



РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен
„Доктор“

Автор: ЕЛИЦА ХРИСТОВА БОТЕВА

Тема на дисертационния труд: „ДНК ДЕГЛИКИРАЩА АКТИВНОСТ НА
ГЛИКОЛИТИЧНИЯ ЕНЗИМ ФОСФОГЛЮКОЗОИЗОМЕРАЗА“

Научен ръководител: проф. Румяна Миронова,

Рецензент: проф. Марияна Димитрова Аргирова, дн

Катедра по химични науки, Фармацевтичен факултет на Медицински
университет – Пловдив

Настоящата Рецензия е изготвена на основание на Заповед № 111-ОБ/28.06.2024 год. на Директора на Института по молекулярна биология (ИМБ) „Акад. Румен Цанев“ и решение на първото заседание на научното жури, проведено на 12.07.2024 год. Тя е съобразена с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото приложение, както и специфичните изисквания на Правилника за развитието на академичния състав на ИМБ „Акад. Румен Цанев“ (2021).

Всички необходими материали за изготвяне на настоящата рецензия ми бяха предоставени в електронен формат.

1. Кратки биографични данни за докторантката

Елица Ботева е възпитаник на Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, където през 2011 год. получава магистърска степен по генетика след защита на дисертационен труд на тема „Поправка на Амадори продукти в хромозомната ДНК на *Escherichia coli*“. Същата година постъпва на работа в ИМБ първоначално като биолог, а след това като асистент. От 2016 год. е задочен докторант в Института. Специализирала е в научни институции в Швеция, Нидерландия и Япония, а с присъдената ѝ от DAAD стипендия специализира в Германия. Участвала е в три научни проекта, свързани с тематиката на дисертационния труд.

2. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Гликирането (неензимното гликозилиране) е една от най-често срещаните пост-транслационни модификации на протеини в живите организми, но този процес засяга и други дългоживеещи биомолекули. Несъмнено този процес е част от молекулните основи на усложненията, които се развиват при болни с диабет, и потискането на гликирането е част от стратегията за забавяне развитието на това широко разпространено заболяване на модерния свят. Съществуват и редица експериментални данни, че азотните бази на нуклеиновите киселини, които съдържат свободни аминогрупи, главно гуанин, също могат да са обекти на гликиране с различни карбонилсъдържащи метаболити. Получените адукти могат да повлияят на целостта и структурата на ДНК, нейния геномен интегритет и имат мутагенен и канцерогенен ефект.

Най-често използваните терапевтични подходи за борба с нежеланите биологични последици на гликирането включват прилагането на съединения, които разкъсват връзки в омрежените протеини; такива, които инхибират образуването на крайни продукти на напреднало гликиране (AGE) чрез конкурентно свързване на реактивоспособните дикарбонилни съединения, антагонисти на рецепторите за AGE (RAGE) и др. Един сравнително нов, но все още недостатъчно проучен механизъм за предотвратяване на вредните ефекти от гликирането използва обратимостта на образуването на продукта на Амадори и възможността за ензимно възстановяване на нативните биомолекули. Проучени са ограничен брой ензими, които могат да катализират този процес, обединявани с името амадориази или дегликази. Ензимното дегликиране е една потенциална и перспективна стратегия, която, да се надяваме, един ден може помогне за предотвратяване на последствията от гликирането – забавяне появата на усложненията на диабета и стареенето. Ето защо смятам, че темата на дисертационния труд „ДНК дегликираща активност на гликолитичния ензим фосфоглюкозоизомераза“ за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“, поставената цел и следващите я задачи имат актуална научна и научно-приложна стойност.

3. Степен на познаване на състоянието на проблема и на литературния материал

Като цяло литературният обзор показва доброто познаване на проблема от докторантката. Той е критичен поглед върху съществуващото познание за гликирането като процес с подчертаване на крайгълните камъни в това познание и въпросите, все още търсещи отговор. Въпреки многообразните и многопосочни проявления на реакцията на Майяр в храните и живите организми, в прегледа на известното в научната литература докторантката успява в един много концентриран, но информативен вид да представи процеса на взаимодействие между амин-съдържащи съединения и въглехидрати с акцент върху известните *in vitro* и *in vivo* доказателства за гликиране на

ДНК и механизмите на действие на известните дегликиращи ензими. Очертани са и най-новите тенденции в изследванията върху гликирането.

4. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд има класическа структура и добър баланс между отделните части – литературен обзор, материали и методи, резултати и обсъждане, и използвана литература (287 източника).

Аналитично представеният литературен обзор завършва с преглед на досегашния опит на колектива, ръководен от проф. Румяна Миронова върху гликирането в *E. coli* и неговата роля като източник на спонтанни химични увреждания в бактериалните белтъци и ДНК, възможностите за ензимно дегликиране на протеини и нуклеинови киселини, както и все още нерешените и търсещите отговор въпроси, което дава възможност много обосновано да се формулира целта на дисертационния труд.

В раздела „Материали и методи“ всички използвани методи са описани достатъчно подробно, за да позволят възпроизвеждане, а там, където са използвани вече валидирани и публикувани методи от други автори, докторантката се позовава на оригиналните работи.

Изпълнението на поставените в дисертационния труд цел и конкретните задачи е направено в няколко етапа. За изолирането и идентифицирането на ензима фосфоглюкоизомеразата в лизат от *E. coli* докторантката прилага субклетъчно фракциониране на общия лизат и изолиране на ДНК; едно- и двуразмерна електрофореза на фракции, за които се предполага, че съдържат търсения ензим, имунологични методи и техники и като последна стъпка е направено секвениране на протеините за категоричното доказване на присъствието на фосфоглюкоизомеразата. В следващите стъпки е доказана дегликиращата способност на ензима чрез използване на *in vitro* гликирани олигонуклеотид и двойноверижна ДНК, използван е и щам с делетиран ген за фосфоглюкоизомеразата. За решаване на поставените задачи в различни етапи на изследването са използвани редица хроматографски методи – гел-проникваща, йонообменна, високоефективна течна хроматография с мас-детекция, както и някои спектрофотометрични методи за количествено определяне на определени съединения. Там, където е необходимо, получените резултати са обработени чрез подходящи статистически методи.

Много удачно докторантката е обединила резултатите с тяхното обсъждане, защото това позволява да се проследи логиката на експериментите и обосновава използването на всеки метод. Доста често за доказване на дадена хипотеза докторантката използва два различни експериментални подхода, които правят представените резултати от проведените генетични и имунологични изследвания много убедителни и потвърждават, че дегликирането на ДНК се дължи на автентичната изомеразна активност на фосфоглюкоизомеразата.

В дисертационния труд докторантката показва умение за работа със средствата на съвременната биоинформатика – използване различни библиотеки с бази от данни, както и прилагане на молекулно моделиране, молекулна динамика и молекулен докинг като

допълнително доказателство на хипотезата за дегликиращо действие на фосфоглюкоизомеразата.

Дисертационният труд не подминава и някои резултати, които на този етап не могат да бъдат обяснени, но пък разкриват широки възможности за бъдещи изследвания.

Прави впечатление стремежа на авторката да се придържа към терминология на български език, което не навсякъде е необходимо, тъй като в българската научна литература някои от чуждите термини са вече общоприети.

5. Приноси и научно значение на дисертационния труд

В края на дисертационния труд докторантката систематизира основните изводи от проведените експерименти, които в значителна степен дават отговор на поставената цел и задачи. Тя очертава основните приноси на дисертацията, формулирани и обобщени в четири основни точки:

- Открита е неизвестна до сега активност на гликолитичния ензим фосфоглюкозоизомераза.
- Описана е първата ДНК-дегликаза с аматориазна активност и изомеризиращ механизъм на действие.
- Показано е наличието на сигнал за ядрена локализация в две от изоформите на човешката фосфоглюкозоизомераза.
- Направена е първата молекулно-динамична симулация на взаимодействието между гликолитичния ензим фосфоглюкозоизомераза и гликирана ДНК.

Приносите имат оригинален характер и са новост в научната литература.

6. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Получените от докторантката резултати са публикувани в 6 научни статии, които включват значителна част от представените в дисертационния труд резултати. Всички те са били обект на рецензиране от специалисти в областта. Четири от тях имат Journal Citation Index по базата данни Web of Science. Една от тях е в първи квартал, една – във втори и две от тях са в трети квартал. Така докторантката има общо 75 точки за публикувани статии в издания, които са индексирани в световноизвестни бази данни и надхвърля минималните изисквания по показател Г на Правилника за приложение на ЗРАСРБ. Докторантката е първи автор на три от представените публикации. Специфично изискване на Правилника за приложение на ЗРАСРБ в ИМБ – БАН е две от публикациите да бъдат в списания с импакт-фактор 2, което изискване също е изпълнено от докторантката. Представена е и публикувана глава от книга, чийто съавтор е докторантката, която добавя 15 точки по показател Г на Правилника.

Значимата научна стойност на публикуваните статии се подкрепя и от тяхната цитируемост – на тях се позовават над 10 чуждестранни изследователи в рамките на 2-

3 години след тяхното публикуване. Резултатите от изследванията са представени пред научната общност на 10 национални и международни конференции.

Надявам се, че публикация, включваща съвременните *in silico* методи на молекулярното моделиране и молекулярния докинг е в процес на подготовка, тъй като несъмнено тя би предизвикала оправдан интерес за специалистите в областта.

Препоръчвам на докторантката при следващи публикации по темата на колектива, в който работи, да поеме отговорността на кореспондиращ автор, тъй като това е неизменна част от професионалното израстване на всеки изследовател.

7. Автореферат

Авторефератът следва в съкратен вид съдържанието на рецензията на дисертационния труд и в обем от 40 страници представя поставената цел и задачи, използваните методи, получените собствени резултати и адекватна дискусия по тях, като подчертава новостите в проведените изследвания, направените изводи и приноси на дисертацията. Включени са също така библиографските данни на **шестте** публикации върху материал от дисертацията и научните форуми, на които са представени резултатите от направените изследвания.

8. Мнения, препоръки и бележки

Дисертационният труд е написан на много добър научен език, стегнато, следва логичната последователност на експериментите и тяхната интерпретация това го прави много убедителен. Неговото графично оформление е безупречно. Той впечатлява с множеството овладени методи и значително количество данни, представени в 55 фигури и 3 таблици. На места има малки терминологични неточности (стр. 4 автоокисление и автоокисидиране в един параграф; стр. 72 дегликазната активност се *елуиране* основно във фракции 28 – 35 вместо *регистриране*; гел-филтрация вместо гел-проникваща хроматография и др.).

Нямам критични забележки по дисертационния труд, но той породил у мен няколко въпроса:

- Как са избрани условията на гликиране на двойноверижната ДНК (стр. 47)? Хемоглобинът при физиологични условия образува Амадори продукт с глюкоза за около 1 седмица, а както авторката посочва, глюкозо-6-фосфат е далеч по-реактивоспособен от глюкозата. Избраният дълъг период и използването на висока концентрация на въглехидрат благоприятстват образуване на AGEs, което става за сметка на намаляване количеството на субстрата на изследваната реакция – фруктозамина.
- Коя форма на Амадори продукта на гуанина е използвана при докинг моделирането – пет или шестатомен пръстен, тъй като това трудно се вижда от фигурите? За разлика от фруктозата, значителна част от Амадори продуктите съществуват и като шестатомен пръстен.

Заклучение

Съгласно ЗРАСРБ „Доктор“ е образователна и научна степен. Съдържанието на дисертационният труд убедително показва, че докторантката Елица Ботева не само е надградила знания, получени в магистърската степен и е покрила образователната компонента на степента „Доктор“, но и притежава задълбочени теоретични знания и експериментални умения в областта на молекулярната биология. Докторантката е овладяла редица аналитични и инструментални методи, умее да обсъжда критично получените резултати и да ги представя в писмен вид.

Въз основа на направения анализ на значимостта на проведените изследвания, разработения дисертационен труд и представените публикации давам уверено своята положителна оценка и препоръчвам на уважаемите членове на научното жури да присъдят образователната и научна степен „Доктор“ на ЕЛИЦА ХРИСТОВА БОТЕВА в научна област 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки по научна специалност Молекулярна биология.

23 септември 2024 год.

Рецензент: