

РЕЦЕНЗИЯ

**за дисертационен труд за придобиване на научната и образователна степен
„доктор“**

на тема **„КИНЕТИКА НА НАТРУПВАНЕ И ПРЕМАХВАНЕ НА БЕЛТЪЦИ ОТ
РЕПЛИКАЦИОННАТА ВИЛКА ПРИ НЕЙНОТО СПИРАНЕ И РЕСТАРТ“**,

на Теодора Красимилова Дянкова-Дановска, редовен докторант към Лаборатория по геномна стабилност, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, Българска академия на науките, в научно направление 4.3. Биологични науки (Молекулярна биология) с научен ръководител доц. д-р Стойно Стойнов

От проф. д-р Таня Иванова Топузова-Христова, Катедра Клетъчна биология и биология на развитието, Биологически факултет на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“

Данни за докторанта и докторантурата.

Теодора Красимилова Дянкова-Дановска е завършила бакалавърска степен на образование със специалност Молекулярна биология в биологически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ през 2013 година и магистърска степен по Генно и клетъчно инженерство в Софийски университет „Св. Климент Охридски“ през 2015 година с отличен успех. От 2014 година работи като биолог и по-късно като асистент в секция „Структура и функция на хроматина“ към Института по молекулярна биология, БАН. Теодора Красимилова Дянкова-Дановска е зачислена като редовен докторант през 2016 г. в Лабораторията по геномна стабилност на Института по молекулярна биология към Българската академия на науките, в научно направление 4.3. Биологични науки (Молекулярна биология) с научен ръководител доц. д-р Стойно Стойнов. Докторант Дянкова-Дановска е отчислена с право на защита в срок, като са спазени всички изисквания според *Правилника за прилагане на Закона за развитие на академичния състав на Република България и Правилника за развитието на академичния състав на Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ при Българска академия на науките, раздел 4* и няма допуснати нарушения. По време на подготовката на дисертационния труд за официална защита има прекъсване на сроковете

по ЗРАСРБ за срока на извънредното положение до 13.05.2020 г., на основание &24 от преходните и заключителните разпоредби на Закона за мерките и действията по време на извънредното положение от 13.03.2020 г. Спазени са минималните национални изисквания според *Закона за развитието на академичния състав в Република България, Обн. ДВ. бр.38 от 21 Май 2010г., изм. ДВ. бр.81 от 15 Октомври 2010г., изм. ДВ. бр.101 от 28 Декември 2010г., изм. ДВ. бр.68 от 2 Август 2013г., изм. и доп. ДВ. бр.30 от 3 Април 2018г., изм. ДВ. бр.17 от 26 Февруари 2019г., изм. ДВ. бр.17 от 25 Февруари 2020г.*

Данни за дисертацията.

Темата на дисертацията „Кинетика на натрупване и премахване на белтъци от репликационната вилка при нейното спиране и рестарт“ отразява вярно нейното съдържание. Дисертацията обхваща 108 страници, съдържа 35 комплексни фигури, 6 схеми и 2 таблици. Темата на дисертацията е актуална и съществена за изясняване на ролята и поведението на ключовите белтъци PCNA и RPA при задържане и рестарт на репликацията.

Основните части на дисертацията спазват общоприетият за такъв труд план и включват: Литературен обзор – 23 страници, Цели и задачи – 1 страница, Материали и методи – 10 страници, Резултати – 40 страници и Дискусия – 7 и Изводи и приноси – 1 страница.

В литературния обзор е направен преглед на известните в литературата данни за процесите на репликация на ДНК, участващите белтъци и тяхната роля.

В отделни точки е обърнато внимание на етапите и регулацията на репликацията,. Тази част от дисертационния труд е написана на разбираем език, стегнато и ясно, като достатъчно добре мотивира избора на научен проблем за следващите изследвания.

Формулираните цел и задачи логически следват от направения обзор, а използваните материали и методи са описани коректно и ясно, достатъчно подробно, за да бъдат повторени. Целта на дисертационния труд е да се да се изследват кинетиките на натрупване и премахване на ключови белтъци участващи в репликацията при спиране и рестарт на вилката. Използвани са 3 двойни HeLa Kyoto клетъчни линии стабилно експресиращи белтъците RPA-EGFP, POLD2-EGFP, PAXIP-EGFP и PCNA-mCherry. Всички клетъчни линии стабилно ко-експресират mCherry белязан миши PCNA като положителна контрола и EGFP-белязан белтък от репликационната вилка под контрола

на техните ендогенни регулаторни секвенции. За потвърждение на резултатите и при човек допълнително е използвана една двойна PCNA клетъчна линия, която експресира и човешки и миши PCNA. Всички линии са създадени в лабораторията, в която са проведени и останалите изследвания, свързани с дисертационния труд.

Наборът от методи включва както класически, така и съвременни методи (като time-laps микроскопия, имуноблот и модифициран FRAP анализ). За приложените методи са обяснени и базови теоретични принципи, които обосновават тяхното използване, придружени и с необходимите схеми. Експериментите са проведени прецизно, а получените резултати са интерпретирани логично и с необходимите анализи. Към представените резултати имам един въпрос, свързан с анализа на имуноблота: спрямо какво е направено околичествяването на нативните и белязани белтъци в изследваните линии?

В частта Резултати е представен интерфейсът на разработената компютърна програма със свободен достъп CellTool, която обединява всички необходими инструменти за анализиране на кинетиките на белтъците участващи в процеса на ДНК репликация и поправка, получени от микроскопски експерименти, и FRAP метод. От получените резултати ясно личи, че динамиката на двата изследвани белтъка е пряко зависима от наличието на репликационен стрес и нарушенията в S-фазения контролен пункт за геномен интегритет, предизвикани от промени в активността на ключови фактори от сигнализацията за повреди в ДНК. Кинетиката на RPA в условия на изчерпване на нуклеотидния резерв показва, че независимо от наличието на активен S-фазен контролен пункт, постепенното натрупване на RPA продължава до 90 минути и вероятно активира ATR, което задържа на репликацията, за да предотврати по-нататъшно натрупване на едноверижна ДНК и изчерпване на RPA. Инхибирането на ATM води до генериране на едноверижни участъци и следващия G2-период, а от там и до митотична катастрофа. Инхибирането на ATM не демонстрира ефект върху динамиката на PCNA и RPA по време на спиране и рестарт на вилката в условия на активна ATR киназа, но ко-инхибирането и на двете кинази ATM и ATR разкрива, че ATM до голяма степен предотвратява наличието на едноверижна ДНК след S фаза, когато ATR е инхибиран.

Повечето от фигурите, включени в този раздел са комплексни, с голямо количество микрофотографии от time-laps микроскопските изследвания и графично околичествяване на двата белтъка в единични клетки и дават представа за големия обем

работа, която е извършена при тези анализи. Резултатите са добре илюстрирани и обяснени, като позволяват извеждането на б извода по отношение на поведението на PCNA и PARP1 при блокиране на репликацията с хидрокси урея и в присъствието на инхибитори на ATM и ATR. В отделна глانا е направено обсъждане на резултатите в сравнение с постигнатото и от други изследователски групи и водещите в момента хипотези за участието на изследваните белтъци в процесите на задържане и рестартиране на репликацията. Част от изводите са формулирани като обобщение на получените резултати и имат нужда от по-добро прецизиране. Освен изводите са формулирани и два приноса на дисертационния труд, които напълно приемам.

Научен апарат

Цитирани са 234 източника, които дават възможност да се направи изчерпателен преглед на научните достижения по темата. Всички източници са адекватно подбрани и имат пряко отношение към изследваната тема, в диапазона от 1981 до 2024 година, което показва отличната осведоменост на докторантката. Цитиранията са направени при спазване на утвърдените стандарти за цитиране на научна литература.

Автореферат

Авторефератът съдържа 66 страници и напълно отразява съдържанието на дисертационния труд. Коректно са представени основните резултати, илюстрирани с общо 31 фигури, в които са включени графики, цветни микрофотографии, снимки от имуноблот и схеми. Изводите и приносите са представени коректно и отговарят на тези в дисертационния труд. Включени са и публикациите по темата на дисертацията, както и съкратен списък на цитирана литература, използвана основно в дискусията към резултатите.

Публикации

Основните резултати от дисертационния труд са публикувани в две статии в научни списания с импакт фактор и с квантил Q1 и един ръкопис, който е в процес на рецензиране. В две от публикациите докторантът е първи автор (в едната е споделено първото място), което отразява съществения принос в изработването им. За вече публикуваните статии са приложени разделителни протоколи, отразяващи личния принос на докторанта. За тях в научната литература са открити над 140 цитирания, което е показател за високата научна стойност, която имат тези работи. Според изискванията

на Закона за развитие на академичния състав, двете публикувани вече статии носят общо 50 точки, което надвишава необходимия минимум 30. Освен тези публикации, Теодора Дановска е приложила списък от още една допълнителна публикация и 10 участия на национални и международни конференции, на които е популяризирала получените в дисертационните си изследвания резултати. Тази научно-изследователска активност характеризира Теодора Дановска като един изграден и активен млад учен с отлични перспективи за бъдещо развитие.

Научни и научно-приложни приноси

Като приноси от дисертационния труд са посочени разработването на методологичен подход за изучаване на динамиката на белтъци в комплексни клетъчни процеси и получените от прилагането на този подход данни за динамиката на RPA1, PCNA и POLD2 при спиране и рестарт на репликационната вилка в условията на активен и инхибиран S-фазен контролен пункт. Първият принос е с научно-приложен характер и се отнася до новата методология с висока времева разделителна способност за измерване и изследване на динамиката на белтъци участващи в ДНК репликацията при спиране и рестарт на репликационната вилка. Създаването на компютърна програма със свободен достъп за анализ на микроскопските изображения само по себеси е достатъчно голям приложен и методически принос, а подробното ръководство за работа с посочени параметри и граници при различните протоколи значително улеснява използването ѝ. Вторият принос е фундаментален по отношение на контрола при задържане и рестарт на репликацията през S-фазата на клетъчния цикъл.

Заклучение

В заключение, представено е едно комплексно изследване на за динамиката на RPA1, PCNA и POLD2 при спиране и рестарт на репликационната вилка в условията на активен и инхибиран S-фазен контролен пункт. Изследването е направено с помощта на разработената компютърна програма със свободен достъп CellTool, която обединява всички необходими инструменти за анализиране на кинетиките на белтъците участващи в процеса на ДНК репликация и поправка, получени от микроскопски експерименти, и FRAP метод. Създаването на компютърна програма със свободен достъп за анализ на микроскопските изображения само по себеси е достатъчно голям приложен и методически принос, а удобният за използване интерфейс и подробното ръководство за работа с посочени параметри и граници при различните протоколи значително улеснява

прилагането ѝ. Получени са и нови данни по отношение на контрола при задържане и рестарт на репликацията през S-фазата на клетъчния цикъл.

Въз основа на представените материали, считам, че докторантката напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ за присъждане на научната и образователна степен „доктор“ и препоръчвам на Теодора Красиминова Дянкова-Дановска да бъде присъдена научната и образователна степен „доктор“ в научно направление 4.3. Биологични науки, научна специалност Молекулярна биология.

16.12.2024

Резензент:

Гр. София

/проф. д-р Таня Топузова-Христова/