

## СТАНОВИЩЕ

**От доц. д-р Тая Иванова Топузова-Христова, катедра Клетъчна биология и биология на развитието, Биологически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“**

**Относно дисертационен труд на Георги Йорданов Милошев за придобиване на научната и образователна степен „доктор“ в направление 4.3. Биологически науки (Генетика-Биоинформатика) в ДП Генетика към катедра Генетика на Биологически факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски“ с научен ръководител проф. д-р Роберт Пенчовски**

### **Данни за докторанта и докторантурата.**

Георги Йорданов Милошев е завършил бакалавърска степен по Молекулярна биология в Биологически факултет на СУ през 2017 г. и магистърска степен по Генетика и геномика в същия факултет през 2019 г. Зачислен е като редовен докторант към Катедра Генетика на Биологически Факултет, със заповед № РД-20-1188 / 08.07.2019 г, с тема на дисертацията "Дизайн и приложение на функционални нуклеинови киселини за синтетичен контрол на гена експресия" с научен ръководител проф. д-р Роберт Пенчовски и отчислен със заповед №РД-20-1188/11.07.2022 г. По време на докторантурата са положени необходимия брой изпити и са придобити необходимите кредити според индивидуалния план на докторанта. Спазени са всички срокове и критерии съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ, както и минималните национални изисквания според ЗРАСРБ.

### **Данни за дисертацията:**

**Тема.** Темата на дисертацията "Дизайн и приложение на функционални нуклеинови киселини за синтетичен контрол на гена експресия" отразява съдържанието ѝ. Като модел за гена експресия е избран репортерен ген LacZ в плазмид, експресиран в Escherichia coli, а заглушаването на експресията е извършено със синтетичен антисенс олигонуклеотид по дизайн на дисертанта и научния му ръководител.

### **Основни части на дисертацията.**

В литературния обзор подробно е разгледано значението на алостеричните рибозими и РНК-базираните технологии в съвременната синтетична биология, както и

потенциалът им за създаване на нов клас лекарствени препарати, които директно могат да регулират генната експресия в прицелни клетки, а от там и да нормализират техния метаболизъм. Отделна глава е посветена на използването на РНК микрочипове в диагностиката и индивидуалната терапия на ракови заболявания. Тази част е твърде обобщена и с малко конкретни позовавания, което я прави до известна степен неясна и нефокусирана. Като се има предвид целта на дисертацията, а именно контрол на генната експресия в прокариотен модел, би било по-удачно обзорът да се фокусира към използването на алостеричните рибозими като нов клас антибактериални и антивирусни агенти, а не към различни ракови заболявания при човек. Идеята за директно повлияване на генната експресия на ниво трансляция чрез рибопревключватели, както и на ниво транскрипция чрез интерферентни РНК и микроРНК не е нова, но все още е далеч от клинично приложение, поради големия обем от данни, които трябва да се анализират и множеството фактори, които влияят при всяко конкретно заболяване. Тук искам да обърна внимание на докторанта да прави разлика между „клинично приложение“ и „клинична пътека“ – термини, които се отнасят до различни аспекти на клиничната практика (медицински и финансов). Всяка разработка, която показва директно приложение на тази техника в експерименталната практика би била полезна за изясняване на механизмите на действие и приложимостта на модела.

Подробно е разгледана структурата на хамърхед рибозимите и основните особености на тяхното проектиране, както и потенциалните механизми на действието им както при наличие на индикативни за конкретно заболяване РНК, така и при отсъствието на важни за нормалния клетъчен метаболизъм РНК молекули. Специална глава е отделена на проектиране и дизайн на алостеричните рибозими, както и на видовете алостерични рибозими и начините на селекцията им. Обърнато е внимание и на контролът на генна експресия, базиран на рибозими и антисенс олигонуклеотиди. Тази част от дисертацията е разгърната на 62 страници и е илюстрирана с 22 фигури, чиито източници са надлежно цитирани.

Целта на докторската дисертация е създаване на нов универсален метод за контрол на генна експресия в моделна система *Escherichia coli* чрез използването на синтетични антисенс олигонуклеотиди, които инхибират LacZ експресията. За изпълнението на тази цел са формулирани 6 задачи, които включват както биоинформатични, така и молекулярно-биологични методи на съвременно ниво. Използвани са множество бази-данни и програми за дизайн на самите олигонуклеотиди и на стратегията за генно заглушаване. Излишно подробно е описана лабораторната

апаратура, включително на конвенционално оборудване като автоклав, хладилник, фризер, везна, вортекс и др., с описание за какво са използвани. Препоръчвам в следващ научен текст да се ограничи споменаването на лабораторна техника само до уникална такава. Използваните методи и протоколи са представени като работни протоколи, често в милилитри, а не в крайна концентрация, както е прието и по-удобно за възпроизвеждане на експериментите при необходимост. Описаните методи са адекватни на поставените задачи и могат да бъдат възпроизведени.

Резултатите са съпроводени с теоретична обосновка на използваната моделна система, което би могло да се приеме и като предварителна дискусия с оглед на публикувани от други автори изследвания, базирани на гена експресия на LacZ в *Escherichia coli*. Създаването и рестрикционното картиране на плазмида е описано като първи резултат, но са допуснати неточни изрази (например вместо „ендонуклеазно място“ в описанието на фигура 24 и 26 се говори за „KpnI ендонуклеаза“, което не е коректно). В тази част отново са описани отделните стъпки на протокола, което би следвало да е в глава Материали и методи, а в глава Резултати да се коментират само конкретните резултати. Получените конструи са трансфектирани в бактерии и размножени, а след това са подбрани клонове, от които са потвърдени чрез секвениране. Заглушаването на генната експресия е направено чрез антисенс олигонуклеотиди по оригинален дизайн и оригинална авторска стратегия, която е тествана експериментално. В тази част докторантът е описал подробно резултати от различни концентрации на АСО върху експресията. Прави впечатление, че тази част от труда е описана в първо лице, единствено число, а обичайно биологичните разработки са резултат от колективен труд. Като се има предвид, че всички включени публикации във връзка с дисертацията са с повече от един автор, препоръчвам в бъдещи научни текстове докторантът да се придържа към по-коректното множествено число. В тази част липсва и дискусия с оглед на резултати от подобни или свързани научни публикации. В края на дисертационния труд е направена отделно обща дискусия, в която липсват каквито и да е цитирания и има характер по-скоро на заключение и обобщение.

Формулирани се 5 извода, които обобщават постигнатите резултати от отделните задачи и два приноса с теоретико-приложен характер. В края е поставен списък на съкращенията, както и списъци на таблиците и фигурите, като последните считам за излишни.

**Научен апарат.** Цитирани са 184 източника, включително статиите с участие на докторанта във връзка с дисертационния труд, което е необичайно. Прието е тези статии да се дават в отделен списък (което също е направено) и да не се цитират в текста, тъй като включват представените нови резултати. Останалите 181 източника са съвременни и адекватни на темата на дисертацията.

**Автореферат.** Авторефератът съдържа 71 страници и отразява по същество съдържанието на дисертационния труд. Включените части са Въведение, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати, Дискусия, Изводи и Приноси. Посочените технически забележки към дисертацията се отнасят и за автореферата.

**Публикации.** Докторантът е представил списък от общо три публикации по темата на дисертацията – две статии в периодични издания и една глава от електронна книга. Двете статии са в списания с квантил Q3 и Q4, които носят общо 27 точки, а главата от книга още 15 точки, което прави общо 42 точки и по този начин надвишава минималния брой от 30 точки за направление 4.3. Биологични науки, съгласно Приложение 1 на ЗРАСРБ. В едната от статиите докторантът е първи автор, а в другата – втори, което е показател за съществения принос в експерименталните данни и получените резултати, включени в съответните публикации.

**Заключение.** Представеният ми за становище дисертационен труд е посветен на една бързоразвиваща се област на биомедицинските изследвания, а именно търсенето на нови антимикробни препарати. Дизайнът и експерименталните постановки, включени в дисертацията са иновативни и дават надежда за разработването на ефикасни стратегии за борба с мултилекарствената резистентност, която е бързонарастваща заплаха за човешкото здраве. Въпреки направените технически забележки относно оформянето на текста, работата е стойностна и допринася за развитието на биомедицинската наука. Изпълнени са изискванията на ЗРАСРБ за присъждане на научната и образователна степен „доктор“ и давам своята положителна оценка относно присъждането на научната и образователна степен „доктор“ на Георги Йорданов Милошев.

26.09.2023

Изготвил становището:

Гр. София

/доц. д-р Таня Топузова-Христова/