



## СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Кирил Михайлов Мишев (ИФРГ-БАН)

за дисертационния труд „Механизми на разпространение на  $\gamma$ H2AX и MDC1 извън зоната на ДНК увреждане“,

представен от **Георги Тодоров Дановски** (Лаборатория по геномна стабилност, ИМБ-БАН) за придобиване на образователната и научна степен „**Доктор**“

Дисертационният труд на тема „Механизми на разпространение на  $\gamma$ H2AX и MDC1 извън зоната на ДНК увреждане“, представен от Георги Тодоров Дановски за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“, е изработен под ръководството на доц. д-р Стойно Стойнов от Лабораторията по геномна стабилност към ИМБ-БАН.

Работата на Георги Дановски е посветена на изследване на механизмите на поправка на комплексни увреждания на ДНК в човешки клетки, в частност на кинетиката на натрупване и последващо отстраняване на белтъци на поправката в хода на ДНК репарацията. В резултат на действието на химични или физични агенти е възможно в рамките на един и същ участък от ДНК да се индуцират едновременно няколко различни типа увреждания. Всяко от тези увреждания отключва специфичен механизъм за ДНК репарация, свързан с активирането на белтъци на поправката и разполагането им в ограничено пространство около ДНК лезията в строго определена последователност. Тези процеси са подложени на многостранна посттранслационна регулация с цел прецизното им координиране в пространството и времето. Голямата динамика при осъществяването на отделните стъпки от поправката обаче значително затруднява изучаването ѝ с конвенционални подходи. Ето защо дисертантът прилага интердисциплинарна стратегия, основана на съчетаването на методи от областта на молекулярната и клетъчната биология, програмирането и математическото моделиране.

Основно направление в работата на Георги Дановски е създаването и оптимизирането на софтуер за анализ на микроскопски изображения, който позволява да се изследва кинетиката на репарация при увреждане на ДНК. Сред ключовите предимства на компютърната програма CellTool са възможностите за високопроизводителна обработка на голям брой файлове от time-lapse експерименти, включваща автоматизирано сегментиране и проследяване на фокуси на ДНК поправка. Заложените в програмата алгоритми за визуализация на резултатите и математическо моделиране на данните неотдавна са били успешно използвани за установяване на динамиката на асоциация и дисоциация на около 70 белтъка на поправката в човешки клетки *in vivo*. В настоящата дисертация Георги Дановски използва разработените от него алгоритми за изучаване на ранните етапи от репарацията на комплексни ДНК повреди, свързани с разпознаване и маркиране на увреждането. С помощта на клетъчни линии, експресиращи флуоресцентно белязани белтъчни маркери, дисертантът проследява кинетиката на разпространение на фосфорилиран H2AX в зоната на увреждане и извън нея. Прецизни измервания на времената на натрупване на ATM киназата и медиаторния белтък MDC1 след индуциране

на ДНК увреждане разкриват неочаквано висока скорост на обмен на активиран АТМ. Тази висока скорост не е в съответствие с публикуван от друг научен колектив модел за разпространение на фосфорилиран H2AX, основано на екструзия на хроматиновите бримки. Валидността на горепосочения модел не се потвърждава и от допълнителни експерименти, в които дисертантът не установява директна роля на свързани с кохезинова функция белтъци за разпространението на фосфорилиран H2AX. Въз основа на експерименталните данни Георги Дановски създава работна хипотеза за съществуване на свободно дифундиращ активиран АТМ, който, преди да се инактивира, извършва фосфорилиране на H2AX в отдалечени от мястото на увреждане участъци от хроматина. За валидиране на тази хипотеза е създаден математически модел, който описва с висока точност получените експериментални данни и доказва, че кинетиката на разпространение на  $\gamma$ H2AX и свързаното с него разпространение на MDC1 се основава на дифузия на активирана АТМ киназа. Като цяло, описаните в дисертацията експериментални и теоретични изследвания са с фундаментален характер и съществено допринасят за изясняването на динамиката на молекулните процеси в началните етапи от поправката на ДНК. Оттук следва и значимостта на получените резултати в контекста на предизвиканите от геномна нестабилност голям брой заболявания при човека.

Литературният обзор и списъкът с използвана литература (общо 274 литературни източника) показват отличното познаване от дисертанта на съществуващите до момента изследвания в областта на геномната стабилност. Разгледани са основните типове увреждане на ДНК, както и физичните и химичните агенти, които най-често се свързват с индуциране на ДНК повреди. Направен е преглед на механизмите на ДНК репарация в зависимост от вида на увреждането, като последователността от събития и участващите белтъци са изчерпателно илюстрирани с фигури, адаптирани от ключови обзорни публикации по разглежданата тематика.

Целта и задачите на дисертационния труд са представени кратко и ясно. Използваните от дисертанта методи за постигане на заложените задачи включват подходи за индуциране на ДНК повреди чрез микрооблъчване с UV лазер, съвременна светлинна микроскопия (имунофлуоресценция, конфокално микроскопски анализ на локализацията на флуоресцентно белязани белтъци в живи клетки, FRAP), математически апарат за решаване на частни диференциални уравнения, регресионен анализ на микроскопските данни с математическо моделиране. Описанието на методите в тази част от дисертацията е изчерпателно и позволява възпроизвеждане на експериментите при необходимост.

Разделът „Резултати“ обхваща 29 страници (около 1/3 от обема на дисертацията без библиографията) и съдържа 1 таблица и 16 фигури, повечето съставени от няколко панела с данни. Експерименталните резултати и математическото моделиране са описани ясно и в логически порядък, като е следвана последователността, зададена в раздела с целите и задачите. В началото дисертантът представя основните инструменти и протоколи, заложен в разработената от него компютърна програма CellTool. Главните предимства на програмата при анализ на time-lapse експерименти са автоматизираното сегментиране и проследяване на фокуси на ДНК поправка, заложените протоколи за FRAP анализ, графичното представяне на резултатите от обработката, моделирането на експериментално получените кинетики на натрупване и премахване на белтъци от изследвания фокус със заложен или зададен от потребителя математически апарат. След експериментално валидиране на протоколите за анализ, дисертантът използва CellTool за изучаване на

динамиката на натрупване на АТМ, МDС1 и кохезин след индуциране на комплексни увреждания в ДНК чрез микрооблъчване. За разлика от МDС1, който се характеризира с по-ниска мобилност в резултат на свързването му с хроматина, при АТМ дисертантът наблюдава бърза обмяна в зоната на ДНК лезията. Георги Дановски установява, че разпространението на  $\gamma$ H2AX и МDС1 изпреварва натрупването на кохезин и по този начин поставя под съмнение валидността на публикуван модел, който обвързва разпределението на нуклеозоми с фосфорилиран H2AX с кохезин-зависима екструзия на хроматинови бримки. Въз основа на регистрираните кинетични константи дисертантът формулира алтернативна хипотеза за разпространението на  $\gamma$ H2AX и МDС1, дължащо се на свободна дифузия на активирана АТМ киназа. За доказване на тази хипотеза Георги Дановски разработва пространствено-времеви математически модели на разпространението на МDС1, които отчитат дифузията на активиран АТМ. Моделите са тествани с експериментално измерени коефициенти на дифузия на АТМ и МDС1.

Разделът „Дискусия“ обхваща 5 страници, като в тази част от дисертацията Георги Дановски е успял в кратък и стегнат вид да обобщи предимствата на създаденото от него софтуерно приложение. Тук дисертантът е могъл по-добре да изложи приносния характер на своята работа. Високата процесивност, която осигурява неговата програма за полуавтоматизиран анализ на изображения, би могла да бъде съпоставена с примерен протокол за ръчна обработка на time-lapse филми с комбинирано използване на много отделни приложения. По-нататък дисертантът обсъжда получените резултати в светлината на публикуваните към момента изследвания от други автори, като акцентира на високото съответствие на генерирания от него математически модел с експерименталните данни. Формулирана е хипотеза, която обвързва използвания подход за индуциране на ДНК увреждания с установените различия в механизма на разпространение на  $\gamma$ H2AX и МDС1 спрямо предишни публикувани модели.

Изводите и приносите в края на дисертацията са ясно формулирани и напълно отразяват представените експериментални резултати. Представеният автореферат коректно резюмира дисертационния труд и публикационната активност на Георги Дановски.

Статиите на дисертанта по темата на дисертацията са общо три. Две от тях са публикувани в международни списания с висок импакт фактор, като общият брой на цитиранията до момента надхвърля 150! В тези статии индивидуалните приноси на Георги Дановски са ясно разграничени от тези на останалите съавтори. Третата публикация е в процес на ревизия, като ръкописът е публично достъпен под формата на препринт в депозитна база данни. Представената допълнителна информация за невключените в дисертацията публикации и участията в научни форуми свидетелства за високата научна активност на Георги Дановски.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

Дисертационният труд обобщава по убедителен начин няколкогодишни изследвания на Георги Дановски с фундаментална насоченост. Дисертантът прилага интердисциплинарен подход, с който успешно преодолява съществуващите методични ограничения при изучаването на процес с голяма молекулна динамика, какъвто е репарацията на комплексни ДНК увреждания. Експериментите са извършени и анализирани

прецизно с използването на съвременни микроскопски методи с висока чувствителност и разделителна способност. Достъпът на Георги Дановски до високотехнологични платформи в ИМБ му е дал възможност да се изгради като висококвалифициран изследовател в областта на молекулярната и клетъчната биология. В същото време дисертантът придобива впечатляващ опит в областта на регресионния анализ и математическото моделиране, които успешно прилага за изучаване на началните етапи от разпознаването и маркирането на увредени ДНК участъци. В тази връзка са получени оригинални научни резултати, които допринасят за по-пълното разбиране на процесите на поддържане на геномната стабилност в човешките клетки. Значителен принос от работата на Георги Дановски представлява създаването и оптимизирането на компютърна програма за анализ на микроскопски изображения от участъци с ДНК увреждания, в които протичат процеси на поправка. Освен с иновативните алгоритми за сегментация, проследяване, анализ и моделиране на данните, софтуерното приложение се отличава със свободен достъп и с публикуван код, което е предпоставка за засилен бъдещ интерес от научната общност, работеща в тази област. Високата цитируемост на представените научни публикации по темата на дисертацията свидетелства за актуалността и голямата значимост на получените резултати. Въз основа на представените ми за становище материали считам, че са напълно изпълнени нормативните изисквания и **убедено препоръчвам на уважаемото научно жури да присъди на Георги Тодоров Дановски образователната и научна степен „Доктор“.**

27.05.2024 г.

Изготвил становището

(Кирил Мишев)