

16. Резюмета на рецензираните публикации на български и на един от езиците, които традиционно се ползват в съответната научна област (в един документ)

на доц. д-р Роберт Димитров Пенчовски

- Синтетична биология
- Биоинформатика и молекулна еволюция
- Молекулярна генетика на бактерии

1. Синтетична биология

Автоматизиран трансфер на хибридизация на ДНК с подвижни суперпарамагнитни микротопчета в микрофлуо 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 микрофлуо 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.

An automated DNA hybridization transfer in a microflow reactor is demonstrated by moving paramagnetic beads between two spatially separate solutions with different pH values. The microbeads-based microfluidic platform is fully automated and programmable. It employs a robust chemical procedure for specific DNA hybridization transfer in microfluidic devices under isothermal conditions based on reversible pH alterations. The method takes advantage of high-speed DNA hybridization and denaturation on beads under flow conditions, high fidelity of DNA hybridization, and small sample volumes. The microfluidic platform presented is saleable and applicable to many areas of modern biotechnology such as DNA hybridization chip microarrays, molecular computation, on-chip selection of functional nucleic acids, high-throughput screening of chemical libraries for drug discovery, and DNA amplification and sequencing.

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 vivo*. 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. Терапевтиците 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.

This chapter describes how functional nucleic acids, such as aptamers, antisense oligonucleotides (ASOs), small interfering (si) RNAs, and ribozymes are considered by some researchers as valuable tools to develop therapeutic agents. They have not been particularly fast in reaching the market as medicines, due to endogenous barriers to extracellular trafficking and cellular uptake of nucleic acids and their inherent instability when applied *in vivo*. However, research carried out by the nucleic acid engineering community and pharmaceutical companies to circumvent these obstacles has led to the approval of a few aptamers and ASOs as drugs. Nucleic acid therapeutics are usually administered locally to diseased tissue. The drug candidates currently in clinical trials commonly use the same administration methods as previously licensed nucleic acid therapeutics. These administration techniques carry their own safety risks and advantages. In this article, the present state is discussed and prospective options for the use ASOs and aptamers as drugs are listed.

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.

In the last decade, antibacterial drug resistance has emerged as a major challenge to modern medicine due to the rise of many bacterial pathogenic strains that are resistant to many antibiotics. Here, we present a novel strategy for the design and applications of antisense oligonucleotides (ASOs) as novel antibacterial agents that target specific bacterial mRNAs. The ASOs are coupled with cell penetrating oligopeptides that deliver them into the cell. We use several different mRNAs as molecular targets. These mRNAs are responsible for the function of different biosynthetic pathways in bacteria that synthesize essential metabolites. We demonstrate a growth inhibition of various pathogenic bacteria, including *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* by our ASOs. Our approach is very promising since we have achieved 100% efficiency of the bacteria growth inhibition by our designer ASOs. We believe that our approach for engineering novel synthetic

antibacterial agents based on ASOs is applicable to the rapid development of novel classes of antibiotics.

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 аplet 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>.

The extended bioinformatics web services (ExBWS) represent a significant extension of the published EBWS PHP-based server providing useful tools for analyses of DNA,

RNA, and protein sequences. Six new web-based applets are freely available via the ExBWS to the user. They include a DNA/RNA translator, an AminoCODE transformer, a virtual PCR analyser, a protein hydropathy plotter, protein reverse translator, and a Eukaryotic ORF finder. Each applet includes some novel feature. The AminoCODE transformer takes a protein sequence from one letter code to three and vice versa, the virtual PCR analyser generates fragments with or without overhangs, the protein hydropathy plotter makes hydropathy plots of 10 frames of the input sequence, the reverse translator converts proteins to DNA according to the highest codons bias present in the selected organism. The Eukaryotic ORF finder searches for introns in the query sequence and translates ORFs of the processed sequence into proteins. All programs are freely available at <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.

Nucleic acids have proven to be a very suitable medium for engineering various nanostructures and devices. While synthetic DNAs are commonly used for self-assembly of nanostructures and devices *in vitro*, functional RNAs, such as ribozymes, are employed both *in vitro* and *in vivo*. Allosteric ribozymes have applications in molecular computing, biosensing, high-throughput screening arrays, exogenous control of gene expression, and others. They switch on and off their catalytic function as a result of a conformational change induced by ligand binding. Designer ribozymes are engineered to respond to different effectors by *in vitro* selection, rational and computational design methods. Here, I present diverse computational methods for designing allosteric ribozymes with various logic functions that sense oligonucleotides or small molecules. These methods yield the desired ribozyme sequences within minutes in contrast to their *in vitro* selection methods, which require weeks. Methods for synthesis and biochemical testing of ribozymes are also discussed.

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.

Nucleic acids-based technology is emerging as a valuable field that integrates research from science and technology to create novel nanodevices and nanostructures with various applications in modern nanotechnology. Nowadays, applications of RNA-based technology are employed in biomedical and pharmaceutical research, biosensing, nanopharmaceutics and others. It has been proven that RNA is a very suitable medium for self-assembly of diverse nanostructures, catalytic nanodevices and cell delivery systems. At the same time, genomics is becoming increasingly valuable for modern medicine due to the advancements made by second generation sequencing technologies. In this review, I discuss various applications of designer ribozymes and diverse RNA-based approaches to medical genomics. The areas discussed include RNA-based approaches for molecular sensing and diagnostics, antibacterial drug discovery, exogenous control of gene expression, and

gene silencing. These approaches have become possible due to the advancement of various methods for engineering functional RNAs as well as the discoveries made in RNA biology. Furthermore, different RNA-based antisense technologies are reviewed together with methods for nucleic acid delivery to the cell. The research that has been done so far in the field of RNA engineering has a far-reaching impact on medical genomics, which is the main focus of this review.

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 нови организми с нови желани свойства. Ние представяме тук нови революционни методи от синтетичната биология, които ни позволяват да инженерим 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 развива 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.

Nanobiotechnology and synthetic biology are emerging as novel fields that integrate research from science and technology to create novel organisms with new desired properties. We present here the new revolutionary methods of synthetic biology that enable us to engineer gene control circuits, edit genomes, and create de novo whole genomes. The creation of new genomes that function in the cell means that we can create new organisms that are different from those observed in nature. The synthetic genomes can contain novel combinations of genes that offer the opportunities to create novel biological species that possess predefined combination of properties. Therefore, the synthetic genomes can be regarded as a new kind of materials. The methods for whole genome assemble applied so far combined several in vitro and in vivo steps that possess certain technical limitations and shortcomings. In this chapter, we discuss all technical aspects of assembling novel genomes and their current limitations. The genome editing technologies that have been developed over the last several years based on the CRISPR-Cas system is also discussed. In addition, we present major RNA-based methods for design of gene control circuits both in prokaryotes and eukaryotes, including humans.

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-Box 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.

This article describes how an NC gene family has been identified in the genome of the *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) by homology to the human Lecithin Retinal Acyl Transferase (LRAT) and the picornavirus 2A protein. The *Arabidopsis* proteins contain two motifs identified in a vast variety of organisms, an H-Box and an NC. Among related proteins are the *C. elegans* EGL-26, a regulator protein of cell morphogenesis in the vulva region, and human proteins that might be related to cell proliferation or development. Human homologues include HRAS-like tumoursuppressors, the Tazarotene-induced gene 3 (TIG3), and a deSumoylating Isopeptidase (PNAS-4) that induces apoptosis in lung cancer cells. Preservation of the two motifs observed in the *Arabidopsis* proteins in homology to tumour suppressors, and the conservation of residues important for the function of the LRAT amongst the *Arabidopsis* homologues can be indicative not only of the importance of these domains for the function of the plant proteins but can also reveal a new candidate group for the design of plant-based tumour-targeting drug development.

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 vivo*. 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.

This chapter describes how functional nucleic acids, such as aptamers, antisense oligonucleotides (ASOs), small interfering (si) RNAs, and ribozymes are considered by some researchers as valuable tools to develop therapeutic agents. They have not been particularly fast in reaching the market as medicines, due to endogenous barriers to extracellular trafficking and cellular uptake of nucleic acids and their inherent instability when applied *in vivo*. However, research carried out by the nucleic acid engineering community and pharmaceutical companies to circumvent these obstacles

has led to the approval of a few aptamers and ASOs as drugs. Nucleic acid therapeutics are usually administered locally to diseased tissue. The drug candidates currently in clinical trials commonly use the same administration methods as previously licensed nucleic acid therapeutics. These administration techniques carry their own safety risks and advantages. In this article, the present state is discussed and prospective options for the use ASOs and aptamers as drugs are listed.

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 лекарства 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 вирусоподобни частици, които биха могли да се използват като ваксини. Освен това микроРНКи, имитиращи растителните, имат способността да инхибират тумори при бозайници. Тази публикация-ревью описва съединенията, получени от растенията, и техните свойства като потенциални терапевтични агенти и прекурсори за разработването на нови лекарства във фармацевтиката индустрия.

This article describes how with the development of biotechnology, plants have gained again a prominent place as a relatively inexpensive source for the creation of recombinant pharmaceuticals. Plant-derived compounds have started playing a major role in the pharmaceutical industry with many plant-based products to have found their way in drugs and chemicals used for the treatment of different diseases and their symptoms. Plant-derived compounds have been tested for the treatment of several types of cancer, Central Nervous System disorders, as enhancers during chemotherapy and as vessels for targeted drug delivery. Genetically modified plant cells have been recruited for the production of therapeutic agencies as well as in the creation of expression systems for virus-like particles that could be used as vaccines. Moreover, microRNAs mimicking the plant ones have the ability to inhibit tumors in mammalian cells. This review describes plant-derived compounds and their properties as potential therapeutic agents and precursors for the development of novel drugs in the pharmaceutical industry.

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.

As a result of Adleman's original work in 1994, the floodgates of DNA computing were released. Since then, a few insightful researchers are working to bridge the gap between molecular biology and computing theory in order to build a practical DNA or RNA based computer. The research undertaken on the feasibility of DNA and RNA based computers provoked a critical evaluation of the currently available tools of molecular biology for their potential for molecular computation. Thus, an opportunity arose for a new insight into some of the essential bio-molecular processes such as DNA selection, ligation, amplification, and self-assembly. The developing of on-chip biotechnology is a shared ground between DNA and RNA based diagnostics and computing. This is because owing both applications require a high degree of automation and integration of a great number of molecular processes in parallel. In this thesis, the results are reported of the development of a novel approach to an automated and integrated multi-step DNA selection employing micro-fluidic bead-based selection modules. The approach is based on a proposed novel micro-fluidic design, and a novel reversible chemistry for multi-step DNA hybridisation transfer under isothermal conditions. The micro-fluidic design allows a programmed attachment in parallel of different DNA oligomers (or other bio-molecules) to beads incorporated in cascably connected micro- reactors, by separated delivery of the DNA oligomers and cross-linking reagent. The use of an inhibition step (by a pH change) of the DNA immobilisation upon mixing in crossing micro- channels guarantees a high level of specificity in addressing beads placed in cascably connected chambers with different DNA sequences. The pH-reversible approach to sequence- specific DNA transfer allows a multi-step selection from a complex pool of different DNA molecules in cascably connected micro-flow reactors, achieved either by a pH change of the pumped solutions or, in steady flow conditions, by moving

magnetic beads through solutions with a different pH. Performing the whole selection procedure under a constant temperature allows potentially the integration of many selection modules on a single wafer. The method avails of the fast DNA hybridisation kinetics on beads under flow conditions, and of the small sample values needed. The efficiency and fidelity of the DNA hybridisation transfer are demonstrated between two micro-fluidic selection modules. The approach is suitable for integrated applications in the fields of DNA computation and diagnostics. A twelve-bit DNA library, designed according to thermodynamic constraints, is experimentally constructed and tested using molecular biology tools. The results demonstrate a high level of specific hybridisation achieved with all library bits under identical conditions.

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.

In recent years, infections caused by multidrug-resistant bacterial pathogens have become a huge issue to public healthcare systems. Indeed, the misuse of antibiotics has led to, over the past 30 years, the emergence of a number of resistant bacterial strains including *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli* and

Mycobacterium tuberculosis. Unfortunately, efforts to produce new antibiotics have not been sufficient to cope with the emergence of these new antibiotic-resistant (AR) strains.

2. Биоинформатика и молекулна еволюция

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'-нетрансрирана област на информационната РНК.

Рибопревключвателите усещат специфични метаболити и регулират синтезата 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.

Objectives: A constantly growing number of antibiotic-resistant strains of human pathogenic bacteria is an acute problem. Prolonged illnesses and increasing mortality worldwide mean that there is an urgent need to develop novel antibacterial drugs based on new targets and mechanisms of action. We present in silico analyses of bacterial riboswitches that may be suitable as antibacterial drug targets. Methods: Most bacterial riboswitches are allosteric cis-acting gene control elements located in the 5'untranslated region of messenger RNAs. Riboswitches sense specific metabolites and regulate the synthesis of some essential cellular metabolites in many pathogenic bacteria but are not found in humans. We present a complete and comprehensive genome-wide bioinformatics analyses of the suitability of eight riboswitches as antibacterial drug targets in various pathogenic bacteria. Results: Based on our in silico analyses, we classify the riboswitches in four different groups based on their suitability to be used as antibacterial drug targets. We have estimated that FMN, SAM-I, glmS, TPP, and Lysine riboswitches are promising targets for antibacterial drug discovery. Conclusion: This research enables us to focus antibacterial drug discovery research only on those riboswitches whose inhibition will result in suppression of the growth of certain pathogenic bacteria.

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 (Т_м) 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. Аплетът 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 целиви последователности и има опция за търсене във всяка последователност на генома, зададени от потребителя. Всички програми са постоянно достъпни онлайн на <http://penchovsky.atwebsites.com/> без ограничения.

The Essential Bioinformatics Web Services (EBWS) are implemented on a new PHP-based server that provides useful 5 tools for analyses of DNA, RNA, and protein sequences applying a user-friendly interface. Nine Web-based applets are currently 6 available on the Web server. They include reverse complementary DNA and random DNA/RNA/peptide oligomer generators, a pattern 7 sequence searcher, a DNA restriction cutter, a prokaryotic ORF finder, and a random DNA/RNA mutation generator. It also includes 8 calculators of melting temperature (TM) of DNA/DNA, RNA/RNA, and DNA/RNA hybrids, a guide RNA (gRNA) generator for the 9 CRISPR/Cas9 system and an annealing temperature calculator for multiplex PCR. The pattern-searching applet has no limitations in 10 the number of motif inputs and applies a toolbox of Regex quantifiers that can be used for defining complex sequence queries of RNA, 11 DNA, and protein sequences. The DNA enzyme digestion program utilizes a large database of 1,502 restriction enzymes. The gRNA 12 generator has a database of

25 bacterial genomes searchable for gRNA target sequences and has an option for searching in any 13 genome sequence given by the user. All programs are permanently available online at http://penchovsky.atwebpages.com/14_applications.php without any restrictions.

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, Moco, 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.

The RSwitch is a MySQL database implemented on a PHP-based server, which also provides various useful tools for analyses of DNA, RNA, and protein sequences applying a user-friendly interface. The RSwitch database currently contains information

and annotations of 215 bacterial riboswitches from 16 different types found in 50 human pathogenic bacteria. The riboswitch classes include those sensing FMN, glmS, Cobalamin, Lysine, SAH, SAM, Purine, TPP, c-di-GMP I, c-di-GMP II, Moco, PreQ1, Fluoride, Glycine, Mg²⁺, and Mn²⁺ type of bacterial riboswitches. The database provides information about the riboswitch aptamer sequences, the thermodynamic ensemble of the RNA structures on partition function and on free minimum energy function. Additionally, the database presents the centroid structure and the positional entropy for each position of the aptamer sequences. The database also provides the biochemical pathways in which the riboswitches are involved in, as well as multiple sequence alignments, multi-drug resistance bacterial strains and consensus motifs for each type of the switches. The RSwitch database is permanently available online without any restrictions. This bioinformatics database provides for the first time all information needed for assessing the suitability of the presented riboswitches as antibacterial drug targets.

3. Молекулярна генетика на бактерии

Рибопревключватели - разпределение, структура и функциониране бактериите. Riboswitch distribution, structure, and function in bacteria – Nikolett 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 експесирането 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.

Riboswitches are gene control elements that directly bind to specific ligands to regulate gene expression without the need for proteins. They are found in all three domains of life, including Bacteria, Archaea, and Eukaryota. Riboswitches are mostly spread in bacteria and archaea. In this paper, we discuss the general distribution, structure, and function of 28 different riboswitch classes as we focus our attention on riboswitches in bacteria. Bacterial riboswitches regulate gene expression by four distinct mechanisms. They regulate the expression of a limited number of genes. However, most of these genes are responsible for the synthesis of essential metabolites without which the cell cannot function. Therefore, riboswitch distribution is also important for antibacterial drug development.

РНК като ефикасна цел за откриване на антибактериални лекарства. 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.

The development of novel antibiotics is becoming a real emergency due to the growing number of multidrug-resistant pathogenic bacteria. This is also a global problem due to mass production and application of various antibiotics both in human and veterinary medicine. Therefore, we need not only to create novel antibiotics but also to speed up the development pipeline. This may be achieved by using novel targets for antibacterial drug discovery. In this review, we focus our attention on several different types of RNA molecules that have been used as antibacterial drug targets. The RNA is the most ambiguous biopolymer in the cell, which carries many different functions. For instance, tRNAs, rRNAs, and mRNAs are essential for gene expression both in the pro-and eukaryotes. However, all these types of RNAs have sequences and something 3D structures that are specific for bacteria only and can be used to shut down essential

biochemical processes in bacteria only. All these features make RNA very potent target for antibacterial drug development.

Механизми на лекарствена устойчивост и подходи за преодоляване.

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.

In this chapter, we discuss the global threat imposed by the emergence of multidrug-resistant bacterial strains and what we can do to mitigate this growing danger. To deal with the growing threat of multidrug-resistant strains we have to reduce the world-wide misuse of antibiotics both in human and veterinary medicine. In addition, we have to speed up the pipeline for developing new antibiotics. To achieve that, we may need to use novel mechanisms of drug action, drug delivery, and employ novel antibacterial drug targets. Herein we also discuss the key mechanisms of antibacterial drug action, the developing and spreading of antibacterial resistance, and the most urgent multidrug-resistant bacterial strains, which have to be tackled in an urgent fashion.

Стратегии за превенция и удържане на антимикробна резистентност.

Migration of Antimicrobial resistance (book chapter – “Strategies for prevention and containment of antimicrobial resistance”) - in press 2020

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 интересувани се от тези сфери.

In this book chapter, we discuss all important strategies for the prevention and containment of antimicrobial resistance, which is a growing problem for health care systems around the world. Here we discuss the risk factors and mechanisms of development and ways of spreading of antimicrobial resistance. We focus our attention to various strategies for prevention of emergence of antimicrobial resistance via reduction of selective pressure to the pathogenic bacteria. The chapter also presents different strategies for containment of wide-spread infection with antibacterial drug-resistant bacteria, including internationally recognized guidelines of antibiotic stewardship. The presented broad scientific area of prevention of containment of antimicrobial resistance would be of interest to both researchers and physicians working or interested in these fields.

**Откриване на лекарства, насочени към бактерии, устойчиви на лекарства.
Drug discovery targeting drug-resistant bacteria. Migration of Antimicrobial
resistance (book chapter – “Drug discovery targeting drug-resistant bacteria”) - in
press 2020, Springer**

В тази глава на книгата представяме нови методи за откриване на антибактериални лекарства срещу антимикробни бактерии, базирани на алтернативни стратегии за откриване на антибактериални лекарства. Те включват приложение на антисенс олигонуклеотиди като антибактериални агенти, фекална микробиотна трансплантация и антимикробни пептиди и проникващи в клетки пептиди с антибактериална активност. Тези алтернативни подходи за откриване на антибактериални лекарства имат огромен потенциал за разработване на нови антибиотични агенти, антимикробни резистентни бактерии, които са много необходими за справяне с неотложните заплахи от патогенни бактерии, устойчиви на много лекарства.

In this book chapter, we present novel methods for antibacterial drug discovery against antimicrobial resistant bacteria based on alternative strategies for antibacterial drug discovery. They include the application antisense oligonucleotides as antibacterial agents, fecal microbiota transplantation, and antimicrobial peptides and cell-penetrating peptides with antibacterial activity. These alternative approaches for an antibacterial drug discovery have a huge potential to develop novel antibiotics agents antimicrobial resistant bacteria that are much needed to tackle the urgent threats of multi-drug resistant human pathogenic bacteria.

гр. София

подпис:

24.01.2020 г.

доц. д-р Роберт Димитров Пенчовски