

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на Христина Илиева Сбиркова, представен за присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР“

тема на дисертационния труд: ” Кристализация и структурен анализ на две палиндромни ДНК секвенции с флуоресцентни маркери”

научен ръководител: проф. д-р Борис Шивачев

рецензент: проф. д-р Росица Николова

Дисертационният труд на асистент Христина Сбиркова е първата за Институт по минералогия и кристалография разработка в областта на структурната биология и включва кристализация на ДНК секвенции и определяне на кристалната им структура, чрез монокристален рентгеноструктурен анализ. За България това е първи и за радост успешен опит да се използва наличната в страната апаратура за изследване на кристалните структури на големи молекули. Реализирането на изследванията по темата на дисертацията е и първата крачка в осъществяване на мечтата на научния ръководител на докторантката, да създаде в ИМК група от учени, експерти в решаването на кристалните структури на големи молекули.

За да се прецени значението на изследванията, свързани с кристализацията и структурния анализ на ДНК секвенции ще отбележа няколко факта. За първи път експериментално, използвайки рентгеново лъчение, е определено подреждането на атомите в кристално вещество през 1914г. Решена е кристалната структура на натриев хлорид и от тогава до днес са определени кристалните структури на над 700 000 неорганични вещества и малки органични молекули. За да се разработят рентгеноструктурни методи подходящи за решаване на кристалните структури на големи органични молекули е било необходимо по-дълго време и първата подобна кристална структура е решена едва през 1973г. Решаването на кристалните структури на големи молекули е предизвикателство поради редица особености, свързани от една страна със специфичност на условията за получаване на монокристали, а от друга с особеностите при решаване на т.н. „фазов проблем“ на рентгеноструктурния анализ. Основно поради тези две причини в кристалографските бази

данни има само 1055 записа за решени кристални структури на ДНК секвенции, като по-малко от 900 от тях са уникални. В същото време познаването на структурата на ДНК е в основата на нашето разбиране за биохимичните процеси в организма, причината за различни заболявания и начинът на действие на лекарствените препарати. Ето защо методите за кристализация и определяне на кристалните структури на големи молекули са важна част от научните разработки на учените по света. В България подобни изследвания са малко и то само като част от сътрудничества с чуждестранни научни колективи. В този смисъл **темата на дисертацията** на Христина Сбиркова е много актуална, особено за нашата страна, още по-вече, че данните за структурата на получените съкрисали на флуоресцентни лиганди с ДНК образци, са единствената изцяло българска разработка, използвайки уникалната апаратура, налична в Институт по минералогия и кристалография-БАН.

Целта на дисертационния труд е изучаване на кристалната структура на съкрисализационни форми на палиндромни ДНК олигонуклеотидни секвенции с флуоресцентни маркери, като за нейното осъществяване са формулирани седем задачи, включващи подбор на подходящи секвенции, проверка на взаимодействието на ДНК с флуоресцентен лиганд, кристализация и получаване на подходящи монокристални образци, рентгеноструктурен анализ и определяне на кристалните структури.

Дисертационният труд е в обем от 118 *страници*, от които 70 страници основен текст и 40 страници приложения, в които са представени част от структурните параметри за дискутираните кристални структури, данните от структурния анализ и валидиращите доклади, гарантиращи достоверността на получените резултати. Текстът е много добре илюстриран с 38 *фигури* и включва 14 *таблици*. Приложен е списък с използваната и цитирана научна литература, наброяваща 113 източника, както и списък с публикациите на докторантката по темата на дисертацията, състоящ се от 2 статии в специализирани международни списания и един доклад, представен на международна конференция и публикуван в списание Acta Crystallographica A. Добро впечатление прави и въведения в началото списък с използваните съкращения. Дисертацията е с качествено техническо съдържание, оформена е много естетично и е интересна за четене. Съдържанието на дисертационни труд е коректно изложено и в представения ми автореферат.

Основният текст на дисертацията е обособен в три части – Литературен обзор, Материали и методи и Резултати и дискусия. Допълнително са представени изводите от направените изследвания и научните приноси на дисертационния труд.

Литературният обзор включва обобщение и анализ на няколко различни типа информация. Направено е описание на ДНК, като молекула съставена от две полинуклеотидни вериги. Описани са видовете взаимодействия между веригите водородни и π ... π взаимодействия и тяхното значение за силата на свързване и устойчивостта на ДНК молекулата. Посочени са основните характеристики на избраната за целта на дисертационния труд ДНК секвенция и са посочени известните в структурните бази данни (Protein Data Base) структури, включващи тази секвенция. Направен е анализ на постигнатите досега резултати, което показва, че докторантката е осмислила добре целите и задачите на дисертационния труд, както и значението на получените от нея резултати за допълване на знанията по тематиката. Като част от литературния обзор са представени и основните характеристики на методите, които по принцип се използват за кристализация и анализ на ДНК молекулите. Това прави добро впечатление от гледна точка на прецизното и задълбочено познаване на начините на характеристика на обекта на дисертационния труд. За постигане на целите на дисертацията си, обаче докторантката е използвала само част от представените аналитични методи и за мен би било по-коректно, ако използваните от докторантката методи бяха представени във втора глава Материали и методи, а не заедно с тези, които са посочени само като част от литературния обзор.

Втората част **Материали и методи** представлява подробно изложение на изпълнението на първите четири от поставените задачи. Обоснован е изборът на ДНК секвенции и използваните за съкристализация лиганди. Представени са използваните методи за кристализация на изследваните материали и много подробно са описани методите на рентгеноструктурния анализ за решаване на кристалните структури на големи молекули. Личните ми наблюдения, като ръководител на лабораторията по рентгеноструктурен анализ е, че Христина Сбиркова е овладяла на много добро ниво описаните методи. Доказателство за това са и оценките за оптимално решение и уточняване на кристалните структури, видими от валидиращите доклади, приложени като допълнение към основния текст на дисертацията. Валидиращите доклади, се издават от Protein DataBase след

двуетапна проверка на данните и параметрите, получени от рентгеноструктурния анализ. Показателно е, че и трите решени от докторантката кристални структури са вече включени в споменатата база данни и могат да се ползват от световната научна общност.

В частта **Резултати и дискусия** са представени резултатите от направените изследвания за взаимодействието на избраните ДНК секвенции и лиганди, описани са кристалохимичните особености на трите, определени от докторантката за първи път кристални структури. Дискутирани са и негативните резултати, свързани с неуспешна съкристализация или неуспешни опити за решаване на кристалните структури на част от получените монокристални образци и във връзка с това докторантката е представила своята визия за продължаване на изследванията. Представянето на резултатите е коректно, използвани са подходящи фигури, а част от информацията е систематизирана в табличен вид, което улеснява проследяването на дискусията.

Направените **изводи** са логично изведени въз основа на получените от изследването резултати, но според мен биха могли да се систематизират в три или четири точки, свързани с *успешна кристализация* и получаване на монокристали, *успешно решаване* на кристални структури, *овладяване на методи* за кристализация и структурен анализ и т.н. И четирите, посочени от докторантката **научни приноси** са свързани с решаването на кристалните структури на новополучените кристали и съкристали, но по подразбиране съществен е и приносът ѝ за получаване на монокристални образци, подходящи за провеждане на рентгено-дифракционен експеримент. Христина е „пропуснала“ да опише стотиците направени опити за получаване на монокристали и десетките опити за подготовка на монокристалния образец за измерване. Тези усилия заслужават да бъдат оценени, най-малко заради факта, че в литературата все още няма еднозначни рецепти за кристализация на ДНК молекули и всяко ново знание ще е полезно за бъдещо систематизиране на подобно познание.

Представеният труд е изработен на добро научно ниво и се налага извода, че е лично дело на докторантката. Много добро впечатление ми направи опита на Христина Сбиркова да формулира нови дефиниции за иначе широко използвани термини. Например, „кристал от ДНК е подреден триизмерен набор от молекули, поддържани заедно посредством

нековалентни взаимодействия“. В изследването е използван подходящ методологичен комплекс. Докторантката убедително интерпретира резултатите, стигайки до научни изводи, част от които се съобщават за първи път. Работата е подготвена като много добър печатен продукт и за всеки би представлявало истинско удоволствие да я прочете. Основна част от резултатите са представени на три международни събития (две специализирани училища и една конференция) и са публикувани в списания с импакт фактор Bulgarian Chemical Comm., Acta Crystallographica F и Acta Crystallographica A.

Отново искам да подчертая, много добрата теоретична и практическа подготовка на докторантката по отношение на използваните методи и по-конкретно усвояването на методите за решаване на кристални структури на големи молекули. Не са много хората в България работещи в областта на структурната кристалография и уменията на Христина Сбиркова за уточняване на кристални структури без съмнение могат да се използват от много наши колеги, работещи в областта на структурната биология.

По мое мнение обемът на проведените експерименти и получените резултати покриват изискванията за придобиване на научната и образователна степен „доктор“ и затова давам положителна оценка на дисертационния труд за присъждане на образователната и научната степен **“доктор”** на **Христина Сбиркова**.

Към дисертантката имам следните въпроси:

1. Какво означава „изоморфна модификация на ДНК секвенция“ и има ли други типове, освен „изоморфните“ модификации.
2. Може ли да се търси аналогия и до каква степен между кристалните структури на различните модификации на една и съща ДНК секвенция.

Рецензент:

Проф. д-р **Росица Уетрова** Николова