

13. Справка за оригиналните научни приноси

на доц. д-р Роберт Димитров Пенчовски

Научноизследователската дейност на **доц. д-р Роберт Димитров Пенчовски** може да бъде групирана в 5 основни научноизследователски области на базата на научните публикации, представени за участие в настоящия конкурс , както и участие в научни конференции и научноизследователски проекти. Моята научноизследователската активност е пряко свързана с преподавателската ми дейност. Това е видно от курсовете, които водя **Синтетична биология, Биоинформатика и молекулна еволюция, Молекулярна генетика, Геномика Синтетична биология.**

Основни области на научни изследвания:

- **Биоинформатика и молекулна еволюция**
- **Молекулярна генетика на бактерии**
- **Микрореактори и тяхното приложение в геномиката**
- **Синтетична биология**

1. Синтетична биология

Компютърен дизайн и биосензорни приложения на алостерични рибозими, чувствителни към малки молекули. Computational design and biosensor applications of small molecule-sensing allosteric ribozymes – Robert Penchovsky, 2013, Biomacromolecules, 1525-7797, Q1, IF – 5,546

Тук описвам точни и ефективни изчислителни методи за дизайн на алостерични рибозими, които разпознават малки молекули като теофилин, гуанин и аденин. Теофилин разпознаващите рибозими са проектирани да имат висока степен на късане за 1, 3 мин при физиологични условия. Те са много специфични за теофилин и не реагират на кофеин, който се различава само с една метилова група. Тези рибозими са създадени чрез сливане на теофилиновия аптамер с разширената версия на хамерхед рибозимата чрез моделиране на вторични структури.

Заедно с това пурин реагиращи рибозими са създадени чрез сливане на минималната версия на хамерхед рибозимата с бактериални аптамери за

аденин и гуанин чрез моделиране на 3D взаимодействия. Тези рибозими могат да се използват като молекулни сензори във високопроизводителни съвместими масиви, които могат да бъдат използвани за откриване на нови антибиотици. Теофилин разпознаващите рибозими могат да бъдат използвани като молекулни сензори в различни приложения, включително екзогенен контрол на генната експресия.

Инженерни интегрирани цифрови схеми с алостерични рибозими за мащабиране на молекулни изчисления и диагностика. Engineering integrated digital circuits with allosteric ribozymes for scaling up molecular computation and diagnostics – Robert Penchovsky, 2012, ACS Synth Biol, 21615063, Q1, IF – 5,382

Тук аз описвам молекулни реализации на интегрирани цифрови схеми, включително мултиплексор и 1-да-2 декодер за използване на алостерични рибозими. Освен това, аз демонстрирам оригинална мултиплексор-декодер на схема.

Освен това, рибозимите са предназначени да търсят и унищожават специфични РНК молекули с точно определена дължина. Те са създадени с напълно компютъризирана процедура. Алгоритъмът може да предскаже една базова замяна, която променя логическата функция на рибозимата. Възможността да се усети дължината на РНК молекули позволява единични рибозими да се използват като платформи за многократни взаимодействия. Тези рибозими могат да работят като интегрални схеми с функционалността на пет логически елемента. Дизайнът на рибозимите е универсален, тъй като алостеричният и субстратният домейни могат да бъдат променяни, за да усещат различни РНК. В допълнение, рибозимите могат специално да разцепват РНКи с триплет-повтори, наблюдавани при генетични заболявания като Окулофарингеалната мускулна дистрофия. Следователно, дизайнерски рибозими могат да се използва за диагностика в областта на такива генетични дефекти.

Инженерни схеми за управление на гени с алостерични рибозими в човешките клетки като лекарство на бъдещето. Engineering Gene Control Circuits with Allosteric Ribozymes in Human Cells as a Medicine of the Future, in the book “Quality Assurance in Healthcare Service Delivery, Nursing and Personalized Medicine: Technologies and Processes”, Publisher IGI Global, DOI: 10.4018/978-1-120-7, 71-96 (2012). - Б2.8.

Системата и синтетичната биология обещава да разработят нови подходи за анализ и проектиране на сложни методи за синтетичен контрол на генна експресия в живите клетки с много практически приложения за фармацевтичната и биотехнологичната индустрия. В тази глава се описва развитието на нови универсални стратегии за екзогенен контрол на генната експресия. Те се основават на алостерични рибозими, които могат да функционират в клетка. Синтетичните рибопревключватели се получават чрез патентована изчислителна процедура, която осигурява бързи и точни модулни дизайни на рибозими с различни булеви логически функции. Но рибопревключватели могат да бъдат проектирани, за да се долови в клетката наличието или липсата на РНК(и), които са индикативни за определени заболявания. Това може да предотврати развитието на болестта. Поради това, представените синтетични рибопревключватели могат да се използват като наистина универсални клетъчни биосензори. В днешно време, болестно индикативни РНКи могат да бъдат точно идентифицирани с висока точност чрез използване на следващо поколение технологии за секвениране. Тези методи могат да бъдат използвани не само за екзогенен контрол на генната експресия, но също и за препрограмиране на клетъчната съдба, като противоракови терапии. Такива подходи могат да бъдат използвани като мощни молекулни лекарства на бъдещето.

Инжениране на антисенс олигонуклеотиди като антибактериални агенти. Engineering antisense oligonucleotides as antibacterial agents – Robert

Penchovsky and Aikaterini Valsamatzi, 2019, Arch Clin Microbiol, 1989-8436, Q4, IF – 0,16

През последното десетилетие антибактериалната резистентност към лекарства се прояви като голямо предизвикателство в модерната медицина, поради увеличението на много бактериални патогенни щамове, които са резистентни към много антибиотици. Тук ние представяме нова стратегия за дизайн и приложение на антисенс олигонуклеотиди (АСОи) като нови антибактериални агенти, които се целят в специфични бактериални иРНК. АСОи са свързани с проникващи в клетката олигопептиди, които ги пренасят в клетката. Ние използваме няколко различни иРНКи като молекулни мишени. Тези иРНК са отговорни за функцията на различни биосинтетични пътища, които синтезират есенциални метаболити в бактериите. Ние демонстрираме инхибиране на растежа в множество патогенни бактерии, включително *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* и *Escherichia coli* чрез нашите АСОи. Нашият подход е много обещаващ, тъй като сме постигнали 100% ефикасност в потискането на бактериалния растеж чрез наши АСОи. Ние вярваме, че нашият подход за инженеране на нови синтетични антибактериални агенти, базиран на АСОи, е приложим на бързото развитие на нови класове антибиотици.

ExBWS: разширени биоинформатични уеб услуги за анализ на последователности. ExBWS: Extended Bioinformatics Web Services for Sequence Analyses – Robert Penchovsky, Nikolet Pavlova, Dimitrios Kaloudas, 2019, International Journal of Bioinformatics Research and Applications, 1744-5485, Q4, IF – 0,7

Разширените биоинформатични уеб услуги (ExBWS) представляват значително разширение на публикувания EBWS PHP-базиран сървър, осигуряващ полезни инструменти за анализи на ДНК, РНК и протеинови последователности. Шест нови уеб базирани аплети са свободно достъпни чрез ExBWS за потребителите. Те включват ДНК/РНК транслиране, AminoCODE трансформатор, виртуален PCR анализатор, хидрофобност на

протеинови секвенции, обратен транслатор на протеини и еукариотен търсач на отворени рамки на четене. Всеки аплет включва някаква нова функция. AminoCODE трансформаторът преобразува протеинови последователности от еднобуквено кодиране на трибуквено и обратното, виртуалният PCR анализатор генерира фрагменти със или без ДНК стърчащи крайща, хидрофобност на протеинови секвенции прави графики на хидропатия от 10 рамки от въведената от потребителя последователност, обратният транслатор преобразува протеини в ДНК в съответствие с най-високо предразположение за кодони, присъстващо в избрания организъм. Еукариотният търсач на отворени рамки на четене търси интрони сред въведената от потребителя последователност и транслира рамките на четене на процесирания последователност в протеинна. Всички програми са свободно достъпни на <http://penchovsky.atwebpages.com/applications.php>.

Компютърен дизайн на алостерични рибозими като молекулярни биосензори. Computational Design of Allosteric Ribozymes as Molecular Biosensors – Robert Pechovsky, 2014, Biotechnology Advances, Q1, IF – 11,866

Доказано е, че нуклеиновите киселини са много подходящи за проектиране на различни наноструктури и устройства. Докато синтетичните ДНКи обикновено се използват за самостоятелно свързване на наноструктури и устройства *in vitro*, функционалните РНКи, като рибозими, се използват както *in vitro*, така и *in vivo*. Алостеричните рибозими имат приложения в молекулярните изчисления, биосензорите, скрининговите масиви с висока пропускателна способност, екзогенния контрол на генната експресия и други. Те включват и изключват своята каталитична функция в резултат на конформационна промяна, индуцирана от свързване на лиганда. Дизайнерските рибозими са проектирани да реагират на различни ефектори чрез *in vitro* подбор, рационални и изчислителни методи на проектиране. Тук представям различни изчислителни методи за проектиране на алостерични рибозими с различни логически функции, които определят олигонуклеотиди или малки молекули.

Тези методи дават желаните рибозимни последователности за минути, за разлика от методите за селекция *in vitro*, които изискват седмици. Обсъждат се също методите за синтез и биохимично изследване на рибозимите.

Нанотехнологии базирани на нуклеинови киселини: инженерни принципи и приложения. Nucleic acids-based nanotechnology. Biomedical Engineering: Concepts, Methodologies, Tools, and Applications (book chapter) – Robert Penchovsky, 2017, IGI-Global

Нанобиотехнологията се очертава като важна област, която включва научните изследвания и технологиите за създаване на нови наноустройства и наноструктури с различни приложения в съвременната нанотехнология.

Приложенията на нанобиотехнологиите се използват в биомедицински и фармацевтични изследвания, биосензорирани, нанофлуиди, самосглобяване на наноструктури, нанофармацевтика, молекулни изчисления и други.

Доказано е, че нуклеиновите киселини са много подходяща среда за самостоятелно свързване на различни наноструктури и каталитични наноустройства за различни приложения. В тази глава авторите обсъждат различни приложения на нанотехнологиите, базирани на нуклеинови киселини. Областите, обсъждани тук, включват изграждане на наноструктури, използващи ДНК олигонуклеодити, самостоятелно свързване на интегрирани РНК-базирани наноприспособления за молекулни изчисления и диагностика, откриване на антибактериални лекарства, екзогенен контрол на генната експресия и заглушаване на гените.

Настоящи и бъдещи РНК базирани подходи в медицинската геномика. Present and Future RNA-based Approaches to Medical Genomics – Robert Penchovsky, 2013, Journal of Clinical & Medical Genomics, 2472-128X, Q4, IF – 0,58

Технологията, базирана на нуклеинови киселини се очертава като ценна област, която включва научните изследвания и технологиите за създаване на нови наноустройства и наноструктури с различни приложения в съвременната

нанотехнология. В наши дни приложението на РНК технологията е използването ѝ в биомедицински и фармацевтични изследвания, биосензорирани, нанофармацевтиката и други. Доказано е, че РНК е много подходяща среда за самостоятелно свързване на различни наноструктури, каталитични наноустройства и системи за вкарване в клетки. В същото време геномиката става все по-ценна за съвременната медицина поради напредъка, постигнат от секвенаторите от второ поколение. В този преглед обсъждам различни приложения на дизайнерски рибозими и различни подходи, базирани на РНК в медицинската геномика. Обсъжданите области включват РНК базирани подходи за молекулярно наблюдение и диагностика, откриване на антибактериални лекарства, екзогенен контрол на генната експресия и заглушаване на гените. Тези подходи станаха възможни поради усъвършенстването на различни методи за инженерни функционални РНК, както и откритията, направени в биологията на РНК. Освен това се разглеждат различни антисенс технологии, базирани на РНК, заедно с методите за синтез на нуклеинови киселини в клетката. Изследванията, които са правени досега в областта на РНК инженерството, имат осезаемо въздействие върху медицинската геномика, което е основният фокус на този преглед.

Инжениране на мрежи за генетичен контрол, синтезиране и редакция на геноми. Synthetic Approaches to Biology: engineering gene control circuits, synthesizing, and editing genomes, Emerging Research on Bioinspired Materials Engineering (book chapter) – [Robert Penchovsky](#) and [Martina Traykovska](#), 2016, IGI Global, 9781466698116

Нанобиотехнологиите и синтетичната биология се появяват като нови области, интегриращи изследвания от науката и технологията за създаване на нови организми с нови желани свойства. Ние представяме тук нови революционни методи от синтетичната биология, които ни позволяват да инженерваме мрежи за генетичен контрол, да редактираме геноми и да създаваме de novo цели организми. Създаването на нови геноми, които

функционират в клетката означава, че ние можем да създаваме нови организми, които са различни от наблюдаваните в природата. Синтетичните геноми могат да съдържат нови комбинации от гени, които предлагат възможности за създаване на нови биологични видове, които притежават заложената предварително комбинация от свойства. Следователно, синтетичните геноми могат да бъдат приети като нов вид материал. Методите за асемблиране на цел геном, прилагани до сега, комбинират няколко *in vitro* и *in vivo* стъпки, които притежават определени технически ограничения и недостатъци. В тази глава ние дискутираме всички технически аспекти на създаването на нови геноми и техните настоящи ограничения. Технологиите за редакция на геноми, базирани на CRISPR-Cas системата, които се развиват през последните години, също са дискутирани. В допълнение, ние представяме големи РНК-базирани методи за дизайн на мрежи за генетичен контрол както в прокариоти, така и в еукариоти, включително хора.

Хомолози на *Arabidopsis* към LRAT са възможен субстрат за разработване на нови ракови лекарства. *Arabidopsis* Homologues to the LRAT a Possible Substrate for New Plant-Based Anti-Cancer Drug Development – Dimitrios Kaloudas, [Robert Penchovsky](#), 2018, *International Journal of Biomedical and Clinical Engineering (IJBCE)*, 2161-1610

Тази статия описва как семейството на NC гените са идентифицирани в генома на *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) чрез хомология на човешката Лецитин-ретиналната ацилна трансфераза (LRAT) и протеина на пикорнавирус 2A. Протеините на *Arabidopsis* съдържат два мотива, идентифицирани в огромно разнообразие от организми, т.е. H-Vox и NC. Сред сродните протеини са *C. elegans* EGL-26, регулаторен протеин на клетъчната морфогенеза във вулвата и човешки протеини, които могат да бъдат свързани с клетъчна пролиферация или развитие. Човешките хомолози включват HRAS-подобни туморни супресори, индуцирани от Tazarotene ген 3 (TIG3) и десумоилираща изопептидаза (PNAS-4), която индуцира апоптоза в раковите клетки на белия дроб. Запазване на двата наблюдавани мотива в протеините

на Arabidopsis в хомология с туморни супресори и запазването на остатъците, важни за функцията на LRAT сред хомолозите на Arabidopsis, може да бъде показателно не само за значението на тези домейни за функцията на растителните протеини, но също така може да разкрие нова група за проектиране на разработване на лекарства, насочени към растителни тумори.

Клинични тествания на функционални нуклеинови киселини: антисенс олигонуклеотиди и аптамери. Clinical Trials of Functional Nucleic Acids: Antisense Oligonucleotides and Aptamers – Martina Traykovska, Sjoerd Miedema and Robert Penchovsky, 2018, International Journal of Biomedical and Clinical Engineering (IJBCI), 2161-1610

Тази глава описва как функционалните нуклеинови киселини като аптамери, антисенс олигонуклеотиди (ASOs), малки интерфериращи (si) РНК и рибозими се считат от някои изследователи за ценни инструменти за разработване на терапевтични средства. Те не са особено бързи за достигане на пазара като лекарства, поради ендогенни бариери за извънклетъчния трафик и клетъчното усвояване на нуклеиновите киселини и присъщата им нестабилност, когато се прилагат in vitro. Фармацевтичните компании преодоляват тези препятствия и това доведе до одобряването на няколко аптамери и ASOs като лекарства. Терапевтиците с нуклеинови киселини обикновено се прилагат локално на болна тъкан. Кандидатите за лекарства, които понастоящем са в клинични изпитвания, обикновено използват същите методи за администриране, както по-рано лицензирани лекарства с нуклеинови киселини. Тези техники за администриране носят своите рискове и предизвикателства. В тази статия се обсъжда настоящото състояние и са изброени перспективни варианти за използване на ASO и аптамери като лекарства.

Съединения, получени от растения и тяхната потенциална роля в развитието на лекарства. Plant-Derived Compounds and Their Potential Role in Drug Development – Dimitrios Kaloudas, Robert Penchovsky, 2018,

International Journal of Biomedical and Clinical Engineering (IJBCE), 2161-1610

Тази статия описва как с развитието на биотехнологиите растенията отново завоюват видно място като сравнително евтин източник за създаването на рекомбинантни фармацевтични продукти. Растителните съединения започнаха да играят основна роля във фармацевтичната промишленост, като много продукти на растителна основа намериха място в лекарствата и химикали, използвани за лечение на различни заболявания и техните симптоми. Съединенията, получени от растенията, са тествани за лечение на няколко вида рак, заболявания на централната нервна система, като подобрители по време на химиотерапия и като съдове за целенасочено създаване на лекарства. Генетично модифицираните растителни клетки се използват за производство на терапевтични агенти, както и за създаване на експресионни системи за вирусopodobни частици, които биха могли да се използват като ваксини. Освен това микроРНКи, имитиращи растителните, имат способността да инхибират тумори при бозайници. Тази публикация описва съединенията, получени от растенията, и техните свойства като потенциални терапевтични агенти и прекурсори за разработването на нови лекарства във фармацевтиката индустрия.

Интегрирана селекция на ДНК в реактори с микропоток като подход за молекулно изчисляване и диагностика. An Integrated DNA Selection in Micro-flow Reactors as an Approach for Molecular Computation and Diagnostics (book) - Robert Penchovsky, 2019, 978-619-91360-1

В резултат на първоначалната работа на Адлеман през 1994 г., бяха пуснати нововъведенията на ДНК изчисленията. Оттогава няколко проникателни изследователи работят за преодоляване на пропастта между молекулярната биология и теорията на изчисленията, за да се изгради практичен компютър, базиран на ДНК или РНК. Проведеното проучване за осъществимостта на компютри, базирани на ДНК и РНК, предизвика критична оценка на наличните в момента инструменти на молекулярната биология за техния потенциал за

молекулно изчисляване. Така се появи възможност за нов поглед върху някои от съществените биомолекулни процеси като селекция на ДНК, лигиране, амплификация и самосглобяване. Разработването на биотехнологии на чипове е споделено място между ДНК и РНК базирана диагностика и изчислителни процеси. Това е така, защото дължимото на двете приложения изискват висока степен на автоматизация и интегриране на голям брой молекулни процеси паралелно.

В тази теза се отчитат резултатите от разработването на нов подход към автоматизиран и интегриран многостъпален процес на селекция на ДНК, използващ микро-флуидни модули за избор на топчета. Подходът се основава на предложен нов микро-флуиден дизайн и нова обратима химия за многостъпален трансфер на ДНК хибридизация при изотермични условия. Микрофлуидният дизайн позволява програмирано прикрепване успоредно с различни ДНК олигомери (или други биомолекули) за мъниста, вградени в каскадно свързани микрореактори, чрез отделно подаване на ДНК олигомери и омрежаващ реагент. Използването на стъпка на инхибиране (чрез промяна на рН) на обездвижването на ДНК при смесване в кръстосани микроканални гарантира високо ниво на специфичност при адресиране на топчета, поставени в каскадно свързани камери с различни ДНК последователности. РН-обратим подход за специфичен за последователността трансфер на ДНК позволява многоетапна селекция от сложен пул от различни молекули на ДНК в реактивни каскадно свързани микропотоци, постигнати или чрез промяна на рН на изпомпваните разтвори или при условия на постоянен поток чрез преместване на магнитни топчета през разтвори с различно рН. Извършването на цялата процедура за подбор при постоянна температура позволява потенциално интегриране на много модули за избор в една част. Методът използва кинетиката на бързата ДНК хибридизация на топчетата при поточни условия и необходимите малки стойности на пробата. Ефективността и верността на трансфера на ДНК хибридизация са демонстрирани между два модула за микро-флуидна селекция. Подходът е подходящ за интегрирани приложения в областта на изчисляването и диагностиката на ДНК.

Дванадесет-битова ДНК библиотека, проектирана според термодинамичните ограничения, е експериментално конструирана и тествана с помощта на инструменти за молекулярна биология. Резултатите показват високо ниво на специфична хибридизация, постигната с всички битови битове при идентични условия.

Проектиране на лекарства, които преодоляват антибактериалната резистентност: къде сме и какво трябва да правим? Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do? – Robert Penchovsky and Martina Traykovska, 2015, Expert opinion on drug discovery, 1746-0441, Q1, IF – 4,66

През последните години инфекциите, причинени от многорезистентни бактериални патогени, се превърнаха в огромен проблем за обществените здравни системи. Всъщност злоупотребата с антибиотици доведе до появата на редица устойчиви бактериални щамове, включително *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli* и *Mycobacterium tuberculosis*. За съжаление, усилията за производство на нови антибиотици не са били достатъчни, за да се справят с появата на тези нови резистентни на антибиотици (AR) щамове.

Наръчник за изследвания на нанонауките, нанотехнологиите и съвременните материали. Handbook of Research on Nanoscience, Nanotechnology, and Advanced Materials (book) –Robert Penchovsky 2014, Engineering science reference: An Imprint of IGI Global, 146665824X

Нанобиотехнологията се очертава като ценна област, която интегрира научните изследвания и технологиите за създаване на нови наноустройства и наноструктури с различни приложения в съвременната нанотехнология. Приложенията на нанобиотехнологиите се използват в биомедицински и фармацевтични изследвания, биосензорирани, нанофлуиди, самосглобяване

на наноструктури, нанофармацевтиката, молекулни изчисления и други. Доказано е, че нуклеиновите киселини са много подходяща среда за самостоятелно сглобяване на различни наноструктури и каталитични наноустройства за различни приложения. В тази глава авторите обсъждат различни приложения на нанотехнологиите на базата на нуклеини. Областите, обсъждани тук, включват изграждане на наноструктури, използващи ДНК олигонуклеодит, самостоятелно сглобяване на интегрирани РНК-базирани наноприспособления за молекулни изчисления и диагностика, откриване на антибактериални лекарства, екзогенен контрол на генната експресия и заглушаване на гените.

Computational selection and experimental validation of allosteric ribozymes that sense a specific sequence of human telomerase reverse transcriptase mRNAs as universal anticancer therapy agents – Robert Penchovsky, Kostova GT., 2013, Nucleic Acid Ther, IF – 2,338

Високите експресионни нива на РНК на обратната транскриптаза на теломераза в диференцирани клетки могат да бъдат използвани като общ маркер за развитие на рак. В този документ ние описваме нов изчислителен метод за подбор на алостерични рибозими, които имат специфична последователност на мРНК на обратна теломераза с обратна транскриптаза. Използваният *in silico* подбор се основава на изчисляване на вторични структури на РНК, използвайки функцията на дял в комбинация с алгоритъм за произволно търсене. Избрахме един от рибозимите за експериментално валидиране. Получените резултати показват, че тестваният рибозим има високоскоростна (~1,8 на минута) самоизчистване и е много селективен. Той може да различава добре между перфектно съвпадащ ефект и най-близката експресирана РНК последователност в човешката клетка с 10 несъответствия, с ~300-кратна разлика при физиологично релевантни условия. Представеният алгоритъм е универсален, тъй като алостеричните рибозими могат да бъдат проектирани да усещат всяка конкретна РНК или ДНК последователност от интерес. Такива дизайнерски рибозими могат да се използват за наблюдение

на експресията на мРНК в клетката и за разработване на нови противоракови генни терапии.

ДНК библиотечен дизайн за молекулярно изчисление. DNA library design for molecular computation – Robert Penchovsky and Jorg Ackerman, 2003, J Comput Biol, 10665277, Q1, IF – 1,232

Представен е нов подход за проектиране на ДНК библиотека за молекулярно изчисляване. Методът се използва за кодиране на двоична информация в молекулите на ДНК. Той има за цел да постигне практическа дискриминация между перфектно съчетаните ДНК олигомери и тези с несъответствия в голям пул от различни молекули. Подходът отчита способността на нишките на ДНК да се хибридизират в сложни структури като шпилки, вътрешни бримки или изпъкнали контури и изчислява стабилността на хибридите, формирани въз основа на термодинамични данни. Прилага се алгоритъм за динамично програмиране за изчисляване на функцията на разделяне за ансамбъл от структури, които играят роля в реакцията на хибридизация. Приложимостта на метода е демонстрирана от дизайна на 12-битова ДНК библиотека.

Библиотеката е изградена и експериментално тествана с помощта на инструменти за молекулярна биология. Резултатите показват високо ниво на хибридизация на постигнато за всички части на библиотеката при идентични условия. Методът е приложим също за проектиране на праймери за PCR, ДНК последователности за изотермични амплифицирани катионни реакции и улавяне на сонди в масиви от ДНК-чип. Библиотеката може да бъде приложена за изчисляване на интегрирана ДНК на дванадесет битни случаи на NP-пълни комбинаторни проблеми чрез многоетапна селекция на ДНК в микропоточен реактор.

Каскаден трансфер на хибридизация на специфична ДНК между модулите за селекция на микрореактори. Cascadable hybridisation transfer of specific DNA between microreactor selection modules – Robert

Penchovsky and John S. McCaskill, 2002, Lecture Notes in Computer Sciences, 03029743, Q2, IF

Документът демонстрира експериментално основния принцип на трансфера на ДНК между етапите на селекция на базата на магнитни топчета, които могат да бъдат използвани в стабилни собствени микрореактори за изчисляване на ДНК и молекулярна диагностика. Използват се къси ДНК олигомери, които могат да се прикачат ковалентно към магнитни зърна чрез лека програмируема фотохимична процедура, за да се свържат с ssDNA с fl дължащ разтвор. Пръчките се задържат в две реакционни камери (модули) чрез первази в свързан микрореактор, изработен от силиций и стъкло, като разтворите се дължат в затворени микроканални. Действието на стабилна мрежа от селекционни модули се изучава в този двукамерен микрореактор, като се използват последователност от различни разтвори за по-голямо разреждане при променлив рН, за да се симулира прехвърлянето между паралелни потоци в бившата система. Промените в рН предизвикват последователна хибридизация и дисоциация на ssDNA до съвпадащи последователности на топчетата. Откриването на ДНК става чрез флуоресценция от белязана с родамин прицелна ДНК. Резултатите демонстрират успешния подбор на специфична ДНК в един модул и последващото му прехвърляне към магнитни зърна на втори модул. Това потвърждава биохимичната работа на основния етап на обработка за оптически програмируеми ДНК изчисления в микро-собствени реактори.

Крайно специфична ковалентна фотозависима имобилизация на синтетична ДНК до парамагнитни топчета. End-specific covalent photo-dependent immobilisation of synthetic DNA to paramagnetic beads – Robert Penchovsky, E. Birch-Hirschfeld and John S. McCaskill, 2000, *Nucleic Acids Res.*, 1362-4962, Q1, IF – 9,338

Описан е нов подход за фотозависима ковалентна имобилизация на синтетични ДНК олигомери към аминокритни парамагнитни топчета. Хетеро-

бифункционален фото-реактивен омрежаващ химикал, 4-нитрофенил-3-диазопируват, се прилага за прикрепване на 5'амино-модифицирана ДНК както на силикагел, така и на парамагнитни топчета от полистирол. Добивът на свързване е сравними с подобни методи, при които не се използва фотореактивна химическа добавка. Иммобилизираната ДНК върху полистиреновите и силициевите перли се използва ефективно в хибридизационните експерименти. Разширяването на този подход към обездвижване, насочено към светлината на специфична ДНК към топчета, разположени на различни позиции в реакторите с микропоток, отваря редица интегрирани приложения за комплексна диагностика, еволюционна биотехнология и нови области като изчисляване на ДНК.

2. Биоинформатика и молекулна еволюция

Изчислително проектиране и експериментално валидиране на олигонуклеотидни чувствителни алостерични рибозими. Computational design and experimental validation of oligonucleotide-sensing allosteric ribozymes – Robert Penchovsky & Ronald R Breaker, 2005, Nature Biotechnology, 10870156, Q1, IF – 43,5

Алостеричните РНКи действат като молекулни превключватели, които променят своите вторични структури и функции в отговор на свързването с лиганд. Общи типове природни алостерични РНК са рибопревключвателите. Като дизайнерски РНКи с подобни свойства могат да бъдат създадени чрез РНК инженерство. Ние описваме изчислителен подход за проектиране на алостерични рибозими, реагиращи на специфични олигонуклеотиди. Четири универсални видове РНК превключватели, притежаващи И, ИЛИ, ДА и НЕ булеви логически функции са създадени в модулна форма, което позволява специфичността на лиганда да се промени без да се променя каталитичната основа на рибозимата. Всички изчислени алостерични рибозими са синтезирани и експериментално *in vitro*. Разработените рибозими показват по-голямо от 1000 пъти активиране, демонстрират точна специфичност към лиганда, и могат да функционират в молекулни вериги, където самостоятелно

разцепване на една РНК води до действие на втора рибозима. Тази подход осигурява бърз и евтин начин за създаване на алостерични РНК за изграждане на сложни молекулни вериги и за създаване на елементи за синтетичен контрол на генна експресия.

Нещо повече, резултатите от тази публикация са определени като “groundbreaking” от проф. Милан Стоянович от Колумбийския университет, САЩ - Margolin, A.A. & Stojanovic, M.N. Boolean calculations made easy (for ribozymes). *Nature Biotechnology*, 23, 1374-1376 (2005) – приложена. Това е голямо признание, защото това е първият създаден алгоритъм за компютърен дизайн на алостерични рибозими.

Този алгоритъм е патентован в *Computational Design of Ribozymes*. WIPO Patent Application WO/2008/127382. Pages:1-86 - Б3.9.
и *Computational Design of Ribozymes*. US20110288826 - Б3.10

Геномно-биоинформатичен анализ на FMN, SAM-I, glmS, TPP, лизин, пурин, кобаламин и SAH рибопревключвателите за тяхното приложение като алостерични антибактериални лекарствени цели в човешки патогенни бактерии. Genome-wide bioinformatics analysis of FMN, SAM-I, glmS, TPP, Lysine, Purine, Cobalamin, and SAH riboswitches for their applications as allosteric antibacterial drug targets in human pathogenic bacteria – Nikolett Pavlova, Robert Penchovsky, 2019, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, Q1, IF – 4,5

Цели: Непрекъснато нарастващият брой резистентни на антибиотици щамове на патогенни бактерии при човека е сериозен проблем. Продължителните заболявания и нарастващата смъртност в световен мащаб означават спешна необходимост от разработване на нови антибактериални лекарства, базирани на нови цели и механизми на действие. Представяме *in silico* анализи на бактериални рибопревключватели, които могат да бъдат подходящи като антибактериални лекарствени цели. Методи: Повечето бактериални рибопревключватели са алостерични цис-действащи генни контролни

елементи, разположени в 5'-нетранслирана област на информационната РНК. Рибопревключвателите усещат специфични метаболити и регулират синтеза на някои основни клетъчни метаболити в много патогенни бактерии, но не се намират при хората. Представяме пълен и изчерпателен биоинформатичен анализ в целия геном за подхождането на осем рибопревключватели като антибактериални лекарствени цели в различни патогенни бактерии. Резултати: Въз основа на нашите *in silico* анализи класифицираме рибопревключвателите в четири различни групи въз основа на тяхната годност да бъдат използвани като антибактериални лекарствени цели. Ние сме изчислили, че FMN, SAM-I, glmS, TPP и лизинов рибопревключватели са обещаващи цели за откриване на антибактериални лекарства. Заключение: Това изследване ни позволява да фокусираме изследванията за откриване на антибактериални лекарства само върху онези рибопревключватели, чието инхибиране ще доведе до потискане на растежа на определени патогенни бактерии.

EBWS: Основни биоинформатични уеб услуги за анализи на последователности. EBWS: Essential Bioinformatics Web Services for Sequence Analyses – Dimitrios Kaloudas, Nikolet Pavlova, Robert Penchovsky, 2018, IEEE Transactions on Computational Biology and Bioinformatics, 1557-9964, Q1, IF – 2,4

Основните биоинформатични уеб услуги (EBWS) са внедрени на нов сървър, базиран на PHP, който предоставя полезни инструменти за анализ на ДНК, РНК и протеинови последователности чрез прилагане на удобен за потребителя интерфейс. В момента има девет уеб базирани аплета достъпни на уеб сървъра. Те включват обратна комплементарна ДНК и произволни ДНК/РНК/пептидни олигомерни генератори, търсачка за мотивни секвенции, рязане с ДНК рестриктаза, прокариотна ORF (отворена рамка на четене) търсачка и произволен ДНК/РНК мутационен генератор. Той също така включва калкулатора на температура на топене (T_m) на ДНК /ДНК, РНК/РНК и ДНК/РНК хибриди, генератор за водеща РНК (gRNA) за CRISPR / Cas9 системата и калкулатор за температурата на свързване за мултиплексна PCR. Аpletът за търсене на модели няма ограничения в броя на мотивните входове и прилага кутия с инструменти Regex, които могат да бъдат използвани за дефиниране на

сложни заявки за последователност на РНК, ДНК и протеинови последователности. Програмата за усвояване на ДНК ензимите използва голяма база данни от 1502 рестрикционни ензими. Генераторът за водеща РНК има база данни с 25 бактериални генома, които могат да се търсят за gRNA целеви последователности и има опция за търсене във всяка последователност на генома, зададени от потребителя. Всички програми са постоянно достъпни онлайн на <http://penchovsky.atwebpages.com/> без ограничения.

RSwitch: нова база данни за биоинформатика на рибопревключвателите като антибактериални лекарствени мишени.

RSwitch е MySQL база данни, реализирана на базиран на PHP сървър, която също предоставя различни полезни инструменти за анализи на ДНК, РНК и протеинови последователности, използвайки удобен за потребителя интерфейс. В момента базата данни на RSwitch съдържа информация и пояснения за 215 бактериални рибопревключватели от 16 различни типа, открити в 50 човешки патогенни бактерии. Класовете рибопревключватели включват ФМН, glmS, кобаламин, лизин, SAH, SAM, пурин, TPP, c-di-GMP I, c-di-GMP II, Мосо, PreQ1, флуорид, глицин, Mg²⁺ и Mn²⁺ тип бактериални рибопревключватели. Базата данни предоставя информация за последователностите на аптамера на рибопревключвателя, термодинамичните последователности за функция на структурите на РНК, и за функция за свободна минимална енергия. Освен това базата данни представя централната структура и позиционната ентропия за всяка позиция на последователностите на аптамера. Базата данни предоставя също биохимичните пътища, в които са включени рибопревключвателите, както и множество подравнявания на последователности, бактериални щамове за устойчивост към лекарства и консенсусни мотиви за всеки тип превключватели. Базата данни на RSwitch е постоянно достъпна онлайн без ограничения. Тази биоинформатична база данни предоставя за първи път цялата информация, необходима за оценка на годността на представените рибопревключватели като антибактериални лекарствени мишени.

3. Молекулярна генетика на бактерии

Разработка и прилагане на високопроизводителна проба за активатора на glmS превключвателя. Development and application of a high-throughput assay for glmS Riboswitch Activators – Kennet Blount, Izabela Puskarz, Robert Penchovsky, Ronald Breaker, 2006, RNA Biol, 15558584, Q1, IF – 5,546

Рибопревключвателите са новооткритите елементи за контрол на генна експресия, които са обещаващи за разработване на нови антибактериални лекарства. За да се улесни бързото откриване и разработване на антибактериални лекарства, базирани на съединения, атакуващи бактериални рибопревключватели, трябва да се използват съвременни техники като високопроизводителен скрининг. Един обещаващ рибопревключвател е glmS, който при свързване с глюкозамин-6-фосфат (GlcN6P) функционира като рибозима и катализира самостоятелно разцепване. Това е първата открита метаболитно активизируема рибозима в природата. Тук ние показваме развитието на висока производителност чрез анализ на glmS рибозимата, който разчита на флуоресцентен резонансен енергиен трансфер. Този анализ може да се използва за скрининг на съединения, които се свързват и активират glmS рибозимата. Ние демонстрираме, че анализът може да идентифицира активните съединения от библиотека на GlcN6P аналози, чиито афинитет към рибозимата се определя чрез използването на електрофореза с радиоактивно белязана РНК. Освен това, ние използваме библиотека от 960 съединения, предварително одобрени за използване при хора. В резултат на тези експерименти са идентифицирани пет активни съединения, едно от които е аналог на GlcN6P, и които стимулират рибозимната активност. Тези резултати показват, че модерни високопродуктивни скрининг техники могат да бъдат приложени за откриването на лекарствени съединения, насочени към тази рибозима.

Откриване на антибактериални лекарства на базата на рибопревключватели чрез методи за скрининг с висока пропускателна способност. Riboswitch-based antibacterial drug discovery using high-

**throughput screening methods – Robert Penchovsky, Stoilova CC. 2013,
Expert Opinion on Drug Discovery, 1746-0441, Q1, IF – 4,676**

Бактериални рибопревключватели са структурирани РНК домейни, обикновено пребиваващи в 5' района на иРНКи, които могат пряко да се свързват с специфични метаболити. Те служат като елементи за регулиране на генната експресия. В резултат на действието на рибопревключвателите, иРНКи могат да регулират своята експресия, без да е необходимо наличието на регулаторни протеини. Първите рибопревключватели са открити само преди десет години. През последното десетилетие, повече от дузина различни класове рибопревключватели са идентифицирани в много бактериални видове, като броят им продължава да расте. Тези констатации показват, че бактериите използват широко РНК превключвателите за долавяне на промените в клетъчната физиология и регулират метаболитните си процеси. Различни класове рибопревключватели са открити в 36 човешки бактериални патогена, които контролират синтезата на основни клетъчни метаболити, както се обсъжда в тази публикация. Поради това, някои рибопревключватели може да се използват за откриване на нови антибиотици. В този преглед, ние представяме настоящите и евентуалните бъдещи подходи за използване на рибопревключватели в процеса на разработване на нови лекарства. Ние разглеждаме основните механизми за контрол на генна експресия чрез бактериални рибопревключватели. Във връзка с това, фокусът е насочен към адаптиране на различни ин силико, ин витро и ин виво високопродуктивни скрининг методи за сондиране на специфични рибопревключватели. Ние разглеждаме най-обещаващите рибопревключватели, които могат да бъдат използвани за справяне с все по-нарастващата необходимост от нови антибиотици.

НАИМЕНОВАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО 112506-17.05.2017г., публикуван на 02.01/15.02.2019, одобрен на 22.01.2020 г.

Използване на химерни антисенс олигонуклеотиди антибактериално действие

ИМЕНА НА СЪЗДАТЕЛЯ

Роберт Димитров Пенчовски

ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА: Развитие на антибактериални агенти чрез употребата на химерни антисенс олигонуклеотиди, заедно с пептиди, проникващи в клетката, които се свързват със специфични бактериални РНК и инхибират техните функции.

Рибопревключватели - разпределение, структура и функциониране бактериите. Riboswitch distribution, structure, and function in bacteria – Nikolet Pavlova, Dimitrios Kaloudas, Robert Penchovsky, 2019, Gene, 0378-1119, Q1, IF – 2,5

Рибопревключвателите са генни контролни елементи, които директно се свързват със специфични лиганди, за да регулират генната експресия без нуждата от протеини. Те се намират във всичките три области на живота, включително Бактерии, Археи и Еукариоти. Рибопревключвателите са разпространени предимно в бактерии и археи. В този документ обсъждаме общото разпределение, структурата и функцията на 28 различни класове рибопревключватели, като фокусираме вниманието си върху рибопревключвателите в бактериите. Бактериалните рибопревключватели регулират генната експресия чрез четири различни механизма. В тази публикация ние обсъждаме общото разпределение, структура и функция на 28 различни класа рибопревключватели като фокусираме вниманието си на рибопревключвателите при бактериите. Те регулират експресията на ограничен брой гени. Въпреки това, повечето от тези гени са отговорни за синтеза на основни метаболити, без които клетката не може да функционира. Следователно разпределението на рибопревключвателите също е важно за разработването на антибактериални лекарства

РНК като ефикасна цел за откриване на антибактериални лекарства. 16. RNA as A Potent Target for Antibacterial Drug Discovery – Katya B Popova, Lozena A Otcheva, Martina Traykovska and Robert Penchovsky, 2018,

Biomedical Journal of Scientific and Technical Research, 2574-1241, Q4, IF – 0,548

Разработването на нови антибиотици се превръща в истински спешна ситуация поради нарастващия брой многорезистентни патогенни бактерии. Това също е глобален проблем поради масовото производство и приложението на различни антибиотици, както в хуманната, така и във ветеринарната медицина.

Следователно, ние трябва не само да създадем нови антибиотици, но и да ускорим процесите за развитието им. Това може да бъде постигнато чрез използване на нови цели за откриване на антибактериални лекарства. В тази публикация-ревью ние фокусираме вниманието си върху няколко различни типа молекули РНК, които са били използвани като антибактериални лекарствени цели. РНК е най-нееднозначният биополимер в клетката, който носи много различни функции. Например, тРНК, рРНК и иРНК са от съществено значение за генната експресия както в про-, така и в еукариотите. Въпреки това, всички тези видове РНК имат последователности и 3D структури, които са специфични само за бактериите и могат да се използват за спиране на основните биохимични процеси само в бактериите. Всички тези характеристики правят РНК много мощна мишена за развитие на антибактериални лекарства.

Механизми на лекарствена устойчивост и подходи за преуодоляване.

Mechanisms of Drug resistance and Approaches to overcome it (book chapter) – 2019, Elsevier

В тази глава дискутираме световната заплаха, поради появата на бактериални щамове с множествена устойчивост към антибиотици и какво можем да направим, за да смекчим нарастващата опасност. За да се справим с нарастващата опасност от щамове с множествена устойчивост, трябва да намалим световната употреба на антибиотици в човешката и ветеринарната медицина. В допълнение, трябва да ускорим механизма за развиване на нови антибиотици. За да постигнем това може да се наложи да използваме нови механизми за действие на лекарствата и тяхната доставка и да използваме нови антибактериални мишени за лекарства. Тук също дискутираме ключови

механизми на антибактериалното действие на лекарствата, развитието и разпространението на антибактериална резистентност, и най-спешните за преборване бактериални щамове с множествена устойчивост.

Стратегии за превенция и удържане на антимикробна резистентност. Mitigation of Antimicrobial Resistance, Springer

В тази глава дискутираме всички важни стратегии за превенция и удържане на антимикробната резистентност, която е нарастващ проблем за здравната система по света. Тук дискутираме рисковите фактори и механизми за развитие и начини на разпространение на антимикробна резистентност. Ние се фокусираме върху разнообразни стратегии за превенция на появилата се антимикробна резистентност чрез редукция на селективния натиск на патогенните бактерии. Тази глава също представя различни стратегии за удържане на широко разпространени инфекции с бактерии, устойчиви на антибиотици, включително международно признати указания за прилагане на антибиотици. Представената широка научна област от превенция за ограничаване на антимикробната резистентност би била в интерес и за учени и за лекари, работещи или интересуващи се от тези сфери.

4. Микрореактори и тяхното приложение в геномиката 30.

Програмируеми и автоматизирани микрофлуиди на основата на топчета за многостранни ДНК микроретрита при изотермични условия Programmable and automated bead-based microfluidics for versatile DNA microarrays under isothermal conditions – Robert Penchovsky, 2013, Lab on a chip, 14730197, Q1, IF – 6,045

Напредъкът в съвременната геномика е силно зависим от приложенията на различни устройства за автоматизирани и високо пропускателни анализи на ниво ДНК, РНК и протеини. Микро- и нанореакторите предлагат възможности за миниатюризация и интегриране на различни аналози върху едно единствено устройство. Поради това, тези устройства стават платформа за избор за разработване на аналитични инструменти за съвременните биотехнологии. Тази публикация представлява прилагането на Микрофлуидна платформа за

напълно автоматизирани и програмируеми ДНК микрочипове с използването на магнитни микро топчета . Устройствата са предназначени за работа при изотермични условия. ДНК хибридизация се извършва под постоянна температура с обратими промени на рН на реакционните разтвори. Това дава възможност за интегриране на повече модули за подбор на един чип в сравнение със случаите, при които се поддържа температурен градиент. Тази нова технология позволява интегрирането на много модули на един чип, както и многократна употреба на ДНК- чиповете, което води до намаляване на разходите. Методът се възползва от доказаните високи скорости на ДНК хибридизация и денатурация в условията на непрекъснато течение на разтворите, както и от и малките обеми на пробите.

Микрофлуидните устройства са приложени за SNP анализи, както и за ДНК секвениране чрез синтеза без да е необходима стъпка за отстраняване на флуоресцентно багрило. Освен това, микрочиповете могат да бъдат приложени в много други области на съвременната биотехнология, включително биосензорни устройства, ДНК микрочипова хибридизация, молекулярни компютри, *in vitro* селекция на функционални нуклеинови киселини, високопродуктивен скрининг на химични библиотеки за откриване на лекарства и други подобни.

Автоматизиран трансфер на хибридизация на ДНК с подвижни суперпарамагнитни микротопчета в микрофлуиден реактор. Automated DNA hybridization transfer with movable super-paramagnetic microbeads in a microflow reactor – [Robert Penchovsky](#), 2019, Biosensors and Bioelectronics, 0956-5663, Q1, IF – 8,17

Автоматизиран трансфер на хибридизация на ДНК в реактор в микрофлуиден реактор е показан чрез преместване на парамагнитни топчета между два пространствено отделени разтвора с различни стойности на рН.

Микрофлуидната платформа, базирана на микротопчетата, е напълно автоматизирана и програмируема. Тя използва стабилна химическа процедура за специфична хибридизация на ДНК

трансфер в микрофлуидни устройства при изотермични условия на базата на обратими изменения на рН. Методът се възползва от високоскоростната ДНК хибридизация и денатуриране на топчета при поточни условия, висока вярност на ДНК хибридизация и малки обеми на пробата. Представената микрофлуидна платформа е продаваема и приложима в много области на съвременната биотехнология, като микрочипове за ДНК хибридизация, молекулярно изчисляване, подбор върху чиповете на функционални нуклеинови киселини, скрининг на химическите библиотеки за откриване на лекарства и амплификация и секвениране на ДНК.

Клинични тествания на функционални нуклеинови киселини: антисенс олигонуклеотиди и аптамери. Clinical Trials of Functional Nucleic Acids: Antisense Oligonucleotides and Aptamers – Martina Traykovska, Sjoerd Miedema and Robert Penchovsky, 2018, International Journal of Biomedical and Clinical Engineering (IJBCI), 2161-1610

Тази глава описва как функционалните нуклеинови киселини като аптамери, антисенс олигонуклеотиди (АСОи), малки интерфериращи (si) РНК и рибозими се считат от някои изследователи за ценни инструменти за разработване на терапевтични средства. Те не са особено бързи за достигане на пазара като лекарства, поради ендогенни бариери за извънклетъчен трафик и клетъчно усвояване на нуклеиновите киселини и присъщата им нестабилност, когато се прилагат *in vitro*. Изследванията, проведени от общността на инженеращите нуклеинови киселини и фармацевтичните компании за заобикаляне на тези препятствия, доведоха до одобрение на няколко аптамери и АСОи като лекарства. Терапевтиките на базата на нуклеинови киселини обикновено се прилагат локално при болна тъкан. Кандидатите за лекарства, които понастоящем са в клинични тествания, обикновено използват същите методи за администриране, както по-рано лицензирани терапевтици с нуклеинова киселина. Тези техники за администриране носят своите рискове и предимства за безопасността. В тази статия се обсъжда настоящото

състояние и са изброени перспективни варианти за използване на АСОи и аптамери като лекарства.

С червен цвят са приносите базирани на публикации за професурата.

С черен цвят са приносите базирани на публикации за професурата.

гр. София

подпис:

24.01.2020 г.

доц. д-р Роберт Димитров Пенчовски