерни лекарствени носители във фармакологията; а също така и за количествено определяне на динамиката на флуоресцентно-маркирани регулаторни белтъци, участващи в лицензирането и провеждането на репликацията на ДНК.

Фундаменталните научни приноси са свързани с пет ключови процеса, асоциирани с навлизането на вирусоподобни частици в две различни клетъчни линии и с динамиката на ключови за репликацията белтъци през целия клетъчен цикъл. Приемам формулираните приноси на дисертационния труд.

Заклучение

В заключение, представено е едно комплексно изследване на вирусоподобни частици по време на адхезията им към клетъчните мембрани, както и при навлизането

им в клетките от две различни клетъчни линии, като този процес е съпоставен с динамиката на ключови за ендоцитозата белтъци и органели. Извършен е огромен по мащаби труд по отношение на индивидуалното проследяване на вирусоподобни частици извън и в отделните клетки, събиране на комплексни изображения, които след това могат да бъдат допълнително обработени с подходящ софтуер. Проведено е и проследяването на ключови за ДНК репликацията белтъци през целия клетъчен цикъл, като е създаден протокол за определяне на фазите на базата на динамиката на изследваните белтъци. Създадени са две уеб базирани бази данни и нови методологични подходи при изучаване на динамиката на клетъчни процеси.

Въз основа на представените материали, считам, че докторантът напълно отговаря на изискванията на ЗРАС за присъждане на научната и образователна степен „доктор“ и препоръчвам на Александър Атемин да бъде присъдена научната и образователна степен „доктор“ в научно направление 4.3. Биологични науки, научна специалност Молекулярна биология.

11.11.2024

Резензент:

Гр. София

/проф. д-р Таня Топузова-Христова/