

РЕЦЕНЗИЯ

За присъждане на образователна и научна степен „Доктор” в професионално направление “Химически науки”, шифър 4.2,м, по научната специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично-активни вещества ”, шифър 01.05.10. Тема на дисертационния труд: **”Протонни равновесия и електростатични взаимодействия в протеинови молекули**

Автор на дисертационния труд: *Александър Кантарджиев*

Научен ръководител: *доцент, д-р Борис Атанасов*, Институт по Органична химия с Център по фитохимия – БАН,

Рецензент: *доцент, д-р, Иванка Борисова Стойнева*, Институт по Органична химия с Център по фитохимия – БАН,

Дисертационният труд на редовен докторант *Александър Кантарджиев* е разработен в в ИОХЦФ-БАН в лаборатория „Химия и биофизика на белтъци и ензими” и е естествено продължение на дългогодишното развитие на тази тематика от доц. Борис Атанасов, като има няколко успешно защитени дисертации за ОНС „доктор” и 1 за „ доктор на науките”. Асистент Александър Кантарджиев е роден през 1977 г. в гр. Плевен, но основното и гимназиалното си образование той получава в гр. Пловдив, където през 1996 г. завършва Английска гимназия. През 2001 г. завършва с отличен успех Биологическия факултет на СУ “Св. Климент Охридски” и придобива диплома за “МАГИСТЪР” със специалности **Молекулярна биология** и **Биохимия**. Още същата година е зачислен за редовен докторант в тогавашната лаборатория по Биофизична химия.

Дисертацията съдържа 140 печатни страници, добре е илюстрирана с 40 фигури, 10 таблици и 195 цитирани литературни източника.

АКТУАЛНОСТ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Пионерските работи на колегата Борис Атанасов и ръководения от него научен колектив с използване на полуемпиричния метод като подход за анализ на

електростатичните взаимодействия в панкреатичен инхибитор на трипсина и други протеини, изчислените рКа стойностите и титрационната крива на лизоцима показват резултати, близки до експерименталните. Предсказани са рКа стойностите на йонизуемите групи в активния център на аспараттранскарбамилазата и рН-зависимостта на нейната свободна електростатична енергия.

Актуалността на разработваната тема не буди никакво съмнение. Белтъците са биополимери, изградени от повтарящи се в генетично кодирана последователност 20 различни алфа-аминокиселини, свързани с пептидна връзка. Голяма част от тези аминокиселини съдържат йоногенни групи като карбоксилната, тиолната, фенолната, имидазолната и др., които при определено рН на клетъчната среда (вода) са в различна степен на йонизация. По този начин те формират положителни и отрицателни заряди по цялата полипептидната верига, чието наличие и брой зависи от рН и йонната сила. Такива заряди могат да си взаимодействат електростатично в рамките на молекулата, което поради конформационната подвижност на полипептидната верига води до нагъването ѝ до определена пространствена структура (конформация). Нещо повече, зарядите в някои области на така формираната конформация могат да взаимодействат електростатично със зарядовото поле на друга белтъчна или небелтъчна молекула определяйки конформацията на надмолекулния агрегат. Като се има предвид, че биологичните свойства на белтъците се определят еднозначно от тяхната конформация, то изследването на връзката структура/функция налага изучаването на йонизационните равновесия в белтъците. Това се явява особено актуален фундаментален проблем на съвременната структурна биология и нейния приложен аспект – белтъчното инженерство.

Йонизацията на йоногенни групи на белтъка при определено рН го превръща в един мултипол с нееквивалентни заряди в нееквивалентно обкръжение. Взаимодействието на тези заряди не може да се изследва експериментално и за характера и проявлението му може да се съди само чрез изследване на ефекта на промяната на рН върху макроскопските параметри на техни разтвори като спектрални свойства, топлоемкост, стабилност, еластичност и пр. Тъй като системата е сложна, тълкуването на тези експериментални данни е силно затруднено и в много случаи спекулативно. **Поради това развитието на теоретичните методи за описване и предсказване поведението на йонизационните равновесия в белтъците при различно зарядово поле (т.е. при различно рН) е актуален проблем.** Решаването му на атомно и молекулно ниво стана възможно, обаче, след установяването на

кристалната структура на много белтъци, както и разширяването на обемната памет и бързодействието на компютрите.

Дисертационният труд на асистент А.Кантарджиев е едно разширяване и подобряване на теорията на йонизационните равновесия в белтъците и върху нейна основа - разработването на изчислителни методи за тяхното пресмятане и анализ, както и приложението ѝ за теоретично изследване на конкретни функционални свойства на белтъците.

МЕТОДИ И ПОДХОДИ

Основно дисертационният труд се базира на прилагането на микроскопски и макроскопски подходи. В микроскопските подходи електростатичните взаимодействия се определят директно, диелектричните особености на средата се представят чрез атомни поляризуемости (вместо с ϵ), а макроскопските характеристики се получават чрез статистическо усредняване.

Приложение са намерили:

- Хибридни подходи: статистическа механика – “средно-полево (mean-field) приближение
- Изчисляване на електростатичните взаимодействия чрез екраниран кулонов потенциал
- Методът на крайните разлики (FDPB) е използван в настоящата работа за генериране на 3-D разпределението на електростатичния потенциал. За решаване на уравнението на Поасон-Болцман по метода на крайните разлики е използван пакета MEAD разработен в групата на Доналд Башфорд

Характерно за тези нови методи и подходи е адаптирането на пресмятанията към възможностите на съвременните компютри, които въпреки огромното увеличаване на обемната им памет и бързодействие, не могат да се справят с големия обем пресмятания, които изискват средните и големите белтъци.

ОСНОВНИ НАУЧНИ ПРИНОСИ

Съгласно поставените цели е реализиран програмен метод за анализ на протонните равновесия и електростатичните взаимодействия в белтъчни молекули на база “средно-полево (mean-field) приближение. От докторанта е създадена PHEI4WIN – програма, която той е вградил във функциониращ сървър, публикуван под названието “PHEPS” в списание с висок импакт фактор.

В резултат на проявена от докторанта самоинициатива е постигнато написване на нова програма за изчисление и визуализиране на рН-зависими електрични/диполни моменти на белтъчни молекули (каквато няма и досега в света). От нея той създава втори сървър „PHEMTO”, който съчетан с първия представлява сериозен успех

Фактът ,че са регистрирани над 40 000 „посещения” в тези сървъри говори за полезността и значимостта на получените резултати от докторанта

Разработените теоретични методи са приложени към белтъка бета-лактамаза

Установено, че Asp131, който принадлежи на един от консервативните елементи в цялата фамилия на \square -лактамази - т.н. “SDN мотив” (Ser130-Asp131-Asn132) в киселата област Asp131 има добре подчертана стабилизираща роля. Направените изчисления показват ефект на дестабилизиране при елиминиране Asp131 и това е в съгласие с експерименталната мутагенеза на Asp131.

Друг важен зареден остатък,които е изследван е Asp179 от ω -бримката. Експериментално е показано, че мутирането на този остатък до неутрална група води до много важни за функционирането на ензима структурни промени. Получените теоретични резултати са в съгласие с експеримента и показват, че на глобално равнище елиминирането на **Asp179** има добре изразен дестабилизиращ ефект при ниски стойности на рН. В алкалната рН-област докторантът установява обратна тенденция и това предсказание на теорията може да бъде проверено.

Направен е сравнителен анализ на нативния белтък и на мутантите и е установено, че различните йерархичните структурни нива – цяла молекула, домени, фрагменти – имат различна оптимизация по електростатична свободна енергия.

Показано е, че само ω -бримката има качествата на енергетично самостоятелна структурна единица. Това позволява да се изкаже **нов критерий за функционално-независими части в белтъчните молекули под електростатичен контрол – “електростатични домени”**.

Основните приноси в дисертацията на асистент Александър Кантарджиев имат оригинално научно значение и могат да бъдат определени като обогатяване с нови данни на съществуващите знания и създаване на работещ сървър в областта на Биофизична химия.

ЛИЧЕН ПРИНОС НА ДОКТОРАНРА

В дисертацията на асистент Александър Кантарджиев са посочени две научни публикации, публикувани в *Nucleic Acid Research* 2006 и 2009 година, което е авторитетно специализирано международно списание с импакт фактор 8,03. За мен няма никакво съмнение, че личния принос на докторанта е значителен, като отчитам и голяма ролята на неговия научен ръководител, който го е въвел и му е помагал в тази трудна област на изследване. По дисертацията са забелязани 13 цитати съгласно Scopus търсачката, а вероятно са много повече. А. Кантарджиев е съавтор на общо 9 публикации в реномирани списания -. *Chemical Physics Letters*, *Biochemistry*, *J. of Molecular Recognition* и *Nucleic Acid Research*, като две от последните публикации са самостоятелни (2011 и 2012 г.) , което показва, че дисертантът продължава да работи много успешно.

КРИТИЧНИ БЕЛЕЖКИ

Работа е написана интелигентно, и с чувство на лично отношение към представения материал. Макар да се разглеждат сложни теоретични въпроси , на места се чувства философски уклон. Не мога да не отбележа, обаче изобилието на термини от английски език. Често имената на цитираните автори са ту на български, ту на английски . На места както е на стр.9. се говори за „Борнов член” след това Born-ов” и накрая „Generalized Born (GB) модел” в едно също изречение. Да не говорим за термини като "пролегомени" " имплементирани” и др.

Направените критични бележки не понижават стойността на получените много добри и значими резултати при изработването на тази дисертация, а имат за цел да помогнат на дисертанта да прецизира изказа и изложението на научен материал в бъдеще.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на асистент Александър Кантарджиев представя описание на резултати от актуална и творчески осъществена изследователска работа в областта на теоретичната биофизичната химия на белтъците и по-конкретно в теорията на йонизационните равновесия в белтъците и нейното приложение за теоретично изследване на конкретни функционални свойства на тези важни биоорганични съединения. Получените резултати водят до значително разширение на нашите познания за структурно-функционалните свойства на белтъците.

Асистент А.Кантарджиев е един интелигентен млад учен с доказани многостранни интереси и знания и умение за самостоятелна работа. Поради това убедено препоръчвам на членовете на научното жури след успешна защита да гласуват за присъждането на образователната и научна степен “Доктор”.

10.11.2013 г., София

Доцент, д-р Иванка Стойнева