

Становище

върху дисертационния труд на Александър Сергеев Атемин, редовен докторант в Института по молекулярна биология „Акад. Р. Цанев“ на тема “Изучаване динамиката на процеси в живи клетки чрез съвременни микроскопски подходи” с научен ръководител: доц. д-р Марина Неделчева-Велева и научен консултант: доц. д-р Стойно Стойнов, представен за присъждане на образователната и научна степен “доктор” по научна специалност “Молекулярна биология” в научно направление 4.3. Биологични науки.

Изготвил становището: доц. д-р Анастас Господинов

Представеният дисертационен труд отразява задълбочено изследване на динамичните процеси в живи клетки, извършено чрез съвременни микроскопски подходи. Методологията е обединяващото звено в двата отделни изследователски проблема, включени в дисертацията: 1. навлизането на моделни вирусоподобни частици (VLPs) на SARS-CoV-2 и 2. динамиката на ключови репликационни белтъци в клетъчния цикъл. Дисертационният труд на Александър Атемин е с обем от 128 страници, включително приложенията и списъка с литература. В трудът са цитирани общо 247 източника, всички на английски език, публикувани в реномирани издания в областта на молекулярната биология и вирусологията. Работата съдържа 24 фигури и 1 таблица.

Литературният обзор на дисертацията на Александър Атемин предлага задълбочен и детайлен преглед на актуалните научни познания за вируса SARS-CoV-2, като разглежда както неговата структура (детайлно са описани белтъците на вируса и вирусния геном), така и жизнен му цикъл. Авторът описва подробно процеса на навлизане на вируса в клетките чрез S белтъка и неговото взаимодействие с рецептора ACE2. Следващата стъпка – сливането на вирусната и клетъчната мембрана също е подробно обсъдена, като са разгледани ролята на протеазата TMPRSS2 и други клетъчни ензими, които осъществяват протеолитични срязвания и активират S белтъка. Разгледани са и терапевтичните подходи за лечение на инфекцията предизвиквана от SARS-CoV-2, както и ваксините срещу вируса. Теоретичният преглед предоставя солидна основа за изследванията, представени в дисертацията.

Втората част на литературния обзор е посветена на процеса на ДНК репликация, като е дадено общото му описание и са разгледани подробно тези белтъци, които са обект на изследване в дисертацията.

В дисертацията са формулирани 2 независими цели. За постигането на първата са поставени 5 конкретни задачи, за постигането на втората цел - една задача. Задачите са точно формулирани и насочени към постигане на всяка от целите.

Главата „Материали и методи“ в дисертацията на Александър Атемин предоставя подробно описание на използваните експериментални подходи и техники за изучаване на динамичните процеси в живи клетки. Основното внимание е насочено към прилагането на софтуерни решения за анализ, които са от ключово значение за успешното изпълнение на целите на изследването.

Основно средство в изследванията е микроскопията на живи клетки. Авторът използва конфокална микроскопия с висока резолюция, извършена с Andor Dragonfly спининг диск конфокална система. Тази високотехнологична система позволява проследяването на белязани молекули в живи клетки за продължителен период от време, което е от ключово значение за разбиране на динамиката на изследваните процеси.

За изследване на динамиката на навлизане на вирусо-подобните частици (VLPs) на SARS-CoV-2 в клетките гостоприемници, авторът използва специално произведени VLPs, които съдържат структурните белтъци на вируса и имат несъществена генетична информация, предотвратяваща тяхното размножаване. След като частиците се свържат с мембраната на клетката, те се проследяват на ниво единична частица, използвайки софтуерния пакет SPARTACUSS. Това позволява детайлно проследяване на скоростта, позицията в 3D пространството и интензитета на флуоресцентно белязаните белтъци.

За изследване на динамиката на белтъците на репликационната вилка, авторът създава и двойно белязани клетъчни линии, в които ключови белтъци като ORC1, MCM6, CLASPIN, RIF1 и PCNA са флуоресцентно маркирани. Това дава възможност за детайлно проследяване на динамиката на тези белтъци по време на различни етапи от клетъчния цикъл, като осигурява ценна информация за процесите на репликация и тяхната регулация.

За анализа на събраните данни и изображения, авторът използва разработени софтуерни решения, които са създадени специално за целите на изследването. Основен инструмент е SPARTACUSS – софтуер за проследяване на белязани частици в живи клетки, който позволява детайлен анализ на динамиката на вирусоподобните частици и свързаните с тях клетъчни процеси. Важно е също така, че авторът прилага множество стъпки за нормализация на данните, за да осигури висока точност на получените резултати. Използват се утвърдени методи за статистически анализ, за да се гарантира надеждността на получените заключения.

Главата „Резултати и обсъждане“ в дисертацията на Александър Атемин представя детайлен и систематичен анализ на динамичните процеси, свързани с вирусоподобните частици (VLPs) на SARS-CoV-2, както и ключовите белтъци, участващи в клетъчната репликация.

Първият ключов резултат, представен в дисертацията, е свързан с проследяването на процеса на навлизане на вирусоподобните частици в клетките гостоприемници. Резултатите показват, че навлизането на VLPs се осъществява чрез свързване, медирано от S-белтъка, последвано от директно сливане с плазмената мембрана или чрез ендоцитоза и сливане с ендозомната мембрана.

Експериментите показват, че инхибирането на динамина (ГТФаза с ключова роля в ендоцитозата) значително намалява ефективността на навлизане на вирусоподобните частици в клетките, което подчертава ролята на този белтък в процеса на вирусна интернализация. При навлизането се наблюдава повишаване на скоростта на VLPs и значително понижаване на рН под 5 в рамките на минути след навлизането. Последното е ключов момент в жизнения цикъл на вируса и е необходимо за освобождаването на вирусния геном и последващата репликация. Направен е анализ на кинетиката на навлизане на вирусоподобни частици, съдържащи различни мутации, характерни за омикрон варианта на SARS-CoV-2. Тези резултати са от съществено значение за разбирането на еволюционните механизми на действие на вируса.

В допълнение към изследванията на VLPs, дисертацията разглежда и динамиката на някои репликационни белтъци по време на клетъчния цикъл. Авторът използва двойно белязани клетъчни линии за проследяване на белтъци, които участват в регулацията на ДНК репликацията. Резултатите предоставят нови сведения за контрола на ДНК репликацията.

Важна част от дисертацията е разработването на софтуер създаден специално за целите на това изследване, позволяващ прецизно проследяване на флуоресцентно белязани частици в живи клетки. Софтуерът е използван за анализ на голямо количество данни, като позволява визуализиране и количествено измерване на кинетиката на навлизане и движението на VLPs в клетките гостоприемници.

Резултатите, представени в дисертацията, са значителен принос към разбирането на механизма на инфекция с SARS-CoV-2 и взаимодействията му с клетките гостоприемници. Динамиката на вирусоподобните частици, зависимостта от динамин и ролята на вътреклетъчната ацидификация са ключови аспекти, които не само разширяват познанията за вирусния цикъл, но и отварят нови възможности за разработване на терапевтични подходи.

Изследването на репликационните белтъци по време на клетъчния цикъл предоставя информация за механизмите на регулация и ролята на тези белтъци в контрола на репликацията. Тези данни са от значение за разбиране процесите, свързани с клетъчното делене и геномната стабилност. Изводите са обосновани на базата на представените данни, а приносите ясно подчертават иновациите, постигнати от автора.

Към автора имам дребни забележки от езиково естество - основно във връзка с широкото използване на чуждици и въвеждането на нови такива. Това обаче ни най-малко не намалява стойността на дисертационния труд, който като цяло се чете приятно, структуриран е логично и има добър стил.

Александър Атемин е съавтор на 6 публикации с общ IF около 36. Общия брой на цитиранията на публикациите на Александър Атемин до момента по Google Scholar е 170.

Заклучение

Резултатите от изследването на Александър Атемин предоставят ценна информация за динамичните процеси на: 1.) вирусната инфекция и 2.) клетъчната репликация. Приложени са най-нови микроскопски и други експериментални техники и методи. Разработени са нови софтуерни решения за анализ на данните. Те разширяват познанията в областите на изследване и служат за основа на бъдещи изследвания и разработки, както в теоретичен, така и в практически план (новосъздадения софтуер).

Дисертационният труд на Александър Атемин демонстрира много високото ниво на подготовка на автора. В хода на изработката му той се е изградил като опитен изследовател с широк профил на компетентности и възможности да работи успешно в различни области на модерната биология. Ясно се вижда и вкуса му към разработката и прилагането на най-нови технологични подходи за изучаване на изследваните клетъчните процеси. Без всякакво съмнение, дисертационният труд на Александър Атемин напълно отговаря на изискванията за присъждане на научната степен "доктор" и заслужава най-висока оценка, които препоръчвам на уважаемото научно жури да му присъди.