



Рецензия
на дисертационен труд на тема:

„ДНК дегликираща активност на гликолитичния ензим фосфоглюкозоизомераза“

за придобиване на Образователна и Научна Степен „Доктор“ от
Елица Христова Ботева

Област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика**
Професионално направление: **4.3. Биологически науки (Молекулярна биология)**

Научен ръководител: проф. д-р Румяна Миронова
Институт по молекулярна биология „академик Румен Цанев“- БАН

Рецензент: проф. д-р Светла Димитрова Петрова
Катедра «Биохимия», Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“
член на научното жури, съгласно Заповед № 111-ОБ/28.06.2024 на
Директора на ИМБ-БАН за провеждане процедура по защита на докторска дисертация

1. Обща характеристика на дисертационния труд и представените материали

Дисертационният труд на Елица Ботева е написан, следвайки стандартен принцип – въведение, литературен обзор (41 стр.), цели и задачи (1 стр.), Материали и методи (26 стр.), Резултати и обсъждане (90 стр.), Заключение (1 стр.), Изводи и приноси (1 стр.), Приложения - списък с публикации и участия в научни форуми (4 публикации с импакт фактор, 1 без ИФ и 1 глава от книга; 10 участия на научни форуми - 2 стр.) и Библиография с цитирани 287 литературни и електронни източника, отразяващи актуалността на проблема. Дисертационният труд съдържа 177 страници, 55 цветни фигури и 4 таблици, оформени отлично. Авторефератът и всички представени материали отговарят напълно на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ).

2. Данни за кандидата

Докторант Елица Ботева е възпитаник на Софийската математическа гимназия „Пансий Хилендарски“ и веднага след завършване е приета в спец. Молекулярна биология на СУ „Св. Климент Охридски“, където през 2006г. се дипломира като бакалавър с отличие. Елица Ботева придобива Магистърската степен по „Генетика“ в СУ „Св. Климент Охридски“ и следващото по-висше ниво - ДП по „Молекулярна биология“ на ИМБ-БАН, е абсолютно естественото и закономерно развитие на Елица Ботева като изследовател и учен. Тя придобива завиден експериментален опит, работейки последователно в: Медицински център “Просел” София (2 год.), където изучава техники за изолиране и манипулация на хемопоеични стволови клетки и криоконсервиране на стволови клетки от пъпна връв; Национална референтна лаборатория по ХИВ/СПИН в НЦЗПБ, където се занимава с генотипиране и консервиране; в ИМБ-БАН е биолог и докторант, където започва научната си работа по гликобиология и ДНК гликиране. Впечатляващи са специализиите ѝ като молекулярен биолог в: Япония (Токио, 1 год.) в Електрохимичен и Раков институт на Международната Изследователска Фондация „Хасуми“, където специализира по разработване на пептидни ваксини за имунотерапия на ракови заболявания; в Утрехт (Холандия, 6 мес.) в Департамента по Биохимия и Клетъчна биология в Университета на Утрехт, където изследва взаимодействието гостоприемник-патоген; и в Стокхолм (Швеция), където се обучава по Флоуцитометрия в Департамента по Клетъчна и Молекулярна биология на Института Каролинска, необходим метод за всеки молекулярен биолог

в наши дни. Уверена съм, че Елица Ботева притежава не само уменията, но и мисленето на изследовател и трябва да се посвети на научните изследвания и в бъдеще.

3. Актуалност на дисертационната тема.

Научният проблем, на който е посветен дисертационния труд – „ДНК дегликираща активност на гликолитичния ензим фосфоглюкозо изомераза“ - засяга всички аспекти на съвременната биологична наука – от потенциала на елементарната спонтанна химична реакция на гликиране, през метаболитните превръщания на нейните продукти, отключването на фармакологични и разнообразни физиологични ефекти поради наличието на гликирани биологични макромолекули, до възникване на еволюционна необходимост от ефективно им елиминиране, което може да се постигне само чрез ензимна катализа. Дисертационният труд е предизвикателство с целта си за разкриване на една ензимологична „загадка“ и доказване на многофункционалността в каталитичните механизми и стратегии на ензима фосфоглюкозоизомераза. Спонтанната Майярова реакция и сложната мрежа от реакции на взаимни превръщания на продуктите е еволюционно много стара, показва възможните връзки между всички видове биомолекули и създава основата за термодинамична селекция само на някои определени пътища до крайни стабилни продукти. Този първичен модел на метаболитен път си взаимодейства с метаболитните пътища в клетката и предизвиква съществуващите ензимни регулационните механизми. Изследването на процеса на отстраняване на продуктите от гликирането на ДНК, прави дисертационния труд на Елица Ботева изключително актуален, особено след установената биологична значимост на процесите на гликиране на белтъци и дефинирането им като нормална биохимична логика.

Абсолютно естествено е да се постави въпроса дали е възможно гликиране на НК и именно екипът на проф. Миронова установява (2005г.), че хромозомната ДНК на *E. coli* се гликира при естествени физиологични условия *in vivo*. В настоящият дисертационен труд това откритие се надгражда с: доказване на съществуването на *специфична допълнителна дегликираща активност* на ензима **Фосфоглюкозоизомераза** (PGI, EC 5.3.1.9; glucose-6-phosphate isomerase, phosphohexose isomerase, D-glucose-6-phosphate ketol-isomerase) - консервативен гликолитичен/глюконеогенетичен ензим, катализиращ обратима реакция на вътрешномолекулно пренареждане, с различни изоформи, реакционни специфичности, локализация в клетката и биологична значимост за различни метаболитни пътища; *установяване на мутагенната природа* на продуктите на гликиране в ДНК; доказване на *дегликазна активност* на някои изоформи на човешката PGI и евентуалните механизми за участието на PGI в поправка на гликирана ДНК. Най-важното - *с предлагането на механизтичен модел на катализата на дегликиране на ДНК*, това интегрално изследване се издига на ново и много високо ниво, откривайки възможности за по-детайлно разбиране на механизмите за поправка на ДНК и функционалната пластичност на ензимите.

4. Обща характеристика на дисертацията и познаване на състоянието на проблема от докторанта.

Дисертационният труд на Елица Ботева е написан изключително компетентно и демонстрира отлично познаване на научните изследвания в областта, както и предлага подробен анализ, и обобщение на известната досега информация. Докторантката представя процеса на гликиране на биологични молекули достатъчно информативно, много убедително и в логическа биохимична последователност дефинира работната хипотеза, целта на работата и произтичащите от нея задачи. Елица Ботева извежда основните биохимични принципи: *идентифициране и пречистване на специфичната дегликазна ензимна активност* на фосфоглюкозо изомеразата (PGI) първо в *E.coli* и дрожди като модел; *доказва локализацията, ДНК-свързващата способност* и свойствата на човешката ядрена множествена форма на ензима (hPGI); *определя дегликиращия потенциал* и ефективност на hPGI; *извършва сравнителен анализ* на взаимодействието между структура и

функция на всички изследвани PGI; предлага отличен научен анализ и дискусия на получените експериментални резултати и въз основа на тях използва биоинформатичните методи на *in silico* молекулен докинг и модел за молекулна метадинамика (МД) на ES комплекс - ДНК-NH-F6P-PGI; достига до предлагане на механистичен каталитичен модел на дегликиране и участие на ензима в репаративните механизми на ДНК. Не мога да не отбележа прекрасния стил на писане и оформлене на дисертацията, което се среща рядко през последните години.

Литературният обзор описва подробно химичната същност на гликирането (реакция на Майяр) като спонтанен процес в цялата му пълнота – последователни етапи, потенциални варианти на продукти и взаимни обратими превръщания между тях, концентрационна и структурна селективност на участващите захари, биологична значимост на крайните стабилни ковалентни продукти на гликирането на белтъци и НК, и ролята им за възникване на различни патологични състояния. Централна част в обзора заема процеса на гликиране на ДНК и последствията за нейната стабилност, разгледани са подробно основните природни гликомодификации на гуанозина и 2-деоксигуанозина, получени *in vivo* от гликиращи агенти - глюкоза и глюкозо-6-фосфат глиоксал, метилглиоксал дихидроксиацетон фосфат, глицералдехид и аскорбинова киселина (реактивни карбонилни видове на клетъчния метаболизъм). Описани са значителните структурни и функционални промени в ДНК (едно- и двуверижните скъсвания и модифициране на бази), които гликотоксините и тяхното натрупване могат да предизвикат, както и високия мутагенен потенциал, който тези промени притежават. Елица Ботева разглежда внимателно физиологичните последици на ДНК гликирането и нуклеотидните адукти, установени в миши модели и изследвани при пациенти с диабет тип 2 и диабетна невропатия, което превръща гликираните нуклеотиди в потенциални неинвазивни диагностични маркери за тези патологични състояния.

Тъй като всички процеси в клетката са взаимосвързани и взаимозависими, гликирането на НК от различни гликирани субстрати (гликирани АК или белтъци), доказва сложната мрежа от взаимодействия между всички биологични молекули в клетката, което превръща процесите на отстраняване на натрупаните стабилни гликопродукти в изключително предизвикателство за клетката. В литературния обзор е отбелязан и процеса на гликиране на растителна ДНК, с което се доказва, че гликирането на белтъци и НК е общ за всички организми еволюционен процес и потвърждава основния биохимичен принцип на единството и многообразието на живота.

Литературният обзор на Елица Ботева доказва необходимостта и значимостта на проведените научни изследвания, защото те имат за цел да разкрият част от сложната мрежа от взаимодействия между захари, белтъци и НК, които налагат съществуване на друго по-високо ниво на регулация чрез създаване, както на специфични дегликиращи ензими активности, така и придаване на допълнителни функции на съществуващи клетъчни ензими, което през последните години се оказва също основен биохимичен принцип. Елица Ботева завършва всеки раздел от обзора с обобщение и извод, поставя нови въпроси, които предопределят целта на следващата логична стъпка в изследването и така създава неговата научна последователност.

Целта на дисертационния труд е много конкретна – „Да се идентифицира и охарактеризира дегликиращата активност в *Escherichia coli* K12, отговорна за отстраняването на фруктозо-6-фосфатни остатъци в ДНК“. Тази цел изисква първоначално изпълнение на 3 главни задачи, които дефинират идентифицирането на допълнителна ДНК-NH-F6P дегликазна активност на гликолитичния ензим PGI. Установяването на тази активност изисква нейното ензимологично и кинетично охарактеризиране, което налага още 10 конкретни последователни задачи, свързани с доказване на ядрена локализация, ДНК-свързваща активност на PGI, участието в репаративните процеси на ДНК чрез установената дегликираща активност, биологични функции и роля.

Разделът „Материали и методи“ е написан изключително стегнато, но достатъчно подробно и възпроизводимо във всяка лаборатория, имайки предвид големия брой методи от различни научни области, доказващи интердисциплинарността на научното изследване: физикохимични и аналитични

(седиментационни, хроматографски, електрофоретични, спектроскопски); биохимични и ензимологични; имунологични и молекулярнобиологични; протеомен анализ; статистически методи; биоинформатични анализи за молекулно моделиране, молекулен докинг и метадинамика. Предвид на огромната известност и приложимост на основните аналитични и биохимични методи, не са посочени техните литературните източници, което може би е прието като подход.

Най-съществената част от дисертацията е разделът *Резултати*, представен в 5 отделни експериментално обосновани и завършени глави. *Обсъждането* на резултатите, определянето на мястото на изследваната PGI сред останалите от същото семейство, допълнителните каталитични и некаталитични функции, които може да изпълнява, механизмът на дегликиране и физиологичната значимост на PGI за организмовия свят, са отделени в специален раздел.

Първата глава описва началото на научното търсене на ДНК-дегликираща активност в *E. coli* K12, което се опира на откритието, че хромозомната ДНК на *E. coli* се гликира при естествени физиологични условия *in vivo*, доказано в лабораторията на проф. Миронова. Основният въпрос, който открива началото на нов етап в изследванията, се отнася до доказване на мутагенната природа на продуктите на гликиране в ДНК и евентуалните механизми на тяхната поправка. Затова е необходимо да се идентифицира специфичната ензимна активност, означена като ДНК-NH-F6P дегликаза в *E. coli*. Тази глава е посветена на: *създаването и оптимизирането* на метод за бързо и чувствително определяне на ензимната активност (абсолютно необходима стъпка, подложена на много изисквания и експерименти); избор на ефективна схема на хроматографско пречистване на лизат от *E. coli* (анионообменна хроматография, гел-филтрация чрез HPLC и RP-UPLC), ензимно и електрофоретично охарактеризиране на всяка стъпка на пречистване (Mm на активната дегликазна фракция е определена между 44.3 kDa и 66.4 kDa); доказване на специфичността на правата реакция, катализирана от изолираните 2 дегликазни фракции чрез използване на специално създаден субстрат - ДНК-NH-F6P; доказване на откритата *ДНК-NH-F6P-дегликазна* активност като есенциална на ензима *фосфоглюкозоизомераза (PGI)* (Mm 61.433 kDa, pI 5.9) чрез 2D електрофореза на пречистена фракция 2 и секвениране на получените чисти белтъчни фракции (Applied Biomics (Hayward, CA). Елица Ботева анализира и обсъжда получените резултати в светлината на изследванията на различни научни групи, които доказват биоинформатично, че FrlB-дегликазата на *E. coli* принадлежи към класа на изомеразите по биохимичен реакционен механизъм. Смятам, че резултатите в този раздел и доказването на дегликиращата активност на PGI са предопределящи за изпълнението на останалите задачи. Всъщност, допълнителната ензимна активност на гликолитичния ензим PGI не е изненада в ензимологията след откритието на многофункционалността на много ензими, както по отношение на субстратите и реакционните механизми, така и по отношение на локализацията в клетката, дължащо се на структурната и конформационна динамика, която секвенцията на дадена полипептидна верига може да осигури (термодинамично изгодни варианти). През последните години все повече се налага нов еволюционен принцип в природата, който смятам за особено валиден в биохимията – „закон на нарастващата функционална информация“ („the missing law of increasing functional information“). Няма по подходящи биологични макромолекули от ензимите, които могат да проявяват селекция за една или друга функция и да предлагат на клетката еволюционно предимство.

Втората глава от дисертацията доказва ролята и *кинетичните свойства* на изолираната дегликаза и ДНК-свързващата ѝ способност, като за това се изискват: *създаване на контролен E. coli щам (BW28357) с делетиран pgi-ген (BW28358, Δpgi)*, доказан чрез генетични, имунологични и физиологични методи, с пренебрежимо ниска изомеразна активност в сравнение с дивия щам и склонен към по-висока честота на мутации; *определяне на директни взаимодействия ДНК-белтък* за доказване на ДНК-свързващата активност на PGI, което Елица Ботева осъществява чрез елегантен метод с използване на хомогенна търговска дрождева уPGI (58% секвенционална хомоложност), ДНК-фрагменти с дължина 500 bp (от плазмидна pBR322 ДНК), прилагане на оптимизирана gel-shift електрофореза и специално изготвен, оптимизиран протокол за имунопреципитация. Най-

съществената част от този раздел са *ензимологичните изследвания*, които трябва да докажат функцията и способността на изолираната PGI-дегликаза да катализира реакцията на освобождаване на F6P от субстрата ДНК-NH-F6P. Експерименталното предизвикателство е *създаване на моделен субстрат ДНК-NH-F6P от хибриден дуплекс на пептиднуклеинова киселина (ПНК) и ДНК с единичен гуанинов (G) остатък за гликиране - 5'-СТАСТААТСАГАСТААТА-3'*. Продуктът на гликиране е изследван чрез мас-спектрален анализ, пречистен чрез гел-филтрация и хибридиран с комплементарен 18-мер ПНК олигонуклеотид - 5'-TAT TAG TCT GAT TAG TAG-3', а полученият хибрид е допълнително пречистен чрез RP-UHPLC. Тази сложна схема на получаване и пречистване на субстрат е напълно оправдана за извършване на кинетичните ензимни изследвания, изискващи точно определени специфичност, селективност и ефективност. *Кинетичните изследвания* са усложнени от факта, че се използва спрегната система от последователни реакции – обратима изомеризация на F6P до G6P и окисление на G6P, катализирано от ензима G6PDH (глюкозо 6-фосфат дехидрогеназа) с кофактор е $NADP^+$, добавен в реакционната смес. Кинетиката на спрегнати реакции налага строги изисквания към условията на първата (нулев порядък) и втората (първи порядък) реакции, концентрацията и чистотата на допълнителния ензим - G6PDH, времето на *lag* периода за натрупване на продукта от първата реакция, наличието на инхибитор/активатор на първата реакция и как те се отнасят към компонентите на втората, за да се определят правилно кинетичните константи. Тези ензимологични ограничения са взети под внимание от Елица Ботева и отразени в подробното описание за пречистване на субстрата от примеси. Определянето на скоростта на ДНК-NH-F6P-дегликазната (ДНК-репаративна) ензимна активност от гликолитичния ензим PGI (изолирана от лизати от *E. coli*, щам див тип BW28357) с двата субстрата (ПНК-ДНК(G)-NH-F6P и ДНК(G)-NH-F6P) е доказателство, че условията на реакцията са правилно подбрани. Елица Ботева доказва новата дегликираща функция на PGI и чрез използване на конкурентния инхибитор на изомеразната PGI активност - еритрозо-4-фосфат, който инхибира 100% и процеса на дегликиране на ДНК.

Много важно е приемането, че *нативната структура на гликираната двойноверижна ДНК* има определящо значение за дегликазната ензимна активност, което Елица Ботева доказва чрез използване на *специално създаден субстрат на гликирана високомолекулна ДНК*, което приближава експерименталните условия до природните. Тази, наситена с резултати и потвърдени хипотези глава от дисертацията, завършва с доказване на физиологичната и биологична роля на ДНК-NH-F6P дегликазната активност на PGI, което осмисля интегралното изследване. Много убедително и биохимично логично (висока метаболитна концентрация на G6P, F6P и G1P – 300 mM и висока степен на ДНК гликиране) е приемането, че дегликазната активност на PGI трябва да притежава силен ДНК репаративен потенциал, отстранявайки уврежданията в ДНК причинени от G6P при Майяровата реакция. Елица Ботева доказва тази хипотеза чрез определяне степента на мутабилност на *E. coli* щамове с PGI дефицит, които натрупват значително по-голямо количество G6P в сравнение с щамовете див тип, а мутационните анализи дават статистически значима разлика в честотата на спонтанните мутации в щама с делетиран *pgi*-ген (експоненциална фаза ~ 1.4x и стационарна фаза ~ 2x повече, съответно). Изследвайки продуктите на гликиране (ранни-Амадори, AGEs и CM остатъци), в щамовете *E. coli* див тип и тези с делетиран *pgi*-ген, Елица Ботева предполага съществуването на алтернативни компенсаторни и неперфектни репаративни механизми в дефицитния на PGI щам (NER и TLS).

Третата глава на дисертационния труд е посветена на доказването на ДНК-NH-F6P-дегликазната активност и *ядрената локализация на човешката PGI*, което издига изследването на по-високо ниво. Базирано на високата степен на секвенционална хомоложност (65%) на бактериалната и човешка PGI, сходна 3D структура, идентичен каталитичен механизъм и общия им еволюционен произход, тук се издига работна хипотеза, че hPGI действа като ДНК-NH-F6P-дегликаза във всички организми, от бактерии до човек. *Ядрената локализация на hPGI* се доказва чрез имуноблотинг и индиректна имуофлуоресценция в 2 клетъчни линии – PC3 и HEK293,

култивирани в условия с различна концентрация на глюкоза и специално оптимизиран протокол. Резултатите и от двата метода недвусмислено показват присъствие на hPGI в ядрената и цитоплазмената фракции на двете клетъчни линии. Следващата логична стъпка е *потвърждаване на ДНК-свързваща активност на hPGI чрез ChIP-анализ*, за който са използвани раковите PC3 клетки, поради засилената експресия на hPGI в тях и *прилагане на специфично, ковалентно и необратимо модифициране на anti-hPGI антитялото* (магнитни перли, BS3-омрежител и спейсер от 11 Å) и антитялото срещу хистон H3 за доказване на специфичното белтък-ДНК взаимодействие. Резултатите *доказват ДНК-свързващата активност на hPGI*, което веднага налага секвениране на хроматиновия белтъчен имунопреципитат чрез протеомен анализ и LC-MS/MS, а за разчитането на суровите мас-спектрални данни Елица Ботева използва софтуерни платформи на Thermo Scientific™ Proteome Discoverer и MaxQuant. Най-важният резултат, който се получава от анализа на хроматиновата имунопреципитация с anti-hPGI Ab е *детекцията на гликолитичния ензим GAPDH сред сътаените с hPGI белтъци* (свързани с процесите на ДНК увреждане и репарация), защото принципно GAPDH е асоцииран с PGI и PKM2 в ракови клетки, което е директна подкрепа на предположената от екипа ДНК-NH-F6P-дегликазна (репаративна) функция на ензима hPGI.

Определянето на двете ензимни активности на hPGI - *дегликазна и изомеразна*, съдържащи се във фракционирани лизати от PC3 клетки (тотални, ядрени и цитоплазмени) спрямо гликиран субстрат ДНК-NH-F6P и F6P, доказва *по-високата специфична активност и афинитет на ядрената hPGI към гликиран субстрат (дегликазна) и обратно на цитоплазмената hPGI има по-висока активност към F6P (изомераза)*, доказателство за диференциране на функционалните активности на hPGI. Използването на привидни стойности на кинетичните константи като означения може би се обяснява с неprecистените ензимни форми в лизатите, но ензимологията използва много точна математическа дефиниция за означенията и смятам, че в този случай, когато се използва спрегнат тест от 2 последователни реакции и неизвестна концентрация на ензима в тоталния лизат и наличие на изоформи, кинетичните константи може да не се дефинират като привидни, защото това не позволява прецизен сравнителен анализ на тези основни кинетични характеристики между PGI фракция в лизати на еукариотни PC3 клетки и такива на *E.coli*. Елица Ботева обяснява много подробно и убедително кинетичното поведение на hPGI и правилно диференцира дегликазната от изомеразната активност в различните клетъчни фракции, защото реакцията е проведена при еднакви реакционни условия, както й абсолютно логично стига до предположението, че в цитоплазмата и ядрата на човешките клетки функционират различни изоформи на ензима. Биоинформатичното изследване подкрепя това предположение, защото показва сигнал за ядрена локализация в 2 изоформи на hPGI.

В *следващата глава*, посветена на биоинформатични анализи са: *сравнени първичните структури на PGI и FrIB (дегликазна) от E. coli, и FrIB от S. enterica (17% хомология между АК последователности, но висока степен на структурно сходство)*, с цел установяване ролята на доменната и функционалната 3D белтъчна структура, позволяваща нови ензимни специфичности; *доказани общи захаро-изомеразни домени*, които показват принадлежността на PGI и FrIB към **суперсемейството на захарните изомеразни**; *показани* потенциалните възможности за *динамична доменна организация*, чрез свързване на изомеразния домен с допълнителни домени като ДНК-свързващ НТН домен, което определя многофункционалност на ензима; *анализирани варианти (CATN алгоритъм) на доменната организация на E. coli PGI* и наличие на характерен структурен α - β - α мотив, топологично класифициран като Rossmann fold и еволюционно доказан в около 20% от белтъците от 153 хомоложни семейства; *представени 50 домена* установени в суперсемейството на фосфоглюкозоизомеразите (чрез програмата за подравняване на вторични структури SSAP), които са за връзка с транскрипционни регулатори и свързване на ДНК. Тези сравнителни анализи са показателни за способността на PGI да извършва различни каталитични функции чрез динамика на доменната си организация.

Най-съществена част от анализа в тази глава е посветена на опита за разкриване на каталитичния механизъм чрез *взаимовръзката структура-функция*. Сравнителните биоинформатични анализи на каталитичните центрове предлагат преобладаващ киселинно-основен механизъм на изомеризацията реакция (Glu355 (изомеризация) и Arg270 и His386 (отваряне на пръстена)), осъществяван от координираното действие на 2 различни мономера. При дегликазната реакция, каталитичните остатъци - Glu224 и His240, принадлежат също на 2 различни мономера, което е предпоставка за различна функционалност, но реакцията тук изисква елементарна стъпка с участие на вода. Следващата биоинформатична задача, която е поставена в дисертационния труд цели да докаже дали каталитичните остатъци в АЦ на PGI *E. coli* съответстват на тези в АЦ на дегликазата FrlB на *S. enterica* (jFATCAT алгоритъм на PDB платформата RCSB). Установява се умерено структурно сходство, което се отнася до разпознаването на Амадори продукта -NH-F6P като субстрат. Елица Ботева предполага, че това е основа за наличие на сходни механизми на дегликиране на ДНК-NH-F6P (от PGI) и Lys-NH-F6P (от дегликазата FrlB). В търсенето на *сигнал за ядрена локализация в PGI*, биоинформатичният анализ (BLAST) показва, че изоформите PGI 1 и PGI 3 (от общо 5) притежават допълнителен участък от около 40 АК в N-края си, а програмата NucPred предсказва *наличието на силен NLS точно в този участък, богат на Lys Arg остатъци (KRRRK)*, което класифицира тези изоформи на PGI към белтъци с предимно ядрена локализация.

По-високото ниво на научното изследване, в дисертацията се отнася до *сравняване на бактериалната и човешка PGI с ДНК свързващи и репаративни белтъци*, използвайки REPAIRtoire на лабораторията по биоинформатика и белтъчно инженерство към Варшавския международен институт по молекулярна и клетъчна биология. *Резултатите откриват 25% хомология на бактериалната PGI с ДНК гликозилази*, катализиращи поправката на модифицирани бази. hPGI 3 показва висока степен на хомология (58%) с една репаративна метилгуанин-метилтрансфераза на *E. coli*, което определя механизичната хипотеза за ДНК-NH-F6P дегликиращата ензимна активност на фосфоглюкозоизомеразата в дисертационния труд – *“PGI не е гликозилаза, а ДНК репаративен ензим, който директно отстранява F6P-остатъка от гликираната база”*.

Петата глава „Молекулно моделиране“ издига целия експериментален арсенал, използван в това интегрално изследване, за предлагане на механизъм за ДНК дегликиращо действие на PGI чрез молекулен докинг *in silico* (с 9mG-NH-F6P = 9-метилгуанин, модифициран с F6P и присъединен към екзоцикличната му NH₂-група), което, само по себе си, е много амбициозна задача. Елица Ботева подробно обяснява механизмите, по които Амадори продукта -NH-F6P в гликираната ДНК би нарушила двойноверижната структура, като се предполага, че „внедряването“ на F6P-остатъка между гликираната база и нейната комплементарна база от другата верига води до локално разрушаване на Н връзки. Ако се приеме, че резултатът е „*base-flipping*“ на модифицираната база от вътрешността на двойната спирала се създава локална деформация и извиване на веригата. За потвърждаване на тази работна хипотеза се моделира специален двойноверижен ДНК олигонуклеотид (20-мер) със случайна нуклеотидна последователност и единичен „изтръгнат“ от двойната спирала G-остатък, модифициран с F6P, който се използва като лиганд за заешката rPGI в докинг експериментите. Изводът, който се налага е много значим - „*изтръгнатата*“ модифицирана база се свързва с повърхността на заешка rPGI (използвана като модел) в област, която е с висок положителен електростатичен потенциал, а свързването на rPGI с ДНК е на границата между двете субединици на ензима, т.е. в АЦ, следователно PGI би могла да катализира реакцията на дегликиране. Проведените за първи път анализи на молекулно моделиране (МД симулации) в последователните етапи на целия процес, са отлично описани от Елица Ботева. Тази последна част от изследването е най-впечатляваща с използването на различни програми и метадинамика за максимално приближение към елементарните каталитични стъпки в АЦ на ензима. Те показват 2 различни нискоенергийни ориентации на каталитични групи - Glu357, Lys518 от мономер А и His388 от мономер В, които са

близост до G-F6P лиганда при дегликирането, но в антипаралелна отдалечена позиция спрямо нативния лиганд F6P при изомеризирането.

Обсъждането на получените резултати и сравняването им с научните познания известни досега, другите детектирани ензимни функционалности на PGI в различни организми (лизил-аминопептидаза, алдехид-изомераза, епимеразна активност), по-широката субстратна специфичност и молекулната асоциация с GAPDH, са ключови за доказване на мултифункционалната пластичност, която една полипептидна верига може да предостави.

5. Публикации

Елица Ботева представя получените резултати в 6 публикации в специализирани списания с общ импакт фактор над 10 (*Int.J.Biol. Macromol, IF 8.2*), за които са забелязани над 10 цитата, както и участия на 3 международни и 7 национални, с международно участие, конференции. Докторантката е първи автор в 4 от публикациите, което е доказателство за личния ѝ принос. Дисертационният труд на Елица Ботева е финансиран и включен частично в 2 изследователски проекта, финансирани от МОН, програма за финансиране на младите учени от БАН и стипендия на Германската служба за академичен обмен (DAAD). Научните трудове отговарят на минималните национални изисквания (по чл. 26, ал. 2 и 3 на ЗРАСРБ) и съответно на допълнителните изисквания на ИМБ-БАН за придобиване на образователна и научна степен „доктор“.

6. Качества на автореферата

Авторефератът отговаря на всички изисквания за изготвянето му и представя коректно резултатите и съдържанието на дисертационния труд.

7. Заключение

Научните и научноприложните приноси на проведеното мащабно биохимично, молекулярно-биологично и биоинформатично изследване, високооценените публикации, оригиналността на написания труд и перфектното му техническо оформление са безспорни. Елица Ботева демонстрира отлично познаване на проблема и придобита в хода на работата способност да интерпретира получените резултати, да предлага хипотези, да ги съпоставя с вече публикувани данни и да ги доказва.

След като се запознах с представените в процедурата дисертационен труд и придружаващите го научни трудове и въз основа на направения анализ на тяхната значимост и съдържащи се в тях научни и научноприложни приноси, **потвърждавам**, че представеният дисертационен труд и научните публикации към него, качеството и оригиналността на представените в тях резултати и постижения, отговарят на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за приложението му за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в научната област 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки (Молекулярна биология). Дисертационният труд на Елица Ботева удовлетворява напълно минималните национални изисквания в това професионално направление.

Въз основа на гореизложеното, **препоръчвам** на научното жури да присъди на Елица Ботева образователна и научна степен „Доктор“ в професионално направление 4.3. Биологически науки (Молекулярна биология).

20.09.2024г.

Изготвил рецензията:

проф. д-р Светла Петрова

(Катедра „Биохимия“, БФ, СУ)