

РЕЦЕНЗИЯ

от

**Чл. кор. Проф. Драга Топчева, дбн, Ръководител на Катедрата по
медицинска генетика, МУ София**

Относно: дисертационен труд на Мартина Трайковска на тема “Инженерство на функционални нуклеинови киселини и приложението им в областите на молекулярната генетика и синтетичната биология“ за присъждане на образователна и научна степен “ДОКТОР” в област на висше образование: „Природни науки, математика и информатика”, Професионално направление: „Биологични науки”, шифър 4.3, Научна специалност: „Генетика”. Научен ръководител на докторанта е доц. д-р Роберт Димитров Пенчовски.

Представената ми за становище дисертация е структурирана съгласно Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ). Дисертационният труд е стандартно структуриран и съдържа всички основни раздели – въведение, цел и задачи, материали и методи, резултати, дискусия, изводи и приноси, библиография.

Дисертационният труд обхваща 133 страници, 37 фигури, 7 таблици, 146 литературни източника.

Актуалност на темата.

Проблемът за лекарствената резистентност е едно от най-големите предизвикателства при съвременното лечение на инфекциозните заболявания. Възникването на патогенни бактерии, устойчиви към антибиотично лечение е сериозен проблем за медицината. Той принуждава изследователи и фармацевтични компании да търсят и да разработват нови молекули и антибактериални средства за преодоляване на множествената лекарствена резистентност. За съжаление, новите антибиотици не са достатъчно ефективни срещу бактериални щамове, развили устойчивост на антибиотично лечение. Необходимо е да се създават и използват нови стратегии за създаване на мощни антимикробни средства, за да се води успешна борба с патогенните бактерии.

Подбраната тема е много актуална от научна гледна точка и изключително важна за практическото здравеопазване. В постгеномната ера, създаването на изкуствено синтезирани антисенс олигонуклеотиди, насочени срещу специфични молекулни мишени с важни регулаторни функции в бактериите, крие потенциал за използването им като нови антибактериални агенти и за развитие на персонализирана медицина.

Обзорът представлява обширен преглед на литературата, който дава богата информация за съвременните постижения в областта на молекулярната и синтетичната биология и в опитите за разработване на нови и неконвенционални антибактериални средства.

Докторантът представя подробно структурата и функцията на рибопревключвателите, които са регулаторни РНК елементи, разположени в 5'нетранслирания район на бактериалните иРНК, притежават сложна третична структура и играят важна роля в клетъчния метаболизъм. Те се използват от бактериите за регулиране експресията на гени, кодиращи синтеза и транспорта на определени метаболити (нуклеинови бази, аминокиселини и др.) в отговор на тяхното вътреклетъчно съдържание. Рибопревключвателите са важни за клетъчния метаболизъм и жизнеността на бактериите. Например, в *Bacillus subtilis* рибопревключвателите контролират експресията на 2% от всички гени и регулират голям брой биохимични пътища. В структурно отношение те съдържат аптамерен домен, който свързва строго специфично определени лиганди. В резултат настъпват конформационни изменения в експресионната им платформа, които водят до различни регулаторни промени на контролираните гени – при изобилие на лиганди може да се индуцира или прекъсне процесът на транскрипция или трансляция на генната информация. Рибопревключвателите са уникални РНК елементи, които се открояват като нов клас молекулни мишени за създаване на антибиотици. Те представляват голямо предизвикателство за изследователите, посветени на разработване на нови антибактериални лекарства. В последното десетилетие чрез използване предимствата на ин витро скринингови методи, структурно-базиран компютърен докинг са идентифицирани природни и синтетични аналози на лигандите, насочени срещу рибопревключвателите на flavin mononucleotide (FMN), glmS, T-box или S-adenosylmethionine (SAM).

Литературният обзор е написан перфектно, на високо експертно ниво и разкрива безспорна компетентност на докторантката по темата на дисертацията.

Цел и задачи на дисертацията

Дисертационният труд е посветен на значима научна цел - да бъде използвана антисенс олигонуклеотидна технология за въздействие върху бактериални рибопревключватели като съвременен подход за създаване на нови антибактериални агенти.

Целта е много трудна и нейното постигане изисква широки познания и значителни умения на изследователя. Докторантката строго методично и системно планира задачите, които следва да бъдат решени, за да достигне до крайната цел.

Една от основните задачи е правилния избор на функционално значими рибопревключватели, които са подходящи мишени за АСО въздействия. Съвсем основателно и оправдано този въпрос е решен чрез използване на възможностите на биоинформатичния анализ за определяне на разпространението на рибопревключвателите в геномите на човешки патогенни бактерии и селекция на два от тях, които контролират жизнено важни пътища.

След избора на две мишени, следващата поставена задача от докторантката е да направи дизайн на специфични антисенс олигонуклеотиди и да проведе експериментално изследване на тяхното действие върху три бактериални човешки патогени (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*) и върху непатогенни бактерии (*Bacillus subtilis*), както и да определи тяхната токсичност в човешки клетъчни линии от недребно клетъчен белодробен карцином (A549).

В **методично отношение** Мартина Трайковска използва наличните база данни (Rfam 12.0; NCBI data base; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ExPASy и Bioinformatic Resource Portal) и свободно оперира със софтуерни програми (Blast, Cluster W/Cluster X; Vienna RNAfold web server). Докторантката е установила нуклеотидните последователности на:

- ✓ flavin mononucleotide (FMN) рибопревключвател при 3098 вида бактерии, от които 30 са патогенни за човека;

- ✓ S-adenosylmethionine (SAM-1) рибопревключвател при Грам-положителни патогенни бактерии – 9 от общо 41 човешки патогенни бактерии,

Тя е анализираща подборно и сложните биохимични процеси, в които ФМН и САМ-1 играят важна роля.

На базата на избраните консервативни райони в аптамерните домени на ФМН и САМ-1 са проектирани антисенс олигонуклеотидни последователности АСО-1 и АСО-2 за ФМН и АСО-3 за САМ-1. Конструираните АСОи са модифицирани, при което един от несвързаните кислородни атоми от фосфодиестерната връзка е заменен с атом сяра (PS-модификация от първо поколение) и 2'-О-метил и 2'-О-метоксиетил (модификация от първо поколение). Те образуват химерна молекула с ковалентно свързан рVEC пептид, който осигурява навлизане в бактериалната клетка.

За изследване на ефективност и токсичност на антисенс олигонуклеотидите, докторантката използва стандартни протоколи на фирмите производители за изолиране на тотална РНК и геномна ДНК, хидролизиране на ДНК, PCR реакция и агарозен гел електрофореза. Извършва и пептидна конюгация на рVEC КПП с (PS) тиол-модифицирани АСОи, чрез EDC свързващ реагент. Тестването за токсичност на използваните АСО в човешка клетъчна линия от недреноклетъчен белодробен рак е направено съгласно инструкциите на фирмата производител за преброяване на клетките с електронен брояч, а клетъчната преживяемост е отчетена на 48-ия час от третиране на клетките с МТТ тест. Отчитането на резултатите е извършено чрез измерване на екстинцията с помощта на ELISA reader.

Като се има предвид, че дисертантката за първи път извършва уникално изследване на АСО-и, конструирани специфично срещу ФМН аптамерен домен и САМ-1 аптамерен домен на рибопревключватели, използваните материали и методи са представителни за дисертационния труд.

Получени резултати

Въз основа на проведените прецизни експерименти са получени убедителни данни за инхибиторен ефект на АСО1 и АСО 3 върху бактериалния растеж на безусловно патогенна бактерия при човека - *Listeria monocytogenes*, при условно

патогенни - *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) и при непатогенната бактерия - *Bacillus subtilis*. Спирането на бактериалния растеж специфично хибридизиране на конструираните АСОи с комплементарни секвенции на аптамерните домени на съответните рибопревключвателите – АСО-1 се свързва специфично с рибопревключвателя за ФМН, а АСО-3 – с този на САМ-1.

Докторантката е определила и минималната инхибираща концентрация на АСОи при 80% подтискане на бактериалния растеж – 4,5 µg/ml за ФМН рибопревключвател и 4,4 µg/ml за САМ-1 рибопревключвател. Експериментите *in vitro* показват, че те не са токсични.

Тези резултати имат важно практически приложно значение, тъй като доказват че специфично конструирани АСО секвенции, имат огромен потенциал да бъдат антибактериални агенти, които атакуват нови молекулни мишени с функционална значимост за клетките - рибопревключватели. Те събуждат и надежда да бъде преодолян един от най-големите проблеми в борбата с инфекциозните заболявания – развитие на резистентност към терапията.

Обсъждането е разгърнато адекватно на получените резултати и в съответствие с литературните данни от използваната библиография. Изводите съответстват на получените резултати.

Текстът е структуриран логически правилно, дисертационния труд е написан прецизно, резултатите са интерпретирани професионално и със задълбочено познаване на материята, фигурите и таблиците са с високо качество и прецизно обяснени.

Изводите са изведени логично от получените резултати. Мартина Трайковска формулира собствен аналитичен подход за постигане на поставената цел, конструира специфични АСОи за таргетиране на рибопревключватели за ФМН и САМ-1, доказва по безспорен начин техния инхибиторен ефект върху тестваните бактериални щамове и разкрива възможности за създаване на нова генерация антибактериални агенти с потенциал за преодоляване на лекарствената резистентност.

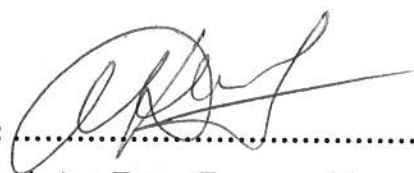
Заклучение – като имам предвид актуалността на проблема, използваните съвременни техники, получените резултати с важен научен и практически приложен принос за използване на АСОи като потенциални антибактериални

терапии, определям дисертационният труд като успешно разработен, отговарящ на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ).

Във връзка с гореизложеното, оценявам високо резултатите на докторантката и си позволявам да препоръчам убедено на уважаемото Научно жури да присъди на Мартина Трайковска образователна и научна степен "ДОКТОР" в област на висше образование: „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление: „Биологически науки“, Шифър 4.3, Научна специалност: „Генетика“.

19.08.2017, София

Рецензент:



Чл. кор. Проф. д-р Драга Тончева, дбн
Ръководител на катедра по медицинска
генетика, Медицински Университет,
София