

# **СТАНОВИЩЕ**

**на дисертационен труд  
за присъждане на образователната и научна степен „доктор”  
на Христина Илиева Димитрова  
на тема**

## **КРИСТАЛИЗАЦИЯ И СТРУКТУРЕН АНАЛИЗ НА ДВЕ ПАЛИНДРОМНИ ДНК СЕКВЕНЦИИ С ФЛУОРЕСЦЕНТНИ МАРКЕРИ**

**от доц. д-р Нели Стоянова Косева, Институт по полимери, БАН**

Представеният дисертационен труд е в бързо развиваща се съвременна научна област, а именно структурната биология. Предмет на изследването е определяне на кристалната структура на олигонуклеотиди (палиндромни ДНК секвенции) и на техни комплекси с флуоресцентни багрила - тематика, която е актуална в световен мащаб, а на национално ниво – слабо застъпена.

Докторантът Христина Димитрова притежава добра образователната и теоретична подготовка. Тя е завършила Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ (магистър по специалност „Екология и опазване на околната среда“). През 2012 г. е зачислена в редовна докторантура по специалност „Минералогия и кристалография“, направление „Структурна кристалография и материалознание“. Хр. Димитрова е представила доказателства (протокол и сертификати) за успешно положени изпити по базов специализиран предмет „Минералогия и кристалография“, така и за три специализирани курса и участие в две международни школи с тематика, които безспорно допринасят за повишаване на познанията и компетентността на докторанта за разработване на дисертацията и успешно решаване на поставените задачи.

Дисертационният труд се състои от основен текст (70 страници), който включва 14 таблици и 38 фигури. Цитираната литература наброява 113 източника. Представени са също като приложения три валидиращи доклада на определените структури на изследваните олигонуклеотиди (номера 5JU4, 5T4W и 5NT5), както и сравнителни графики и таблици за наблюдаваните структурни разлики между 5JU4 и 5T4W.

Целта на дисертационното изследване е ясно формулирана - включва търсеня краен резултат, а именно определяне на кристалната структура на съкристализационни форми на палиндромни ДНК олигонуклеотидни секвенции с флуоресцентни маркери,

както и основните експериментални инструменти за постигането ѝ - израстване на монокристали и рентгеноструктурен анализ. Изброени са седем конкретни задачи, които ас. Хр. Димитрова решава последователно и най-общо оформят матрицата на дисертационния труд.

Литературният преглед по темата е обстоен, представящ информация и експериментални резултати, отнасящи се до структурата, свойствата и биологичните функции на дезоксирибонуклеиновата киселина (ДНК), въведени са специфични термини и определения, необходими при дискусията на получените резултати. Посочено е значението на изучаването на Дикерсоновия додекамер и наличните структурни данни в Базата данни на протеините и на нуклеиновите киселини (PDB и NDB). В допълнение, направено е насочено въведение на експерименталните и инструменталните методи и техники, използвани заедно с монокристалния рентгеноструктурен анализ при изясняване на свойствата и структурата на изследваните обекти.

В частта „Материали и методи“ докторант Хр. Димитрова е обосновала избора на палиндромната ДНК секвенция 5'-CGTGAATTACG-3' като основен обект на изследване в дисертацията ѝ; представени са характеристиките на използваните олигонуклеотиди и лиганди, стъпките на кристалографската разшифровка на макромолекули по метода на молекулно заместване, използвания софтуер, както и метода на флуоресцентно интеркалационно заместване, приложен при определяне на селективността и афинитета на изследваните лиганди и палиндромни ДНК секвенции.

Определянето на кристализационните условия на макромолекули, особено на биомacroмолекули, е времеемка и съвсем не тривиална задача. В конкретния случай монокристали са получени в среда на какодилатен буфер, съдържащ алкохол, двувалентни катиони и полиамин (спермин). Решени са структурите на  $d(\text{CGTGAATTACG})_2$  и с включен флуоресцентен маркер 4',6-диамидин-2-фенилиндол (DAPI) чрез монокристална рентгенова дифракция с постигнати високи резолюции от 2.0 Å и 2.2 Å, съответно, в пространствена група  $P2_12_12_1$ . За подобряване качеството на дифракцията експериментите са проведени при температура 130 К. Двете структури имат изоморфно сходство и са депозирани в PDB под номера 5JU4 и 5T4W. Дискутирани са важни техни характеристики като брой включени водни молекули, дължини на водородните връзки, разположение на  $\text{Mg}^{2+}$ , влиянието на DAPI върху конформацията на двойната спирала и хидрофобността на комплекса. Подобно е определена кристалната структура на същия олигонуклеотид в присъствие на Беренил. Координатите и структурните фактори са депозирани в PDB под номер 5NT5. Особеното в случая е, че за разлика от съкристализацията с DAPI, 5NT5 не съдържа лиганда Беренил, но се наблюдават различия с 5JU4. В структурата 5NT5 са

налични по-малък брой водни молекули и  $\text{Na}^+$ , които са изместили  $\text{Mg}^{2+}$ . За наблюдаваните разлики в решените структури са предложени обяснения и/или изказани хипотези. Изследвано е също взаимодействието на олигонуклеотида с 4-ри флуорофора, предоставени от колеги от Института по органична химия с Център по фитохимия - БАН. Получените резултати са онагледени с достатъчен снимков материал, пространствени формули и модели. Трябва да се отбележи, че голямата част от експериментите са проведени с наличното оборудване на Института по минералогия и кристалография – БАН, а само най-чувствителните образци са отснети на синхротрон.

Резултатите от дисертационното изследване са обобщени в десет извода, които правилно отразяват същността на изследването и доказват постигането на целта му. Важно е да се посочат безспорните приноси на работата, особено като се има пред вид, че е първото подобно изследване на национално ниво: Протеиновата база данни (PDB) е обогатена с координатите и структурните фактори на структурите на двойноверижан олигонуклеотид  $d(\text{CGTGAATTCACG})_2$  в отсъствие и присъствие на флуоресцентни маркери DAPI и Berenil, получени чрез монокристална рентгенова дифракция при високи резолюции, като за номер 5JU4 резолюцията от 2.0 Å е най-високата за тази структура.

Резултатите от дисертационното изследване са отразени в две публикации в научни списания и един доклад в пълен текст в тематичен сборник от международна конференция – всички, притежаващи импакт фактор. Освен това докторант Хр. Сбиркова-Димитрова е участвала с доклад и постер на международни научни форуми. Забелязан е 1 цитат на публикацията в Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology Communications, **73** (9), 2017.

Към дисертационния труд имам следните бележки и препоръки:

- Допуснати са технически грешки. Ще отбележа само някои, които водят до двусмислие като: на стр. 33 - диминазенов ацетат вместо диминазенов ацетурат (или ацетилглицинат); стр. 30 и 64 натриевият какодилат/какодилатният йон е обозначен като  $\text{NaCaCo}/\text{CaCo}^-$  вместо  $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}/(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2^-$ ;
- Водородната връзка, както е отбелязано на стр. 6 се дължи на взаимодействие на привличане между полярни групи, но не може да се определи като електростатично взаимодействие. Силите, на които се дължи възникването на водородната връзка имат по-сложен произход – частично електростатични, такива породени от пренос на заряд между донора и акцептора, както и дисперсионни сили;

- Неправилно е употребен терминът „лекарствена форма“ (стр. 11), с който се определя състоянието (формата) на прилагане/прием на лекарственото вещество, например под формата на прах, маз, разтвор и др.;
- Полиетиленгликолят (ПЕГ) не е полиамин, а полиетер;
- Фигури 15 до 20 представляват структурни формули, а не схематично представяне на веществата; на Фигура 16 липсва противойона;
- Неточно е обяснението (стр. 56): ДАРІ е хидрофобна молекула, която придава своето поведение на ДНК и по този начин ограничава наличието на водни молекули.

Въпреки отправените бележки, общото ми впечатление е много добро. Дисертационното изследване изисква многостранни познания и умения, които ас. Христина Димитрова без съмнение притежава и надгражда.

*Заключение:*

Представеният дисертационен труд представлява актуално изследване върху кристалната структура на палиндромни ДНК секвенции с включени флуоресцентни маркери. Поставените цел и специфични задачи са изпълнени, като са използвани разнообразни техники и методи. Тълкуването и обобщаването на получените резултати, ми дават основание да оценя представения труд като дисертабилен. С убеденост давам положителна оценка за дисертационния труд и препоръчвам присъждането на ас. Христина Илиева Димитрова образователната и научна степен „Доктор“ по професионално направление: 4.4. "Науки за Земята", научна специалност "Минералогия и Кристалография".

29.05.2018 г.

Доц. д-р Нели Косева