

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ по професионално направление 4.4. Науки за земята, Научна специалност 01.07.05. „Минералогия и кристалография“

**Тема на дисертационния труд:** „Кристализация и структурен анализ на две палиндромни ДНК секвенции с флуоресцентни маркери“

**Автор на дисертационния труд:** Христина Илиева Димитрова, ИМК - БАН

**Рецензент:** доц. д-р Петър Иванов Христов, ИБЕИ – БАН

1. Лични данни на докторанта

Христина Илиева Димитрова е родена в гр. Смолян на 05.10.1981 г. През 2005 г. завършва магистратура по Опазване на околната среда в СУ “Св. Климент Охридски”, Биологически факултет, специалност „Екология и опазване на околната среда“. Зачислена е като редовен докторант в ИМК – БАН през 2012 г., специалност 01.07.05. „Минералогия и кристалография“ към направление „Структурна кристалография и материалознание“ с научен ръководител проф. д-р Борис Шивачев.

По време на докторантурата си Христина Димитрова е положила изпити по специалността, английски език и информационни технологии. Успешно е завършила специализирани курсове по „Термичен анализ – същност, методи и приложения“, „Рентгеноструктурен анализ“ и „Инфрочервена спектроскопия“. През 2017 г. е избрана с конкурс за асистент

към направление **“СТРУКТУРНА КРИСТАЛОГРАФИЯ И МАТЕРИАЛОЗНАНИЕ”** в ИМК - БАН.

## 2. Анализ на дисертационния труд (ДТ).

Дисертационният труд съдържа 118 страници и е структуриран в следните 6 основни глави: Увод, Литературен обзор, Материали и методи, Резултати и дискусия, Изводи, Приноси и Приложения. Той съдържа 38 фигури, 14 таблици и 113 цитирани литературни източника.

В уводната част е разгледан обектът на дисертационния труд, свързан с кристализация на нуклеотидни олигомери, както и тяхната съкристализация с флуорисцентни лиганди, които имат потенциал за свързване с ДНК. Представен е основният метод за изучаване на структурата на ДНК-лигандното взаимодействие - рентгеноструктурен анализ.

### 2.1. Актуалност на разработвания дисертационен труд.

Актуалността на темата се обуславя от факта, че в България досега не е извършван рентгеноструктурен анализ на биологични макромолекули, включително ДНК и протеини. **Би било удачно още тук да се отбележи, че подобен тип изследвания са с голям приоритет относно различни механизми за регулация на генната активност, посредством лекарствени препарати, напр. при онкозаболявания, както и за**

**проверка на тези средства за токсична активност на ниво ДНК и РНК взаимодействие.**

#### 2.1. Цели и задачи на дисертационния труд.

Целта на дисертационния труд е ясно формулирана. Тук, според мен, е неправилно използван изразът „олигонуклеотидна секвенция“, като по-коректно е използването на термини за биологични макромолекули – олигомер, полимер, олигонуклеотиди и т.н.

Логично следват и поставените задачи, кратко и ясно формулирани, отразяващи коректно методологията за подобен тип изследване.

#### 2.2. Литературен обзор.

Разделът „Литературен обзор“ е отразен на 27 стр. Последователно в него са разгледани познанията относно структурата и конформацията на ДНК молекулите. Представени са базите данни (PDB) за биологични макромолекули и изследванията върху ДНК структури, депозирани в тази база данни. Подробно са описани различните физико-химични методи при изследване на ДНК структури като флуоресцентна спектроскопия, кристализация и рентгеноструктурен анализ на монокристали, кръгов дихроизъм и др. От представения литературен обзор се вижда добрата осведоменост на докторантката и свободното ѝ боравене с различните използвани методологии. **Единствената ми забележка към този раздел е свързана с липсата на информация защо подобен тип изследвания са**

актуални и се използват в практиката ( в медицината, фармакологията и др.)

### 2.3. Материали и методи.

Разделът „Материали и методи“ е развит на 14 стр. Използваните материали и методи са удачно подбрани, добре структурирани и показват научната осведоменост на Христина Димитрова. Селектирани са шест олигонуклеотида, които са различни вариации на базово изучавания т.нар. „Дикерсонов додекамер“ (ДДД). ДДД е слабо проучен, като са известни само шест структури в PDB базата данни, три от които са получени от докторантката (5JU4, 5NT5 и 5T4W). За съкристализация на получените ДНК монокристали са използвани общо осем флуоресцентни лиганда. Четири от тях са новосинтезирани молекули от България в ИОХЦФ – БАН и са с неизследвана биологична значимост.

### 2.4. Резултати и Дискусия.

Този раздел е подробно описан и обхваща 24 стр. Разделът е написан в научно издържан стил и показва висока ерудираност и самостоятелност при изработването, анализа и интерпретацията на получените резултати. Тематиката на подобен тип изследвания като кристализация на сложни биологични макромолекули и последващ рентгеноструктурен анализ е един от най-сложните и дори все още се приема за „state of the art“ тип научно



изследване. Особено важно е да се отбележи, че за разлика от протеиновите макромолекули, нуклеиновите киселини са като правило изключение за успешно кристализиране и разшифроване, поради линейната структура на макромолекулата. От тази гледна точка, получаването на три ДНК структури (5JU4, 5NT5 и 5T4W) е наистина огромен успех, свързан от една страна с усилена работа при различни кристализационни условия, а от друга, естествено и не без наличието на малко късмет. Успехът не на последно място се дължи и на добрата лабораторна колаборация с научния ръководител и колегите. Това също е показател за съвременен подход при лабораторната работа.

Като абсолютен успех е успешното съкристализиране на 4'-6-диамидин-2-фенил индол (DAPI), свързан с B-ДНК олигонуклеотида d(CGTGAATTCACG) и последваща разшифровка, при която се наблюдава интеркалирана молекулата на DAPI между двете нуклеотидни вериги, и дестабилизира конформацията на малката бразда. Този резултат е показателен за перспективата за изследване на такъв тип ДНК-лиганд взаимодействие и установяване биологичната значимост на лиганди, използвани като потенциални химиотерапевтици. С по-малка значимост, но и не с по-малко научно значение са и получените структури с лиганди като  $Mg^{2+}$ ,  $Na^{+}$  и кокадилатен анион, и установените конформационни промени в двуверижната ДНК структура.

Като забележка към този раздел бих препоръчал обособяването на „Резултати“ и „Дискусия“ в отделни раздели. Това би допринесло за по-отчетливо изпъкване на получените резултати. Друга препоръка е свързана с липсата на дискуссионна част с получени резултати от други изследователски колективи. Ако такива не са намерени в достъпната литература, е добре те да бъдат коментирани като липса на подобни резултати.

#### 2.5. Изводи и Научни приноси на дисертационния труд.

Изводите и приносите коректно отразяват резултатите от поставените задачи. Четирите приноса са с установените нови PDB структури. Те наистина заслужават висока оценка и дори препоръката да са по-отчетливо показани и без излишна скромност.

#### 2.7. Публикации, свързани с темата на дисертацията.

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 2 научни издания, като и двете са в списание с импакт-фактор и 1 е в сборник от международна конференция също с импакт фактор. На две от статиите докторантът е първи автор. Тази публикационна дейност е напълно достатъчна и покрива изискванията на Закона за развитие на академичния състав, и в голяма степен отразява получените резултати.

Резултатите са представени и на 3 национални научни форума с международно участие. На една от публикациите вече има забелязан цитат.

2.8. Авторефератът е добре оформен и отговаря напълно на изискванията за обем и съдържание. Включва основните резултати на изследването, научните приноси и публикационна активност на дисертационния труд.

#### 2.9. Заключение.

Познавам Христина Сбиркова - Димитрова от началото на нейната редовна докторантура – 2012 г. През тази година тя започна своята лабораторна работа и дори специализира различни молекулярни методи и техники при изследване на протеини и ДНК в моята лаборатория. Още в самото начало, тя показва самостоятелност, желание за усвояване на нови методи и техники. Не на последно място, тя показва колаборативност и комуникативност. В резултат на тези първоначални изследвания бяха получени резултати, които са отразени в няколко публикации, но не са включени в дисертационния труд, поради специфичността на тематиката. През следващите години, в резултат на успешно приет проект към ФНИ, свързан с настоящата тема на дисертацията, съм имал възможност да наблюдавам нейното научно развитие, макар и косвено. Поради тази причина за мен беше удоволствие да рецензирам този наистина стойностен научен труд.

Предоставеният ми за рецензия дисертационен труд представлява подробно изследване на ДНК олигомерни структури, както и съкристилизирането им с различни флуоресцентни лиганди. Постигнатите резултати са публикувани в достатъчно на брой научни издания и е забелязан 1 цитат. Направените забележки и препоръки не намаляват стойността на дисертационния труд. **Ето защо, напълно убедено препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури и Научния съвет на Института по минералогия и кристалография – БАН да присъдят образователната и научна степен „доктор” по научно направление 4.4 „Науки за земята”, научна специалност „Минералогия и кристалография” на ас. Христина Илиева Димитрова.**

08.05.2018 г.

Изготвил рецензията: .....

/доц. д-р Петър Христов/