

До ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА НАУЧНО ЖУРИ  
Определено със заповед РД 38-469/21.07.2023  
На ректора на СУ “Св. Климент Охридски“

## РЕЦЕНЗИЯ

На дисертационен труд на тема:

Дизайн и приложение на функционални нуклеинови киселини за  
синтетичен контрол на гена експресия“

На Георги Йорданов Милошев, кандидат за придобиване на ОНС „Доктор“  
в направление 4.3. Биологични науки по научна специалност Генетика, докторска  
програма „Биоинформатика“ с научен ръководител проф. Роберт Пенчовски

Изготвил Рецензията: доц. д.р Илияна Иванова, лаб. Бионанотехнология  
при Катедра „Обща и промишлена Микробиология“, Биологически Факултет

Декларирам, че нямам общи публикации или конфликт на интереси от друг  
характер с кандидата по смисъла на § 1, т. 2а от ДР на ЗРАСПВ както и липса на  
обстоятелства по чл. 33.

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд съдържа 132 стр. текст,  
като не са спазени стандартите за съотношението между отделните части (49 стр.  
литературен обзор, 1 стр. цел и задачи, 8 стр. материали и методи; 37 стр. резултати и  
обсъждане; 3 стр. дискусия, изводи 1 стр, приноси 1 стр) включващи 4 таблици, 61  
фигури, приложения и списък на литература с 184 заглавия – всички на латиница. Според  
мен изготвеният списък на съкращенията трябваше да се постави в началото след  
съдържанието, за да улесни читателя при запознаването с разнообразните и непознати  
термини в работата. Представянето на докторската теза в PDF-формат също затруднява  
намирането на значението на многобройните съкращения и разбирането на смисъла.

**Актуалност на темата:** Антибиотичната устойчивост на патогените,  
причиняващи значими заболявания нараства непрекъснато в световен мащаб.  
Европейската мрежа за надзор на антимикробната резистентност (EARS-Net) събира  
данни от всички държави в Европейския съюз (ЕС) всяка година за най-опасните  
патогени. Най-често съобщаваните бактериални видове са *E. coli* (39,4%), следвани от *S.*  
*aureus* (22,1%) и *K. pneumoniae* (11,9%). През 2021 г. повече от половината от изолатите  
на *E. coli*, докладвани на EARS-Net, и повече от една трета от изолатите на *K. pneumoniae*  
са били устойчиви към поне една антимикробна група под наблюдение, а комбинираната

резистентност към няколко антимикробни групи е била често срещана. *E. coli* остава важен патоген в ЕС и света, като случаите все още нарастват с близо 3 % между 2021 и 2022 г. и често се среща комбинирана резистентност. Данните ясно показват, че социалната тежест на инфекциите, причинени от някои устойчиви на антибиотици бактерии, понастоящем вече е сравнима със сумарните щети от социално значими заболявания като туберкулоза, грип и СПИН (Cassini 2018). От друга страна смъртността, асоциирана с АМР само в ЕС възлиза над 33 000 случая годишно, а загубите се измерват в милиарди. Разработването на нови средства и подходи за ограничаване и борба с тези инфекции е обект на работата на научни екипи по цял свят и е залегнало в Глобалния план на СЗО за действие срещу АМР.

Дизайнът на нови съединения с антибактериална активност е един от най-важните въпроси на съвременната биология, биотехнология и медицина. Въпреки широкия спектър от антимикробни агенти, проблемите с лекарствената устойчивост и страничните ефекти остават нерешени досега. Обещаваща стратегия за преодоляване на тези проблеми може да бъде синтезирането на ниско-молекулни антимикробни съединения, атакуващи основни бактериални биомолекули и бактериални нуклеинови киселини. Създаването на олигонуклеотиди, които специфично взаимодействат с бактериални РНК, блокират техните функции и по този начин инхибират бактериалния растеж, е един модерен метод за борба с инфекциите. Едно от основните предимства на този подход е строго селективното потискане на бактериалните клетки, безопасно поради разликите между еукариотни и бактериални ензими. Олигонуклеотидните инхибитори, насочени към прокариотни биомолекули, не се очаква да причиняват нецелев ефекти върху еукариотните клетки. Възможността за потискане на бактериалния растеж чрез разрушаване на иРНК, и регулиране на генната експресия е най-съвременната тенденция при търсенето на антимикробни средства. Предвид посоченото считам, че работата е изключително актуална и предоставя нови и значими данни относно антимикробния ефект на антисенс-олигонуклеотидите и ефектите им върху прокариотни клетки.

**Литературен обзор.** Обзорът е представен на 49 страници и е логично структуриран в отделните части. Извършен е щателен преглед на научните постижения в областта в съчетание с използването на добър научен стил. Приложените 22 фигури са информативни и допринасят за изясняване на всички аспекти от текста. Проследено е използването на съвременните генетични методи и подходи за управлението на генната експресия при микроорганизмите като подробно са разгледани възможностите за

ускоряване и спиране на процесите на транскрипция. В края на обзора са посочени направленията и модерните подходи, представляващи интерес, което логично насочва към целта на работата. Неприятно впечатление прави неспазването на членуването на думите, както и граматичните правила за пълен и непълен член, недопустимо за човек, стремящ се към най-високата научно-образователна степен. Редно е научният ръководител да обръща по-голямо внимание и на правилността на изразите в дисертациите на своите докторанти, което само ще допринесе за по-доброто възприемане на тези изключително ценни постижения, описани в научните тези на докторантите му.

**Цел и задачи.** Целта и шестте задачи са добре формулирани на една страница, отразявайки основните аспекти и същността на дисертационния труд. Задачите са умело подбрани за постигане на поставената цел.

**Материалите и методите** (8 стр) са детайлно и коректно описани, допълнени с 1 таблица, от които личи високото ниво на компетентност на кандидата. Много добро впечатление прави умелото боравене със значителен набор от традиционни микробиологични, биохимични, модерни биоинформационни и статистически методи, които докторантът е усвоил. Всички стандартни микробиологични и генетични техники са детайлно представени. Използвани са пет чуждестранни бази данни и четири биоинформационни програми, създадени от проф. Пенчовски, с които са анализирани и подбрани най-подходящите секвенции за анти-сенс олигонуклеотидите и хамърхед рибозимите, избрани за атака на бактериалните клетки. Методичните подходи съответстват на поставените задачи и осигуряват тяхното реализиране.

**Резултати и дискусия.** Разделянето на резултатите и дискусията в два раздела считам за правилно решение, предвид по-доброто проследяване на логиката на резултатите и новаторския характер на работата. Богатата теоретичната обосновка съответства на експерименталните решения и постигането на поставената цел – създаване на нов универсален метод за контрол на генна експресия при *Escherichia coli* чрез използването на синтетични антисенс олигонуклеотиди, които инхибират LacZ експресията. Резултатите ни представят конструиране на антисенс-олигонуклеотиди за регулация на LacZ-оперон при *Escherichia coli*. Докторантът е избрал този ген, тъй като неговата функция лесно се доказва с биохимична цветна реакция, при която се измерва бета-галактозидазната активност. Този ген е използван още преди близо 35 години като репортерна система за мониторинг на транскрипция при сливане на оперони (Lewandoski, Smith, 1988). В своя труд дисертантът използва плазмид от 10 кб с вмъкнат промоторен елемент на бактериофаг ламбда (Tomich et al., 1988). Въвеждането на рестриктазно място

между два ензима KpnI и BamHI е проверено чрез рестрикционно картиране на генерираните клонове от съответните ендонуклеази. След това е създаден друг фрагмент, съдържащ антисенс олионуклеотид, който инхибира бактериалния растеж. Вторичната предполагаема структура на секвенцията е установена със свободно достъпен софтуер RNA Fold. Целта на клонирането е получаването на ензими, които да се тестват като алостерични рибозими за синтетичен контрол на генна експресия. Извършено е клониране на конструкта за синтетичен контрол на генна експресия в плазмид за експресия на *Escherichia coli* с репортерен ген за Lac Z. Тествана е бета-галактозидазната активност в различни времеви точки. Създаден е нов плазмид pRS414ge като уникален инструмент за експерименти за генетичен контрол в областта на РНК синтетичната биология, с едноетапно клониране на различни алостерични рибозими. Извършено е секвениране на плазмидата и е изяснена неговата нуклеотидна последователност.

Друг принос на докторанта е дизайн на антисенс олигонуклеотид за изключване на генната експресия при *Escherichia coli*, свързан с клетъчно-проникващ пептид pVEC. Този АСО е тестван в 9 различни концентрации и е установено концентрационно зависимо потискане на генната експресия при бактерията. Докторантът използва също и АСОи от първо и второ поколение, вмъкнати в алостеричен хамър-хед рибозим за изключване на генната експресия при *Escherichia coli*. Той проверява стратегията за изключване на генната експресия в рибозим при *Escherichia coli* чрез 5 различни мутации на АСО (mismatch). Тестването е направено с помощта на свободно достъпен софтуер RNAcifold Webserver - <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAcifold.cgi>. Оказва се, че мутациите пречат на изключването на генната експресия и се утвърждава точната работеща секвенция на АСО. Това е проверено и с термодинамичната стойност на различните секвенции, както и с активността на бета-галактозидазата. Интересно би било да се проследи и цитотоксичността на този антисенсолигонуклеотид към различни еукариотни клетъчни линии. Направените забележки не намаляват научната стойност на извършената работа.

**Към докторанта имам следните въпроси:**

1. Има ли други средства освен проникващият в клетките белтък pVEC за пренасяне на антисенс олигонуклеотиди?
2. Какви пътища за прием на създадените антисенс нуклеотиди като лекарства предлагате?
3. Работите със специален щам бактерия, а стандартните в червата на човека и животните как биха се повлияли от такава намеса?

## **Придобита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „Доктор“**

Докторантът е усвоил нови знания в конкретна научна област: изучаване на структурата, свойствата и ефекта на антисенс-олигонуклеотиди във връзка с тяхната антимикробна активност; механизми на техния ефект и техните мишени в прокариотни клетки. Участва в две публикации и една глава от книга, което е повече от достатъчно за постигане на образователната и научна степен „Доктор“.

Докторантът е придобил умения за прилагане на разнообразни методични подходи за разрешаване на конкретни изследователски задачи. Той е усвоил микробиологични, биохимични, биоинформационни и молекулно-генетични методи. В допълнение на специализираните техники той е придобил умения за преподаване на ученици, студенти и кандидат-студенти. Участва и в многобройни специализации и обучения. За успешната му реализация говорят неговите награди като докторант и учител на годината.

Докторантът демонстрира самостоятелност при разработването на новаторски идеи, независимост и поемане на отговорност при разрешаване на научни и практически проблеми, успешно адаптиране към работна среда и усвояване на нови знания.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Въз основа на посочените по-горе аргументи изразявам подкрепа на актуалността на проблемите, обект на дисертационната работа. По отношение на структура, специфични задачи за разрешаване на поставения научен проблем, методични подходи, експериментални решения, реализирани резултати и тяхната интерпретация, изразявам мнение, че дисертацията на докторант **Георги Йорданов Милошев** е напълно завършен авторски труд, който отговаря на критериите обем, съдържание и творчество.

Във връзка с това, препоръчвам почитаемото Научно Жури, назначено със Заповед № РД 38-469/21.07.2023г., да присъди на **Георги Йорданов Милошев** образователната и научна степен „доктор“.

28.09.2023 г.

София

рецензент:

(доц. д-р Илияна Иванова)

