

СТАНОВИЩЕ

от проф. Мария Богомилова Ангелова, дбн, Институт по микробиология „Стефан Ангелов” при БАН

върху дисертационен труд, представен пред научно жури, сформирано със заповед № РД-38-469/21.07.2023 г на Ректора на Софийския университет „Св. Климент Охридски” за получаване на образователната и научна степен “Доктор” в Професионално направление: 4.3. Биологични науки (Генетика-Биоинформатика)

Автор: **Георги Йорданов Милошев**

Тема: **Дизайн и приложение на функционални нуклеинови киселини за синтетичен контрол на генна експресия**

Научен ръководител: **проф. д-р Роберт Пенчовски**

Актуалност на разработваната тема

В днешни дни лекарствената резистентност се очертава като глобална заплаха за лечение на инфекции, причинени от бактерии, вируси и мицети. Този феномен не е само сериозно усложнение в медицинската практика, но също така е едно от най-големите предизвикателства за общественото здраве в целия свят. Сценарият относно неблагоприятните ефекти от резистентността е много по-голям от въображението ни. Резистентността нараства с тревожна скорост и е проблем особено за имунокомпрометираните пациенти. За нея предупреждава още през 1942 г Александър Флеминг. Едно ключово решение на проблема са антисенс технологиите за създаването на антисенс олигонуклеотиди (АСО) с приложение в лечението и профилактиката на различни заболявания чрез инхибиране експресията на избрани гени. В тази безспорно актуална област на синтетичната биология е основната насоченост на дисертационния труд на Георги Милошев.

Познаване на проблема

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 131 стандартни компютърни страници и е онагледен с 4 таблици и 61 фигури. Литературният обзор е на базата на 184 литературни източника, като 42% от тях са от последните 5 години. В него са разгледани основните аспекти на дисертационната теза. Подробно са представени известните данни за мястото на рибозимите в синтетичната биология като синтетични рибопревключватели в клетката за екзогенен контрол на генна експресия. Тук са намерили място и знанията относно идентифицирането на индикаторните РНК-и за откриване на ракови заболявания, дизайна на високоскоростни рибозими, чувствителни към олигонуклеотиди и тяхното използване. Много полезни за читателя са подразделите за същността и значението на рибозимите и механизма на тяхното действие, както и информацията за антисенс олигонуклеотидите и външно насочените РНК

последователности като агенти за синтетичен контрол на генна експресия. Обзорът завършва с очертаване на перспективите за РНК синтетичната биология и нейната връзка с фармацевтичните биотехнологии, метаболитно инженерство, клетъчното препрограмиране, редактирането на генома и др.

Целта на настоящата докторска дисертация е да се разработи нов универсален метод за контрол на генна експресия при *Escherichia coli* чрез използването на синтетични антисенс олигонуклеотиди, които инхибират LacZ експресията. Според мен тя съответства на актуалността и значимостта на проблема и подчертава иновативния характер на разработката. Целта обединява всички направления на експерименталната работа. За реализиране ѝ са формулирани 6 конкретни, взаимно обвързани и логически следващи задачи, които включват всички задължителни етапи на подобно проучване.

Методика на изследването

Разделът "Материали и методи" демонстрира много широк набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експеримента. Те са биоинформативни, биохимични и молекулярно-генетични. Като биоинформатични инструменти са използвани наши и чуждестранни бази данни и софтуерни продукти. Правят впечатление получаването на компетентни клетки, PCR и ензимните анализи и др. Методите са описани много детайлно (на места дори с излишни подробности) и могат да бъдат възпроизведени.

Оценка на дисертационния труд и приносите

Раздел „Резултати“ е представен на 36 страници. Първата част от експерименталната работа е насочена към дизайн на антисенс олигонуклеотиди за инхибиране на генна експресия при *E. coli*. Според мен, първите два параграфа нямат място в този раздел. Част от написаното трябва да се включи в литературния обзор, а друга част – в дискусията. Тук, много подробно и с необходимите доказателства са представени създаването на 1-ия ДНК фрагмент, въвеждането на рестриктазното място на KpnI, клонирането на PL промоторната последователност, създаването на друг фрагмент, съдържащ антисенс олигонуклеотид, който инхибира бактериалния растеж и неговата вторична структура. Следващият етап продължава с клониране на конструкта за синтетичен контрол на генна експресия в плазмид за експресия на *E. coli* с репортерен ген за LacZ. Резултатите демонстрират, че генерираната конструкция на репортерния ген, използващ плазмид рRS414, работи ефективно и дава очакваните резултати по отношение на ензимната активност на бета-галактозидазата. Чрез комбинация на антисенс олигонуклеотиди (АСО) от първо и второ поколение е създадена стратегия за контрол на генната експресия с превключвател OFF в *E. coli*, която е експериментално проверена при 9 покачващи се концентрации. Установено е, че повишаването на концентрацията на АСО води до понижаване на процента на експресия на LacZ. При използването на алостеричен хамърхед рибозим се установява различно

поведение на системата по отношение генната експресия в зависимост от взаимодействието му с АСО. Новосъздадената система от АСО за контрол на превключвателя OFF на генната експресия с използването на синтетичен хамърхед рибозим показва висока ефективност при бета-галактозидазните анализи.

Раздел „Дискусия“ се отклонява от общоприетия смисъл, липсва обсъждане на данните на фона на публикуваното досега в литературата. Това по-скоро е обобщение на получените резултати от автора, което също е много полезно, но не може да замести дискусията. То дава възможност на читателя да види общата картина на цялата експериментална работа и да възприеме по-ясно постигнатото.

Приемам формулираните изводи и приноси. Искам да подчертая, че дисертационният труд на Георги Милошев има подчертан теоретичен характер със силно изразен приложен аспект.

Критични бележки, препоръки и въпроси

Освен отбелязаните по-горе в текста бележки, към дисертацията на Милошев имам следните препоръки:

1. Представените към дисертацията 3 научни публикации не трябва да бъдат включени в литературния обзор. По презумпция, такива статии включват част от получените резултати. Това са собствени данни и трябва да намерят място в раздел „Резултати“.

2. Статиите, представени към дисертацията не трябва да са част от списъка с литературата.

3. Обзорът се нуждае от представяне на данни относно контрола на генна експресия при *E. coli* чрез използването на синтетични антисенс олигонуклеотиди, които инхибират LacZ експресията. Необходимо е да се отбележи какво е направено досега и какво е новото, което се цели с тази разработка.

4. Препоръчвам пасажите с описание на експеримента и формулите за изчисление да се включват в раздел „Материали и методи“, а не в раздел „Резултати“.

5. Препоръчвам подобряване на стила на писане, спазване на глаголното време и избягване на изречения в 1-во лице, единствено число. На места превода от английски на български не отразява реалния смисъл на фразата (имам предвид публикуваните от автора статии, представени към дисертацията и отразени в текста).

Както се вижда от споменатото по-горе, забележките и препоръките не са по същество. Те са от технически характер и не намаляват научната стойност на представения дисертационен труд. Аз ги отбелязвам за да бъде полезна за бъдещата научна дейност на докторанта.

Към докторанта Георги Милошев имам следните въпроси:

1. Защо бактериалните рибопревключватели се считат за нови и много обещаващи мишени за откриване на антибактериални лекарства?
2. Инхибирането на LacZ експресията в *E. coli* е обект и на предишни биоинформатични изследвания. Какво е новото в представената дисертационна разработка?
3. Можете ли да конкретизирате къде например ще намери приложение новосъздадената в разработката lacZ репортерна система за контрол на генната експресия при синтетични дизайнерски рибозими и антисенс олигонуклеотиди.

Заклучение

В заключение искам да подчертая, че докторантът е изпълнил изискванията на ЗРАСРБ, като и тези в Правилника към него на СУ „Климент Охридски“ за придобиване на образователната и научна степен ”Доктор”. Материалът, който представя Георги Милошев е дисертабилен, темата е актуална и предлага съвременно ниво на важен за теорията и практиката въпрос. Проведените експерименти са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Поставеният проблем е многостранно и детайлно проучен на съвременно ниво, направени са съществени теоретични и приложни приноси. Според мен, Георги Милошев излиза от докторантурата като добре подготвен специалист в областта на генетиката и биоинформатиката, усвоил е съвременни методи, получил е опит при интерпретиране на научни данни.

Въз основа на направения разбор и на доказаното израстване на докторантката, предлагам на уважаемите членове на научното жури, сформирано със заповед № РД-38-469/21.07.2023 г на Ректора на Софийския университет „Св. Климент Охридски”, да присъдят на **Георги Йорданов Милошев** образователната и научна степен “**ДОКТОР**” по научно направление 4.3 Биологични науки (Генетика-Биоинформатика).

25. 09. 2023 г

София

Изготвил становището:.....

/проф. Мария Ангелова, дбн/