

## СТАНОВИЩЕ

от

акад. Атанас Иванов Атанасов, ръководител на Съвместен Геномен  
Център ООД към СУ „Св. Кл. Охридски“

**Относно дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ на Катерини Николаос Валсаматзи-Панайоту, професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност „Генетика –биоинформатика“**  
шифър 01.06.06 на тема: ДИЗАЙН НА ХИМЕРНИ АНТИСЕНС ОЛИГОНУКЛЕОТИДИ И НАЧАЛНА  
ОЦЕНКА НА ТЯХНОТО ИЗПОЛЗВАНЕ ЗА ТЕРАПЕВТИЧНИ ЦЕЛИ *с научен ръководител доц. д-р  
Роберт Димитров Пенчовски, Биологически факултет, Софийски Университет «Св.  
Кл.Охридски».*

### 1. Информация за кандидата

**Катерини Валсаматзи Панайоту** е родена на 9.05.1993 г.

Придобиwa магистърска степен по програма „Здравни грижи“ - Master of Science in Health & Welfare Units“ в Международен Гръцки Университет, гр. Солун, Гърция (International Hellenic University (IHU) of Thessaloniki). Зачислена е като докторант със Заповед No № РД-20-86 / 12.01.2018г по Биологически науки: 4.3, Генетика – Биоинформатика, шифър 01.06.06 към катедра „Генетика“ на Биологически Факултет към Софийски Университет „Св. Климент Охридски“ за период от три години. 2020 г

Владее свободно гръцки (майчин), български, английски и немски език, което е отличен атестат за нейното бъдещо развитие.

### 2. Научно-изследователска дейност

Затрудненото създаване на нови антибактериални препарати, поради високата скорост, с която възниква антибиотичната резистентност, налагат прилагането на нови стратегии и търсенето на нови мишени от бактериалните клетки. Настоящия дисертационен труд е сериозно научно изследване за разработването на нови антисенс олигонуклеотиди, които могат да се насочат към човешкия бактериален патоген **Staphylococcus aureus**, заразяващ хора от различни ареали и отговорен за редица кожни инфекции и инфекции при човека. **Проблема освен здравословен се превръща и в икономически,засягащ целя свят.**

Синтетичната биология, с която е свързана настоящата дисертационна работа е естествено продължение на постиженията на съвременните биотехнологии, омикс-технологиите (известни като системна биология), нанотехнологиите и биоинформатиката

Използвайки възможността да се създават изкуствено молекули, които да играят важни регулаторни функции в клетката, настоящата работа съвсем основателно и навреме се явява продължение на предишни изследвания и се насочва към търсенето и използването на оригинални химерни антисенс олигонуклеотиди (АСОи), които биха могли да бъдат използвани като антибактериални

агенти. По този начин се откриват широки възможности за създаване на нови такива, които биха могли да бъдат използвани като алтернатива на сега употребяваните антибиотици, към които бактериите вече демонстрират широка устойчивост..

## **2.1. Цел и задачи**

В този смисъл настоящата работа, която според моите познания е уместно продължение на предхождащи докторски работи, си поставя съвсем аргументирано основната цел и задачите, свързани с нея, а именно създаване и използване на АСО- и активни към бактериалната иРНК. **Целта на настоящата работа** е свързана с проектиране и определени на четири нови антисенс олигонуклеотида. Три от тях да бъдат насочени към различна цел от бактериалния геном, а един е произволно създаден и няма специфична мишена от генома на *S. Aureus*.

Съвсем уместно, задачите по дисертацията са свързани с: избора на три специфични мотива от генома на човешки патогенни бактерии - част от РНК от РНаза Р, иРНК на РНаза Р, бактериалната РНК полимераза, които да бъдат използвани като мишени за антибактериално тестване на химерни антисенс олигонуклеотиди; с усвояване на методи за компютърен дизайн на алостерични рибозими и антисенс олигонуклеотиди; с направата на дизайн на три химерни антисенс олигонуклеотида, които специфично да се свързват с избраните три антибактериални; извършване биоинформатичен и геномен анализ на целия геном на *Staphylococcus aureus* и BLAST анализ на всички генетични последователности на видове в база данни NCBI и със създаване на дизайн на четвърти антисенс олигонуклеотид, който не притежава специфична мишена в бактериалния геном на патогенната бактерия *Staphylococcus aureus*; усвояване на методи за инхибиране на генна експресия с антисенс олигонуклеотиди при бактерии; проверка на ефективността на действието и специфичността на четирите химерните антисенс олигонуклеотиди *in vitro* в бактериалния човешки патоген *Staphylococcus aureus* и проверка на експериментално инхибиращия ефект на клетъчно проникващия белтък рVEC във висока концентрация.

## **2.2. Материал и методи**

За осъществяване на целта и задачите, авторката е използвала възможно най-правилно проектирани база данни и програми, които и дават възможност за

свободен достъп до секвенциите на различни патогенни бактерии и съдържа информация за използването на рибопревключватели като антибактериални лекарствени цели; най-големите бази данни със свободен достъп до структурирана информация в отделни бази данни, свързани с основния уебсайт. Такива бази данни са Pubmed (научни публикации), Gene, Genome, GenBank и Nucleotide (ДНК последователности и пр.) Protein (белтъци), PubChem (химични процеси), BLAST (търсене на подобни райони); до информация на геномни, метагеномни и транскриптомни данни, данни за белтъци и протеоми и еволюционна и популационна генетика; за подравняване на последователностите (alignment), който позволява откриване на подобности в две или повече последователности. С помощта на тази програма бяха анализирани наличните последователности от генома на *Staphylococcus aureus* и бяха избрани 3 участъка, към които след това бяха насочени специфични химерни антисенс олигонуклеотида и редица други. Към това може да се прибави и

овладяването на техниките за бактериално култивиране, нужната апаратура, подходяща за осъществяване на целите на дисертацията

Всичко това показва, че докторантката е съумяла да овладее възможно най-широк арсенал от биоинформатични програми, методи и техники, които и дават подходяща основа за бъдещо научно развитие в конкурентния научен свят, в който се намира света в момента.

### **2.3. Приноси на дисертационния труд**

В резултат на пълноценната изследователска работа, докторантката достига до резултати, които и дават възможността да формулира редица изводи и приноси, за които тя има основателните претенции за оригиналност. Поважните от тях са свързани с използването на:

Настоящата докторска дисертация има редица приноси, по отношение на предлагането на нови стратегии и терапевтични агенти, които да бъдат приложени с цел противопоставяне и преустановяване на разпространението на бактериалната антибиотична и множествено-антибиотична резистентност.

В резултат на пълен биоинформатичен анализ на генома на приоритетния според СЗО човешки бактериален патоген *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 25923 са избрани три участъка - *gprB*, *gprA* и *groB*, отговорни за синтеза на важни метаболити като Рибонуклеаза Р и  $\beta$ -субединицата на РНК. Те се предлагат за първи път като потенциална мишена за прицелване с терапевтичен агент – антисенс олигонуклеотид. Нито една от трите нуклеотидни последователности не се открива в генома на човека.

Осъществен е успешно направата на дизайн на четири антисенс олигонуклеотида – АСО 1, АСО 2, АСО 3 и АСО 4, проектирани да се насочват към избраните последователности в *gprB*, *gprA* и *groB*, а четвъртият, който има уникална целева последователност, не е открит в генома на нито един от организмите от база данни NCBI. Целенасочените модификации при тях, свързани с придобиване аптамерна структура и стават по-устойчиви на ензимно разграждане, с по-висок афинитет към субстрата и предизвикват РНaza Н-индуцирана хидролиза.

С особена стойност и перспектива са резултатите, свързани със специфично насочените АСО 1, АСО 2 и АСО 3, които проявяват обещаващи приложение като терапевтични агенти срещу човешкия бактериален патоген *Staphylococcus aureus*. След четирикратно повторени експерименти, се потвърждава бактерицидният им ефект, като се наблюдава инхибиране в растежа на бактериите в концентрации от 2100 nM до 4500 nM. стана ясно, че АСО 1 проявява максимален инхибиращ ефект при високи концентрации – 4500 nM. АСО 2 и АСО 3 показват бактерициден ефект при концентрация 3000 nM. Мишените на АСО 1, АСО 2 и АСО 3 не се откриват в генома на човек, което означава, че биха могли да се прилагат *in vivo*. При това клетъчно проникващият пептид - pVEC във висока концентрация от 4500 nM в бактериални клетки от *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 25923 не проявява инхибиращ ефект върху растежа на бактериите.

Всички описани приноси, които носи настоящата докторска дисертация, след извършване на множество експерименти, потвърждават възможността антисенс олигонуклеотидната терапия да се прилага в бактериални клетки. Те насочват вниманието на учените към продължаване на работата с избраните мишени и с проектираните към тях антисенс олигонуклеотиди и последващи

анализи in vivo и тестване по регламента на клиничните изпитания.

### **Заклучение**

Имайки в предвид, че някои от описаните приноси, които носи настоящата докторска дисертация са оригинални, широкия спектър от методи и биоинформатични програми, овладени от докторантката, трудовата и дейност преди да постъпи в аспирантура ми дават пълно основание да дам своята подкрепа и препоръчвам на членовете на уважаемото научно жури да присъди на **Екатерини Николаос Валсаматзи-Панайоту** образователната и научна степен „ДОКТОР“ в **професионално направление 4.3. Биологически науки „Генетика –биоинформатика“** на тема „шифър 01.06.06 на тема: ДИЗАЙН НА ХИМЕРНИ АНТИСЕНС ОЛИГОНУКЛЕОТИДИ И НАЧАЛНА ОЦЕНКА НА ТЯХНОТО ИЗПОЛЗВАНЕ ЗА ТЕРАПЕВТИЧНИ ЦЕЛИ *с научен ръководител проф. д-р Роберт Димитров Пенчовски,*

**8.03.2021**

***Изготвил становището: акад. Атанас Атанасов***