



## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Албена Йорданова - Софийски университет „Св. Климент Охридски“,  
Медицински факултет, Катедра „Химия и биохимия, физиология и  
патофизиология“, член на научно жури, назначено със заповед №54-ОБ/26.03.2024 г.  
на Директора на Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ - БАН,  
доц. Анастас Господинов, дб

на дисертационен труд 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, Научна  
специалност: „Молекулярна биология“.

**Автор:** Георги Тодоров Дановски – редовен докторант в Лаборатория по геномна  
стабилност, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ - БАН

**Тема на дисертационния труд:** Механизми на разпространение на  $\gamma$ H2AX и MDC1 извън  
зоната на ДНК увреждане

**Научен ръководител:** доц. д-р Стойно Стойнов, Лаборатория по геномна стабилност,  
Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“-БАН

### 1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представеният комплект материали на електронен носител за рецензиране на  
дисертационния труд на Георги Дановски е в пълно съответствие със Закона за развитие  
на академичния състав в Република България, Правилника за прилагането на Закона за  
развитие на академичния състав в Република България и Правилника за прилагане на  
закона за развитието на академичния състав в Института по Молекулярна биология  
„Акад. Румен Цанев“, и включва следните документи:

- дисертационен труд;
- автореферат;
- списък на публикациите по темата на дисертационния труд с приложени копия;
- списък на цитиранията на публикациите по темата на дисертационния труд (към  
27.03.2024 г.);
- списък на участията в научни форуми с доклади и постери, отразяващи  
изследванията по дисертационния труд с приложени сертификати;

- автобиография, включваща и пълен списък на публикациите и участията на научни форуми;
- диплома за придобита магистърска степен ;
- протоколи от положените задължителни изпити на докторанта;
- заповед 820/18.12.2015 г. на директора на ИМБ проф. Ива Угринова за зачисляване в редовна докурантура на Георги Дановски, както и заповед 71/25.01.2019 г. за отчисляване на докторанта;
- протокол от проведен открит семинар на Лабораторията по геномна стабилност от 28.02.2024 г., на който е проведена вътрешната защита на дисертационния труд на Георги Дановски и е насочена за защита;
- заповед №54-ОБ/26.03.2024 г. г. на директора на ИМБ-БАН за назначаване на научно жури за защита на дисертационния труд за придобиване на образователната и научна степен „доктор“;
- приложени са и научните публикации на докторанта по темата на дисертацията.

## 2. Актуалност на тематиката

В представения ми за рецензия дисертационен труд на Георги Тодоров Дановски – редовен докторант в Лаборатория по геномна стабилност, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ - БАН, е разработен нов и обещаващ подход за количествена оценка на репарационните механизми за възстановяване на ДНК чрез съвременните методи на математическо моделиране. Чрез изследване на кинетиката на натрупване и премахване към местата на увреждане на голям брой белтъци, участващи в процеса на поправка на ДНК, е изучена динамиката на пространственото им разпределение в клетката.

Известно е, че при едно от най-сериозните увреждания - двойноверижно скъсване на ДНК, хистон H2AX се фосфорилира от киназата ATM (основната апикална киназа отговорна за фосфорилирането на H2AX при местата на увреждане на ДНК), като получената модификация ( $\gamma$ H2AX – маркер за увреждане на ДНК) се разпознава от белтъка MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*). Докато ATM и MRN комплексът, отговорен за натрупването на ATM, се локализира на мястото на увреждане на ДНК, то  $\gamma$ H2AX се разпространява на разстояние няколко мегабази извън този участък. Въпреки обширните проучвания по въпроса точният механизъм на фосфорилирането на H2AX и натрупването на MDC1 извън мястото на ДНК поправка е все още не е напълно изяснен. Ето защо проведените и анализирани експерименти в дисертационния труд на

Георги Дановски разкриват тайните на удивителните процеси за запазване и съхраняване на информацията в ДНК след възникване на увреждания.

### 3. Познаване на проблема

След като се запознах с дисертационния труд, авторефератът и научните публикации на Георги Дановски, мога да заявя, че докторантът е запознат отлично с анализирания научен проблем, оценява творчески научните изследвания на цитираните автори и може точно и компетентно да ги интерпретира. Изключително подробният и увлекателен *Литературен обзор* към дисертационния труд, в който са включени съвременните представи за причините за възникване на увреждания и механизмите за поправка на ДНК, ясно и последователно въвежда читателя към характера и изследователската цел, която Георги Дановски си е поставил: да се изследва кинетиката на разпространението на  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  и  $\text{MDC}_1$  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 този механизъм. За реализиране на поставената цел са осъществени 4 основни задачи:

- Създаване на компютърна програма, специализирана за анализ на микроскопски експерименти с микрооблъчване с ултравиолетов лазер и FRAP.
- Изследване кинетиката на натрупване и премахване на ATM,  $\text{MDC}_1$ , NIPBL и  $\text{RAD}_21$  на места с комплексни ДНК повреди.
- Разработване на математически инструмент и компютърна програма за пресмятане на биологични модели на реакция-дифузия.
- Моделиране на разпространението на  $\text{MDC}_1$  и ATM в ядрото на клетките след възникване на комплексни ДНК увреждания.

### 4. Методика на изследването

Избраните методи на изследване в дисертационният труд: *клетъчно култивиране; определяне на ядрената концентрация на ATM и  $\text{MDC}_1$ ; провеждане и анализ на експерименти с микрооблъчване с ултравиолетов лазер, анализ на микроскопски изображения от експерименти и определяне на дифузионна константа чрез FRAP, имунофлуоресцентен анализ за детекция на  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ ; както и детайлно математическо моделиране с уравнение на реакция-дифузия*, са напълно адекватни, реалистични и високоинформативни за постигане на поставените цели и задачи в дисертационния труд.

### 5. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е оформен изключително прецизно и дава отлична представа за извършените от докторанта изследвания. Дисертацията обхваща 107 страници, съдържа 28 фигури и 2 таблици. Библиографската справка включва 274 литературни източници от реномирани и индексирани научни издания, като голям брой от тях са от последните години.

*Литературният обзор* е логично структуриран, като са описани ендогенните и екзогенните причини за възникване на увреждания в молекулата на ДНК. Особено внимание е отделено на съвременните представи за механизмите на поправки на ДНК: директни поправки; изрязване на бази; изрязване на нуклеотиди; поправка на неправилно сдвоени нуклеотиди, междуверижни сдвоявания, както и поправка на едноверижни и двуверижни скъсвания. В *Литературния обзор* са цитирани и анализирани многобройни научни изследвания по темата на дисертацията, което прави отлично впечатление. Целта на дисертационния труд е формулирана ясно, а поставените за изпълнение задачи (описани по-горе) обобщават насоките за извършване и анализ на предвидените експерименти.

В раздела *Резултати и дискусия* са представени и анализирани резултатите от проведените прецизни и високоинформативни експерименти. Получени са резултати в 9 основни направления, като от базисно значение за разкриване на изследваните механизми, е разработването на компютърната програма *CellTool* за анализ на получените при експериментите микроскопски изображения и математическо моделиране. Именно Георги Дановски е инициатор и създател на тази високоинформативна програма, която притежава удобен за работа графичен интерфейс осигуряващ бърз, лесен и точен анализ на изображенията. За улеснение при работа с програмата е разработен и алгоритъм за анализ на експерименти с микрооблъчване с ултравиолетов лазер и FRAP, със следните основни стъпки: добавяне на работна директория; подготовка на изображенията; обработка на изображението; отбелязване на прицелните региони; визуализация на резултатите; математическо моделиране, включващо регресионен анализ чрез използване на предефинирани модели за FRAP и за микрооблъчване с УВ лазер. В допълнение, изключително предимство на *CellTool* е че това е програма със свободен достъп и лесно може да бъде изтеглена и инсталирана за използване от изследователи по целия свят.

Получените от докторанта резултати демонстрират в детайли динамиката на локализация на белтъка MDC1 към комплексни ДНК увреждания и обобщават, че ограничената концентрация на MDC1 и неговият бавен транспорт в ядрото влияят върху кинетиката и разпространението му при наличие две последователни индуцирани чрез микрооблъчване комплексни ДНК увреждания. В резултат на проведените експерименти е установено, че индуцираното деградиране на репарационния протеин RAD21 не предизвиква

промени в разпространението на  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  около местата на двойноверижни скъсвания на ДНК, индуцирани чрез третиране със зеоцин или чрез УВ облъчване, както и че активираният АТМ се обменя бързо на местата на комплексните ДНК увреждания със скорост близка до тази на свободно дифундиращ АТМ. За да бъде определен времеви интервал, в който се извършва екструзията на бримките (loop extrusion) при комплексни ДНК увреждания е сравнена скоростта на натрупване на кохезин натоварващия белтък NIPBL, с тези на АТМ и MDC1. Установено е, че кинетиката на натрупване на MDC1 и АТМ е значително по-бърза, отколкото за миши NIPBL, което предполага, че разпространението на MDC1 се случва преди екструзията на бримките при двойноверижни скъсвания на ДНК. Чрез имунофлуоресцентно оцветяване на  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  и чрез количествено измерване на профилите на интензитета на флуоресценция на  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  фокуси е показано, че екструзията на бримките не е необходима за разпространението на  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  при местата на комплексни ДНК увреждания. Предполага се, че други механизми, различни от екструзия на бримките, могат да бъдат отговорни за разпространението на  $\gamma\text{H}_2\text{AX}/\text{MDC1}$  в клетъчното ядро след възникване на комплексни ДНК увреждания. Изказана е хипотезата и са създадени няколко математически модела, които предполагат, че разпространението на  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  и MDC1, след възникване на комплексни ДНК увреждания, предизвиква дифузно придвижване на АТМ, който фосфорилира и хроматина по пътя си до инактивирането на киназата. В заключение, създадените математически модели, с ключовата роля на Георги Дановски, описват основните етапи от процеса на поправка на ДНК увреждания. Разработената математическа теория и компютърни програми се използват при изследването и разкриване на детайлните механизми на пространствено-времевите промени в концентрациите на репарационни белтъци, за да бъдат установени точните молекулни механизми при възстановяване на увреждания в ДНК.

На база проведените комплексни експерименти и анализ на получените резултати са обобщени 5 важни изводи и са формулирани 5 научни и научно-приложни приноса. Личното ми впечатление е, че дисертационният труд е от изключителна важност за разкриване на детайлните механизми на стъпките, стартиращи процеса на репарация на ДНК, но искам да наблегна и на значението на компютърната платформа за анализ на микроскопски изображения *CellTool*, която улеснява измерването на кинетиките на натрупване на белтъци на местата на комплексни ДНК увреждания, както и кинетиката на други белтъци, участващи в процесите на репликация и транскрипция, и в създаването на която Георги Дановски има основен принос.

## 6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

В резултат на проведените изследвания в дисертационния труд са формулирани 6 основни извода и 6 приноса с научно и научно-приложно значение. Резултатите са публикувани в периода 2018-2023 година в 3 научни статии, като 2 от тях са с импакт фактор (*International Journal of Molecular Sciences* - Q1, IF=5.6; *Molecular Cell* - Q1, IF = 14.548) и така са преизпълнени законовите изисквания за придобиване на научната и образователна степен „доктор“. В две от публикациите дисертантът е първи автор, което доказва водещата роля, подчертания интерес и ангажираност на Георги Дановски към изследваната проблематика. В допълнение е приложен списък с 4 публикации (3 от тях са в списания Q1 и една – в списание Q4), като резултатите в тях не са включени в представената за рецензия дисертация. Получените резултати са докладвани на 10 Международни и Национални научни форуми с 5 доклада и 5 постера.

Изключително впечатление прави фактът, че Георги Дановски има над 150 цитирания на публикациите, включени в дисертационния му труд и 198 цитата на всичките му публикации до сега (<https://scholar.google.com/citations?user=IDV5dd8AAAAJ&hl=bg>).

В заключение, представеният дисертационен труд категорично доказва, че докторантът Георги Тодоров Дановски притежава сериозни и задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност Молекулярна биология, като демонстрира изключителни качества и умения за самостоятелно провеждане, анализ и презентирание на научни изследвания, както и в създаването и използването на високоинформативната и лесна за безвъзмездно използване от изследователи по целия свят компютърна програма *CellTool*.

## **7. Автореферат**

Представеният автореферат на дисертационния труд на Георги Дановски е оформен отлично и в съответствие със законовите изисквания, отговаря напълно на съдържанието на дисертацията и дава изчерпателна информация за проведените експерименти, получените резултати, обсъждане и анализ на проведените изследвания.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Представеният за обсъждане и защита дисертационен труд е резултат от прецизно осъществено изследване, резултатите от което са със съществена теоретична и приложна значимост. Въз основа на всичко гореизложено уверено мога да заявя, че рецензираният дисертационен труд на тема „*Механизми на разпространение на  $\gamma$ H2AX и MDC1 извън зоната на ДНК увреждане*“ представлява оригинална научна разработка. Той отговаря на всички условия на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за

неговото приложение и Правилника на Института по Молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ - БАН.

Всичко гореизложено ми дава основание убедено да изкажа своята положителна оценка за проведените изследвания в дисертационния труд, постигнатите резултати и приносите с научен и научно-приложен характер, като предлагам на почитаемото научно жури да присъди напълно заслужено образователната и научна степен „Доктор“ на Георги Тодоров Дановски в Ооооооообласт на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, Професионално направление: 4.3. Биологически науки, Научна специалност „Молекулярна биология“.

30.05.2024 г.

Автор на рецензията:

(проф. д-р Албена Йорданова)