

Становище

върху дисертационния труд на Елица Христова Ботева от доц. д-р Анастас Георгиев
Господинов, Институт по молекулярна биология "Акад. Р. Цанев", БАН

Дисертационният труд на Елица Христова Ботева, озаглавен "ДНК дегликираща активност на гликолитичния ензим фосфоглюкозоизомераза", е изготвен в Института по молекулярна биология „Академик Румен Цанев“ към БАН, под ръководството на проф. д-р Румяна Миронова. Дисертацията е представена за присъждане на образователната и научна степен "доктор".

Дисертационният труд на Елица Ботева представлява изследване на ролята на ензима фосфоглюкоизомераза в дегликирането на ДНК и защитата на геномната стабилност. Той съдържа 177 страници, включващи 3 таблици, 55 фигури и обширен литературен преглед с 287 източника.

Представеното изследване, впечатлява със задълбоченост и обхват - от идентификация на ензима осъществяващ дегликирането на ДНК в *E.coli* и човек до детайлите на реакционния механизъм на този ензим.

Литературният обзор представлява обширен и последователен преглед на темата, свързана с гликирането на биологичните макромолекули, и в частност на ДНК. Направен е преглед на изследванията на процеса, описана е Майяровата реакция като основен механизъм, чрез който редуциращите захари взаимодействат с аминокрупите на белтъци и нуклеинови киселини, показано е значението на тази реакция за човешкото здраве и дейност. Дисертантката подробно разглежда влиянието на гликирането върху структурата и функцията на белтъци и ДНК. Основен акцент е ролята на гликирането в нарушаването на геномната стабилност и натрупването на мутации, както и ролята му в редица патологии и в процесите на стареене. Дисертантката прави обтоен преглед на различните механизми, развили се в хода на еволюцията, за защита на биологичните макромолекули от гликиране.

Представяйки съществуващите познания относно процесите на гликиране и дегликиране на ДНК, авторката логично обосновава по-нататъшните си изследвания. Литературния обзор е наситен с информация и показва, че авторката е изключително подготвен специалист в областта си.

Целта на дисертацията е формулирана кратко: "ДА СЕ ИДЕНТИФИЦИРА И ОХАРАКТЕРИЗИРА ДЕГЛИРАЩАТА АКТИВНОСТ В *ESCHERICHIA COLI* K12, ОТГОВОРНА ЗА ОТСТРАНЯВАНЕТО НА ФРУКТОЗО-6-ФОСФАТНИ ОСТАТЪЦИ ОТ ДНК". Задачите са 13 на брой, като всъщност изпълнението на първите 6 напълно постигат заявената цел на работата. Останалите задачи силно разширяват изследването към такова на човешкия ензим, както и представят структурни изследвания свързани с реакционния механизъм, катализиран от фосфогликоизомеразата.

За постигане на поставените задачи, дисертантката използва много широк спектър от модерни методи: биохимични, хроматографски и електрофоретични такива, имуноблотинг, имунопреципитация, количествени методи за измерване на белтъчна и ДНК концентрация, ензимологични тестове, биоинформатични анализи и симулации чрез молекулна динамика. Подробното и прецизно описание на методите прави дисертационния труд ценен справочник за изследователи в областта.

Резултатите, обхващат поредица от експерименти, които систематично изследват ДНК дегликиращата активност на гликолитичния ензим фосфогликоизомераза (PGI) в бактерията *Escherichia coli* и в човешки клетки и разкрват ролята на този ензим в поддържането на геномната стабилност.

Чрез хроматографско фракциониране на клетъчни лизати от *E. coli*, дисертантката успява да получи фракции обогатени на ДНК дегликираща активност. Използвайки двумерационална електрофореза и секвениране на белтъците от тези проби, тя идентифицира PGI като носител на наблюдаваната ДНК дегликираща активност. Този резултат е неочакван, тъй като PGI е известен гликолитичен ензим и неговата възможна роля в дегликирането на ДНК представлява новост в научната литература.

След идентифициране на PGI като потенциален ензим, проявяващ ДНК дегликираща активност, дисертантката изследва способността му да се свързва с ДНК. За целта е използван методът за отместване на комплекс белтък-ДНК в гел (gel-shift), при който PGI показва слабо забавяне в подвижността на комплекса му с ДНК (в сравнение със свободната ДНК), което предполага взаимодействието между ензима и ДНК. Чрез имунопреципитация от лизати на бактериални клетки се установява, че PGI се свързва с ДНК не само *in vitro*, но и *in vivo*. Резултатите от тези експерименти предполагат, че PGI може да играе активна роля в процесите, свързани с поддържането на геномната стабилност. Дисертантката

разработва ензимен тест за дегликиращата активност на PGI, използвайки високомолекулна ДНК, гликирана с глюкозо-6-фосфат (G6P) и установява, че ензимът успешно разпознава двойноверижна гликирана ДНК (ДНК-NH-F6P) и катализира отстраняването на фруктозо-6-фосфатните остатъци. Ботева извършва кинетичен анализ на реакцията на дегликиране и установява, че афинитетът на ензима към гликираната ДНК е сходен с този към естествения му субстрат във физиологични условия. Тези резултати потвърждават възможността PGI да извършва дегликираща реакция върху ДНК.

Изследвана е и физиологичната роля на PGI в *E. coli*, като е сравнена честотата на спонтанните мутации в шамове със и без интактен ген за PGI. Установява се, че шамовете дефицитни по PGI проявяват значително по-висока честота на мутации, което показва, че дегликиращата активност на PGI е свързана с поддържането на геномната стабилност.

Следващият етап на изследванията включва човешкия хомолог на ензима фосфоглюкозоизомераза (hPGI). Чрез имуноблотинг след субклетъчно фракционирне и чрез имунофлуоресценция, дисертантката ясно демонстрира наличието на hPGI в ядрата на човешките клетки от линии HEK293 и PC3. Това предполага, че ензимът може да участва в процесите на ДНК дегликиране и в човешките клетки. Аналогично на по-ранните опити в бактерии, за да потвърди ДНК-свързващата активност на hPGI, Ботева провежда хроматинова имунопреципитация (ChIP) и установява, че hPGI се свързва с ДНК в ядрото. Изследването на тези взаимодействия разкриват възможността hPGI да действа като ДНК дегликаза при човека. Показано е, че всички белтъци, които коимунопреципитират с hPGI участват в поддържането на геномната стабилност. Чрез кинетични изследвания на hPGI е намерено, че бактериалния и човешкия ензим имат близки специфични активности и кинетични параметри в качеството им на изомеризи и дегликази. Получените резултати ясно показват сходството във функциите на човешкия и бактериалния ензими.

По-нататък, дисертантката провежда детайлни биоинформатични анализи, сравнявайки структурните особености на PGI от *E. coli* и други бактериални дегликази. Анализът на пространствените структури на PGI и FrlB от *E. coli*, (предсказани от първичната структура с инструмента Google AlphaFold) показват припокриване, независимо от това, че ензимите се различават по своята функционална активност.

Отделно, в изоформите на човешката hPGI е намерен сигнал за ядрена локализация, което предполага, че човешкият ензим участва в ДНК репарацията.

По-нататък, Ботева преминава към изследвания чрез молекулно моделиране и молекулна динамика. Чрез методите на молекулен докинг тя показва *in silico* взаимодействието между ДНК-NH-F6P и активния център на PGI. Докинг симулациите демонстрират, че субстрата се позиционира стабилно в каталитичния център на PGI, а проведените молекулодинамични симулации показват, че комплексът между PGI и гликираната ДНК остава стабилен и позволява катализиране на реакцията на дегликиране. Чрез метадинамични симулации се потвърждава, че движението на субстрата към каталитично-активната позиция е енергийно благоприятно, което е допълнително доказателство за дегликиращата функция на PGI.

Като цяло, проведените експерименти недвусмислено показват, че PGI, както в бактерии, така и при човек участва освен в метаболизма и в поддържането на геномната стабилност чрез отстраняване на гликирани ДНК адукти. Получените резултати разкриват нов аспект по отношение на физиологичната роля на PGI и отварят широки възможности за изследвания свързващи метаболизма на захарите и геномната стабилност, предвид значението на тези области за човешките патологии и стареенето.

Главата "Резултати и обсъждане" завършва с подглава "Обсъждане", в която авторката подробно и твърде компетентно дискутира резултатите от дисертационния труд в светлината на известното в световната литература, поставяйки акценти както върху молекулярния механизъм на аматорназианата активност на PGI, така и върху физиологичната роля на ензима.

Заклучение: Дисертационният труд на Елица Христова Ботева представлява рядък пример за цялостно изследване на ясно поставен и важен въпрос от клетъчната физиология. В работата личи стремежа на дисертантката към най-пълното разбиране на детайлите на изследвания процес, което води до успешното прилагане от нея на много широк набор от съвременни експериментални методи и методи на биоинформатиката. Стремежа към пълнота и вниманието към детайлите водят и до това, че авторката е навлязла в тематиката в дълбочина, която силно надхвърля обичайното за такъв труд. Независимо от големия обем, дисертацията се чете с удоволствие, благодарение както на отличната експериментална работа, така и на чудесния стил на авторката и цялостната логическа

издържаност на дисертационния труд. Дори само половината от нея би била повече от достатъчна за докторска защита. Предвид казаното, убедено препоръчвам на уважаемото научно жури да и присъди образователната и научна степен "доктор". Завървайки, вярвам, че Елица Ботева ще продължи да работи на такова забележително високо ниво и и желая дълъг и успешен път в Науката.

ПОДПИС:

