

РЕЦЕНЗИЯ

от **акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн**

на дисертационния труд на **Георги Йорданов Милошев „Дизайн и приложение на функционални нуклеинови киселини за синтетичен контрол на генна експресия”**, представен за присъждане на образователната и научна степен **„Доктор”** в Област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и информатика”, Професионално направление 4.3. Биологически науки, Докторска програма: **„Генетика-Биоинформатика“**

1. Обща част

Георги Йорданов Милошев разработва докторската си дисертация в катедра „Генетика“ на Биологическия факултет при СУ „Св. Кл. Охридски“ по докторантска програма „Генетика и биоинформатика” под научното ръководство на проф. дн Роберт Пенчовски. Дисертационният труд, обсъден на заседание на разширен катедрен съвет на 13.07.2023 г., съдържа 131 стандартни страници, 61 фигури, 4 таблици и 184 цитирани литературни източници. Прегледът на документите във връзка със защитата показва, че процедурата по зачисляване, обучение и отчисляване на докторанта е спазена и документацията е изготвена съгласно изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение.

2. Кратки биографични данни

Георги Йорданов Милошев е възпитаник на БФ на СУ. През 2017 г. придобива бакалавърска степен по „Молекулярна биология“, през 2019 г. магистърска степен по „Генетика и геномика“, след което е зачислен в докторантура по специалността „Генетика и биоинформатика”. Той е автор на 4 научни статии, 2 от които са свързани с докторската му теза. Участвал е в разработването на 3 научно-изследователски проекта финансирани от ФНИ при МОН, 2 от които са ръководени от неговия научен ръководител проф. Р. Пенчовски. Г. Милошев е носител и на наградата „Докторант на годината“ на СУ "Св. Климент Охридски" за 2022 г.

3. Актуалност на разработваната тема

Дисертационният труд на Г. Милошев е посветен на важен и актуален за съвременната инфектология и бактериална генетика проблем – антибиотична резистентност на бактериите и търсене на нови средства за борба с резистентните патогени за нуждите на клиничната практика. Като се има предвид голямата социална значимост на антибиотичната резистентност за съвременната медицина, актуалността на разработваната тема е повече от очевидна.

4. Познаване на проблема

Съдейки по качеството на литературния обзор, докторантът е отлично запознат с литературата по разработвания научен проблем. Обзорът обхваща около 50 страници от дисертацията и е посветен на алостеричните рибозими и малките РНК като инструмент за регулация, модулация и инхибиране на генната активност. Съставен е от 5 подраздела посветени съответно на: мястото на алостеричните рибозими в синтетичната биология; подходите и методологията за идентифициране на малки РНКи; приложение на алостеричните рибозими за екзогенен контрол на генната активност; проектиране и дизайн на алостерични рибозими и антисенс олигонуклеотиди и др., като не е пропусната и перспективата на синтетична биология за бъдещата химиотерапия на инфекциозните и неопластични болести.

Обзорът е написан на разбираем научен език и впечатлява със своята задълбоченост и творчески анализ на литературата. Благодарение на литературния анализ докторантът е успял да открие своята изследователска ниша и да формулира ясно целите и задачите на

своята дисертация. Целта е да създаде нов универсален метод за контрол и инхибиране на генна експресия при *Escherichia coli* базиран на използването на хамерхед рибозими взаимодействащи със синтетични антисенс олигонуклеотиди, използвайки като модел бета-галактозидазния *LacZ* ген. За постигането на тази цел са формулирани 6 конкретни задачи.

5. Методика на изследването

Дисертацията на Г. Милошев е разработена с помощта на твърде разнообразна съвременна методология. Използваните методи могат да се класифицират най-общо като *биоинформатични* и *експериментални*. Първите включват различни програмни пакети за геномни изследвания и скрининг на общодостъпни ДНК и РНК бази данни като NCBI, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Rfam 14.1., Rswitch и др., а също за дизайн на антисенс олигонуклеотиди. Експерименталните методи са описани подробно, което позволява да бъдат възпроизведени без необходимост от допълнителна методична литература. С овладяването на изброените методи, може да се каже, че докторанта е постигнал една от целите на докторантското си обучение – придобиване на експериментални знания и умения за самостоятелно провеждане на научни изследвания.

6. Оценка на получените резултати

Раздел „Резултати“ обхваща около 30 страници от дисертацията и е структуриран в 6 подраздела съответстващи на поставените задачи, а именно: дизайн на антисенс олигонуклеотиди за инхибиране на генна експресия при *Escherichia coli*; клониране на конструктите за контрол на генна експресия в плазмид съдържащ репортерен *LacZ* ген; дизайн на стратегия за OFF Switch контрол; изследване на синтетичните антисенс олигонуклеотиди предназначени за OFF Switch контрол на генна експресия; дизайн на синтетични хамерхед рибозими за OFF Switch контрол на генна експресия; експериментална проверка на ефективността на антисенс олигонуклеотидите и хамерхед рибозима в *Escherichia coli*.

За постигане целите на дисертацията докторантът създава оригиналната тест-система базирана на експресионния плазмид pRS414, в който клонира експресионна касета съдържаща PL промотора на бактериофага λ , силна SD последователност и инициаторен (ATG) кодон поставен в рамка с *lacZ* гена. Тази система позволява оценка на влиянието на различни антисенс олигонуклеотиди и рибозими върху генната експресия чрез определяне нивото на експресираната бета-галактозидаза. Като антисенс олигонуклеотид е използван 19 мерен олигонуклеотид проектиран да разкъсва съответната иРНК в областта на SD мястото. С цел повишаване на стабилността му в бактериалната клетка, централните му 11 нуклеотида са химически модифицирани по кислородите атоми във фосфатната група, а за въвеждането му в клетката е ковалентно свързан с клетъчно проникващ пептид. Оценявам тази система за оригинална и много удобна за количествени изследвания на генната експресия. С нейна помощ докторантът е изследвал зависимостта на експресията на *lacZ* гена от концентрацията на специфично конструирания антисенс олигонуклеотид и установява, че при концентрация от 2238 мкг/мл бактериалния растеж се потиска на 96%. Интересни резултати са получени и при изследване на комбинирания ефект на нормални и мутирани антисенс олигонуклеотиди специфични за таргетното място на рибозимната атака. Резултатите подкрепят напълно лансираната от докторанта работната хипотеза.

Приложението на антисенс олигонуклеотидите и синтетичните рибозими като алтернатива на антибиотиците в борбата с човешките патогенни бактерии, е сравнително ново направление в бактериологията, чийто успех зависи от правилния избор на мишена и точния дизайн на предназначените за целта олигонуклеоти, а за това е необходимо добро познаване както на основите на молекулярната генетика, така и отлично владение на

методологията на биоинформатиката. Съдейки по резултатите, Г. Милошев е придобил необходимите знания и умения и в двете направления.

Благодарение на своята *lacZ* репортерна система докторантът отчита високи нива на бета-галактозидаза при всички тествани времеви интервали (15, 20 и 30 минути), като по този начин доказва ефективността на OFF Switch стратегията за синтетичен контрол на генна експресия чрез комбиниране на АСО от първо и второ поколение. Той доказва също, че проектираният 19 мерен олигонуклеотид с модифицирани 11 централни нуклеотиди работи успешно и потиска бактериалния растеж пропорционално на неговата концентрация. Експериментално е доказана и ефективността на конструирания хамърдхед рибозим, както и на специфичния 18-мерен АСО (5'-СТАТТТGGGACTCATCAG-3').

Изследвайки вторичната структура на хамърдхед рибозима, докторантът достига до извода, че евентуални мутации в секвенцията на АСО биха затруднили хибридизацията му с рибозима и биха влошили неговата ефективност. За експериментална проверка на своето съждение той синтезира олигонуклеотид с 5 точкови мутации, който след хибридизация би дал дуплекс с термодинамичната стабилност равна на -6.43 kcal/mol. Резултатите показват, че мутантният олигонуклеотид е наистина по-малко ефективен от оригинални 18-мер.

Въпреки че всички експерименти са проведени в *Escherichia coli* и то само с *LacZ* гена, създаденият метод за специфично инхибиране на генна експресия чрез специфични АСО хибридизиращи с рибозими би могъл да се приложи и за регулацията на експресията на други бактериални гени, а защо не и в еукариоти?!

Резултатите на Г. Милошев са много добре онагледени с адекватни фигури и таблици и са обсъдени критично в светлината на литературни данни в раздел „Дискусия“.

7. Публикации свързани с дисертацията

Във връзка с дисертацията на Г. Милошев са публикувани 2 статии в реферирани списания с общ ИФ 0.45, като в една от тях той е водещ автор.

8. Автореферат, изводи приноси

Запознат съм с проекта за автореферат и намирам, че той отразява адекватно съдържанието и постиженията на дисертацията. Направените изводи и приноси са обективни и съответстват на получените експериментални резултати.

9. Критични бележки

Към рецензирания вариант на дисертацията на Георги Милошев нямам забележки. Такива имах към работния вариант представен на вътрешната защита и сега установявам, че те всички са взети предвид.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на Георги Милошев е посветен на важен и актуален за съвременната инфектология и бактериология проблем – антибиотична резистентност при бактериите и търсене на нови подходи за борбата с резистентни и патогенни бактерии за нуждите на бъдещата клинична практика. С помощта на биоинформатични методи той успява да проектира и създаде оригинални генетични конструкти на основата на *LacZ* гена за специфично инхибиране на генна експресия чрез използване на АСО хибридизиращи с хамърдхед рибозими, чиято ефективност доказва експериментално.

Във връзка с дисертационния труд са публикувани 2 статии в реферирани списания с общ ИФ 0.45, с което докторантът удовлетворява формалните минимални изисквания на закона, за да бъде допуснат до защита.

Със своя дисертационен труд Георги Милошев се представя като добре подготвен специалист в областта на молекулярната генетика и биоинформатиката, който покрива изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение за придобиване на

образователната и научна степен „Доктор” в Професионално направление 4.3. Биологически науки, Докторска програма: „Генетика-Биоинформатика“ и аз убедено препоръчам на уважаемото научно жури да му я присъди.

22.08.2023 г.

Рецензент:

/Акад. Иван Г. Иванов/