



## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на Георги Тодоров Дановски „Механизми на разпространение на  $\gamma$ H2AX и MDC1 извън зоната на ДНК увреждане“ представен за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ в област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма: „Молекулярна биология“.

Рецензент: доц. д-р Анастас Георгиев Господинов

### 1. Обща част

Георги Тодоров Дановски разработва докторската си дисертация в Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ (ИМБ) на БАН, в Лабораторията по геномна стабилност, по докторска програма „Молекулярна биология“ под научното ръководство на доц. д-р Стойно Стойнов. Дисертационният труд обхваща 108 стандартни страници и е онагледен с 23 фигури, като са цитирани повече от 270 литературни източници. Работата е докладвана на заседание на разширен научен семинар на ИМБ и единодушно е допусната до защита. Прегледът на документите във връзка със защитата показва, че процедурата по зачисляване, обучение и отчисляване на докторанта е спазена и документацията е изготвена съгласно изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение.

### 2. Биографична справка

Георги Тодоров Дановски е роден на 1 февруари 1990 г. в София. Завършва Националната природо-математическа гимназия „Акад. Л. Чакалов“ през 2009 г. През 2013 г. завършва бакалавърска степен по „Молекулярна биология“ в Софийския университет „Св. Климент Охридски“, а през 2015 г. – магистърска степен по „Биохимия“ в същия университет.

От септември 2014 до март 2015 е стажант по програма „Еразъм +“ в Nuclear oncology research team в Университета на Нант, Франция.

През 2016 г. е зачислен като докторант по специалността „Молекулярна биология“ в ИМБ „Акад. Румен Цанев. Георги Дановски е автор на 8 научни статии (с общ импакт фактор над 33.7), от които 3 са пряко свързани с неговата дисертация. Същите са цитирани около 200 пъти. Участвал е в 18 научни конференции и курсове. Участник в множество национални олимпиади по биология и в подготовката на ученици за националния и международен кръг на олимпиадата по биология.

### **3. Актуалност на разработваната тема**

Дисертацията на Георги Дановски е посветена на изучаването на механизмите на разпространение на  $\gamma$ H2AX и MDC1 извън зоната на ДНК увреждане.

H2AX е субстрат на киназите ATM (Bakkenist & Kastan, 2003) или DNA-PK (Bakkenist & Kastan, 2003; Jackson, 2002) в отговор на двойно-верижни скъсвания и ATR при сигнализиране на репликационен стрес (Cimprich & Cortez, 2008; Zou & Elledge, 2003). В клетките на бозайници фосфорилираният H2AX обхваща големи хроматинови домени и образува ядрени фокуси, които могат лесно да бъдат визуализирани чрез имунооцветяване (Rogakou et al., 1998). Разпространението на  $\gamma$ H2AX в ядрени региони с мегабазов размер около двойно-верижното скъсване се приписва на механизъм на амплификация, включващ белтъка MDC1. Свързаният с  $\gamma$ H2AX MDC1 свързва Nbs1 и стабилизира MRN комплекс на двойно-верижното скъсване (Stewart et al., 2003), което води до допълнително свързване на ATM (Lou et al., 2006; Stucki et al., 2005). Така се създава положителна обратна връзка за разпространение на фосфорилирането на H2AX (Savic et al., 2009). Подобно взаимодействие на MDC1 с TopBP1-свързан ATR свързва ATR киназата към хроматина при условия, които благоприятстват генерирането на едновержна ДНК (Lee et al., 2010). Независимо от тези резултати, механизмите на разпространение на  $\gamma$ H2AX обаче остават недоизяснени. Така например групата на Gaelle Legube подчертвя ролята на кохезин-опосредствената екструзия на бримки в разпространението на  $\gamma$ H2AX при двувержни скъсвания. Този процес включва свързването на кохезин на местата

на двойно-верижните скъсвания, което позволява екструзията на хроматинови бримки, и води до фосфорилиране на H2AX от всяка страна на двойно-верижното скъсване и образуване на фокуси (Arnould et al., 2021).

Тематиката е от голямо значение, тъй като ДНК уврежданията и тяхната поправка са фундаментални процеси за поддържането на геномната стабилност. Множеството изследвания в тази област, показват актуалността на проблема.

#### **4. Познаване на проблематиката**

Литературният обзор в дисертацията на Георги Дановски включва обширен преглед на съществуващите изследвания и теоретични модели, свързани с ДНК уврежданията и механизмите за тяхната поправка. Основните раздели на обзора са: Видове ДНК увреждания - разглеждат се различните видове увреждания на ДНК, включително едноверижни и двуверижни разкъсвания, оксидативни увреждания и увреждания, причинени от външни агенти като ултравиолетова светлина и химични вещества. Механизми на ДНК поправка - описвани се основните механизми за поправка на ДНК, вкл. директна поправка, механизмите на репарацията с изрязване на базата и нуклеотиди, различните пътища на поправка на двойно-верижни скъсвания, репарацията на ДНК сшивки и поправката при неправилно сдвояване. Описана е ролята на хистона H2AX и свързаните с него фактори на поправката. Разгледана е функцията на MDC1 като медиатор в сигнала за ДНК увреждане, който подпомага привличането на други белтъци на поправката към уврежданията. Описват се молекулните взаимодействия между  $\gamma$ H2AX и MDC1 и тяхната роля в разпространението на сигнала за ДНК увреждане извън мястото на увреждане. Разгледани са съществуващите математически модели, описващи кинетиката и динамиката на разпространение на репарационните белтъци в ядрото.

#### **5. Постигнати резултати:**

Основната цел на дисертационния труд е да се проучи процеса на разпространението на  $\gamma$ H2AX и MDC1 извън зоната на увреждане по време на поправка на комплексни ДНК повреди, като следствие от киназната активност на

ATM, и да се предложи математически модел, описващ неговия механизъм. За постигане на целта са формулирани 4 задачи, а именно:

Създаване на софтуер за анализ на микроскопски експерименти с микрооблъчване с ултравиолетов лазер и FRAP; Проследяване кинетиката на натрупване и премахване на изследваните белтъци на места с комплексни ДНК повреди; Разработване на математически апарат и софтуер за пресмятане на биологични модели на реакция-дифузия и моделиране на разпространението на MDC1 и ATM в ядрото на клетките при комплексни ДНК увреждания.

За тяхното изпълнение са приложени множество методи от различни области на науката: микроскопия на живи клетки, в които изследваните белтъци са флуоресцентно белязани, микрооблъчване за предизвикване на комплексни ДНК увреждания и FRAP (fluorescent recovery after photobleaching) на изследваните клетки, имунофлуоресцентна микроскопия, сложен математически апарат за биофизично моделиране на процесите на поправка, разработка на комплексни програмни продукти за анализ на изображения и пресмятане на математическите модели.

В резултат, дисертационният труд на Георги Дановски представя значителни резултати, които могат да се разделят в две големи групи:

- Разработване на CellTool софтуер - Разработен и валидиран е оригинален софтуер за анализ на микроскопски изображения. Софтуерът е използван за измерване на кинетиката на натрупване и премахване на белтъците MDC1 и ATM в живи клетки, както и протичащите обменни процеси на местата на увреждане.
- Моделиране на разпространението на  $\gamma$ H2AX и MDC1: Разработени са няколко математически модела за описване на пространственото и времевото разпространение на  $\gamma$ H2AX и MDC1. Данните подкрепят хипотезата, че дифузията на активирания ATM може да обясни наблюдаваното разпространение на  $\gamma$ H2AX и MDC1 извън зоната на ДНК увреждане. Теоретичните модели са потвърдени чрез използване на различни експериментални техники като флуоресцентна микроскопия и FRAP, са потвърдени теоретичните модели, като се доказва, че

разпространението на  $\gamma$ H2AX и MDC1 не изисква процеси като екструзия на хроматинови бримки.

Основа на работата е разработената компютърната програма CellTool, която позволява количествената обработка на голям обем данни от провежданите в Лабораторията по геномна стабилност микроскопски изследвания. Програмата комбинира всички необходими инструменти за анализиране на кинетиките на белтъците участващи в процеса на ДНК поправка както и за анализ на FRAP експерименти. Програмата предлага удобен графичен интерфейс осигуряващ бърз, лесен и точен анализ на изображенията. Програмата притежава интегриран файл мениджър, средства за подготовка на изображенията (изрязване на конкретни фрагменти), алгоритми за филтриране и сегментиране на изображения, проследяване на обекти, визуализация на измерените резултати, както и анализ на данните - регресионен анализ чрез използването на предефинирани модели за FRAP и за микрооблъчване, както и възможност и за въвеждане на нови модели. Ценността на този свободно достъпен софтуер за изследванията в областта на геномната стабилност се потвърждава ясно от приложението му в няколко публикации.

Като ползвател на софтуера, искам да отбележа, че освен висока функционалност CellTool предлага удобство за работа с много добре обмислен интерфейс, направен с оглед нуждите на изследователя. Последното е изключителна рядкост в множеството софтуерни приложения за решаване на различни задачи.

В изпълнение на експерименталните задачи на дисертацията е установено, че: 1. MDC1 бързо се натрупва на мястото на увреждане с полувреме от 55 секунди, достига максимални нива около 900 секунди и след това се разпространява извън мястото на увреждане; 2. ATM се натрупва по-бързо от MDC1 (полувреме от 40 секунди) но не се разпространява извън мястото на увреждане. FRAP експериментите показват, че ATM се обменя бързо в мястото на увреждане; 3. факторът NIPBL товарещ кохезин, и кохезиновата субединицата RAD21 се натрупват в мястото на увреждане значително по-късно от MDC1, което предполага, че екструзията на бримки не е необходима за първоначалното разпространение на  $\gamma$ H2AX/MDC1.

В резултат на приложението на сложен математически апарат са създадени и 3 модела за описание на разпространението:

1. Стандартен модел - Моделът предполага, че както свързаният, така и свободният активиран АТМ ( $\alpha$ АТМ) фосфорилират H2AX. Той описва точно натрупването и разпространението на MDC1 и динамиката на АТМ. Моделът предполага, че ефективният дифузионен коефициент на активирания АТМ ( $\alpha$ АТМ) е много по-малък от този на неактивния АТМ, вероятно поради многократни събития на свързване и освобождаване.

2. Минимален модел: Той предполага незабавно освобождаване на активирания АТМ без необходимост от други взаимодействия. Моделът дава добро съвпадение с експерименталните данни, което предполага, че свързаните междинни състояния не са необходими за обяснение на разпространението на MDC1.

3. Ограничен модел: Предполага, че АТМ е активен само когато е свързан с мястото на увреждане, без дифузия на  $\alpha$ АТМ, ограничавайки фосфорилирането до непосредствената близост на мястото на увреждане. Този модел не успя да предскаже ранните етапи на натрупване на MDC1 и неговото разпространение извън мястото на увреждане. Това показва, че дифузията на активирания АТМ е критична.

Направен е извод, че дифузията на активирания АТМ е достатъчен механизъм за обяснение на разпространението на  $\gamma$ H2AX и MDC1 извън мястото на увреждане на ДНК, и е опроверган предполагаемия механизъм, според който настоящата хипотеза, че екструзията на бримки е необходима за разпространение на фосфорилирането на H2AX и MDC1. Така, чрез експериментални данни, и тяхното математическо моделиране, е постигнато изчерпателно разбиране на пространствено-времевата динамика на ключови процеси на ДНК поправката.

## 6. Заключение

Според Нобеловия лауреат Sydney Brenner, прогресът в науката зависи от нови инструменти, нови открития и идеи „вероятно в този ред на намаляваща

Важност“. Това напълно се оправдава в дисертацията на Г. Дановски. Чрез създаване на нов, ефективен и удобен инструмент Георги Дановски не само решава задачите на дисертационния си труд, но и позволява на другите в областта да работят успешно с минимум усилия, и така прави възможни много други изследователски дирения. В този смисъл, за мен, стойността на рецензираната работа многократно надхвърля обичайното за такъв тип труд. С помощта на създадения софтуер и с приложението на множество други най-съвременни техники на клетъчната биология, дисертантът постига значими резултати в разбирането на ключов процес за поддържането на геномната стабилност. На фона на казаното, не е учудващо за читателя, че дисертацията е написана прецизно, с внимание към детайлите и дълбоко познаване на проблематиката. Тя ясно показва, че колежата Георги Дановски е един многостранно развил се изследовател, способен да работи на границата на няколко области на науката, прилагайки най-адекватните подходи за решаване на научните задачи, независимо от тяхната сложност. Като мъж желая подобни и още по-големи успехи в бъдещия му професионален път, убедено препоръчвам на уважаемото научно жури да му присъди на Георги Дановски повече от заслужената образователна и научна степен „доктор“.

#### **Цитирана литература:**

Arnould, C., Rocher, V., Finoux, A. L., Clouaire, T., Li, K., Zhou, F., Caron, P., Paull, T. T., & Legube, G. (2021). Loop extrusion as a mechanism for formation of DNA damage repair foci. *Nature*, 590(7845), 660-665. doi:10.1038/s41586-021-03217-6

Bakkenist, C. J., & Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922), 499-506. doi:10.1038/nature01368

Jackson, S. P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23(5), 687-696. doi:10.1093/carcin/23.5.687

Cimprich, K. A., & Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(8), 616-627. doi:10.1038/nrm2450

Zou, L., & Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, 300(5625), 1542-1548. doi:10.1126/science.1083430

Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5858-5868. doi:10.1074/jbc.273.10.5858

Stewart, G. S., Wang, B., Bignell, C. R., Taylor, A. M., & Elledge, S. J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature*, 421(6926), 961-966. doi:10.1038/nature01446

Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Wu, X., & Chen, J. (2006). MDC1 is coupled to activated CHK2 in mammalian DNA damage response pathways. *Nature*, 421(6926), 957-961. doi:10.1038/nature01353

Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., & Jackson, S. P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, 123(7), 1213-1226. doi:10.1016/j.cell.2005.09.038

Savic, V., Yin, B., Maas, N. L., Bredemeyer, A. L., Carpenter, A. C., Helmink, B. A., ... & Bassing, C. H. (2009). Formation of dynamic  $\gamma$ H2AX domains along broken DNA strands is linked to the repair mechanism used and the amount of DNA damage. *Journal of Cell Biology*, 187(4), 477-485.

ПОДПИС: