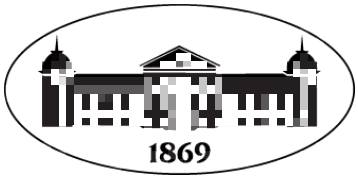


БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО МОЛЕКУЛЯРНА БИОЛОГИЯ
„АКАД. РУМЕН ЦАНЕВ“

Лаборатория по геномна стабилност

Теодора Красимирова Дянкова-Дановска

КИНЕТИКА НА НАТРУПВАНЕ И ПРЕМАХВАНЕ НА БЕЛТЪЦИ ОТ РЕПЛИКАЦИОННАТА ВИЛКА ПРИ НЕЙНОТО СПИРАНЕ И РЕСТАРТ

АВТОРЕФЕРАТ

За получаване на образователна и научна степен

„Доктор“

по научна специалност **„Молекулярна биология“**

шифър 01.06.04

Научен ръководител

доц. д-р Стойно Стойнов

СОФИЯ, 2024

Дисертацията обхваща 107 страници, съдържа 41 фигури и 2 таблици. Библиографската справка включва 234 заглавия на латиница.

Дисертационният труд е представен и обсъден на разширен семинар на лабораторията по геномна стабилност при Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ - БАН, на 19.07.2024 г.

Използвани съкращения:

53BP1 – p53-binding protein 1

ATM - Ataxia telangiectasia mutated

ATR - ATM-related

ATAD5 - ATPase Family, AAA Domain Containing 5

ATP - Аденозин трифосфат

BAC - Bacterial Artificial Chromosome

Cdc - Cell division cycle protein

CMG комплекс - Cdc45-MCM-GINS комплекс

dNTPs - Дезоксирибонуклеозид трифосфати

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DPCs - DNAprotein cross-links

dsDNA - Двойноверижна ДНК

DSB - Двойноверижно скъсване на ДНК

EGFP - Enhanced green fluorescent protein

FRAP - Fluorescence recovery after photobleaching

HR - Homologous recombination

HU - Хидроксиурея

ICLs - Inter-strand cross-links

IR - Йонизираща радиация

LAP - Localization and affinity purification

MCM - Minichromosome maintenance

MRE11 - Meiotic recombination 11

MRN комплекс - Mre11-Rad50-Nbs1 комплекс

PAR - Poly(ADP-ribose)

PARP - Poly(ADP-ribose) polymerase

PAXIP - PAX Interacting Protein

Pol α/δ/ε/ζ - ДНК полимераза α/δ/ε/ζ

POLD2 - DNA Polymerase Delta 2, Accessory Subunit

PCNA - Proliferating cell nuclear antigen

RFC - Replication factor C

ROI - Регион на интерес

RPA - Replication protein A

RNF8 - Ring Finger Protein 8

SDS-PAGE - Полиакриамидна гел електрофореза в денатуриращи условия

SSA - Single-strand annealing

ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина

TLS - Транслезионна синтеза

UV - Ултравиолетови лъчи

Съдържание

1. Въведение 6
2. Цел и задачи 9
   2.1. Цел 9
   2.2. Задачи 9
3. Материали и методи 10
   3.1. Материали 10
      3.1.1. Клетъчни линии 10
      3.1.2. Използвани антитела 11
      3.1.3. Използвани химикали и хранителни среди 11
      3.1.4. Използвани компютърни програми и библиотеки 12
   3.2. Методи 12
      3.2.1. Клетъчно култивиране и третиране 12
      3.2.2. Time-lapse експерименти в присъствие и отсъствие на различни инхибитори 12
      3.2.3. Анализ на микроскопски изображения от Time-lapse експериментите в присъствие на инхибитори 12
      3.2.4. Експерименти с микрооблъчване на живи клетки 12
      3.2.5. Обработка на експериментите с микрооблъчване на живи клетки 12
      3.2.6. Имуноблотен анализ (Western blot) 12
4. Резултати 13
   4.1. CellTool - компютърна платформа за обработка на микроскопски изображения и математическо моделиране 13
   4.2. Измерване на кинетиките на натрупване и премахване на PCNA и RPA при спиране и рестарт на вилката с HU в присъствие и отсъствие на различни инхибитори 14
      4.2.1. Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA при спиране и рестарт на репликационната вилка 14
      4.2.2. Инхибирането на ATR значително увеличава количеството и скоростта на натрупване на RPA при спрени репликационни вилки. 21
      4.2.3. Инхибирането само на ATM не оказва ефект върху динамиката и количествата на PCNA и RPA по време на спиране и рестартиране на репликационните вилки. 26
      4.2.4. Съвместното инхибиране на ATM и ATR кумулативно предотвратява премахването на RPA по време на рестартиране на репликационните вилки. 28
      4.2.5. MRE11 зависимата резекция не повлиява динамиката на RPA при спиране и рестарт на вилката 30
      4.2.6. Инхибирането на PARP1/2 забавя натрупването на RPA в условия на нуклеотиден глад индуциран посредством HU в отсъствието на ATR активност. 31
   4.3. Верификация на резултатите за RPA и PCNA при спиране и рестарт на репликационната вилка 37

4.4. PCNA и POLD2 в присъствие и отсъствие на ATR инхибитор 48
4.5. PAXIP - резултати от експерименти с микрооблъчване 48
4.6. Резултати от имуноблот анализ (western blot) на RPA и PCNA 52
5. Дискусия 53
6. Изводи 60
7. Приноси на дисертационния труд 60
8. Използвана литература 61
Публикации по темата на дисертацията 65
Други публикации 65
Участия в конференции 66

1. Въведение

ДНК репликацията при бозайници е комплексен процес, който изисква координирано пространствено-времево стохастично стартиране на десетки хиляди репликационните начала (Fragkos et al., 2015). Прогресиращите по генома репликационни вилки неизбежно се сблъскват с множество препятствия включително ДНК увреждания (напр. едноверижни скъсвания в ДНК, увреждания индуцирани от UV радиация, вътре верижни крос-линкове (ICLs) и ДНК-белтъчни крос-линкове (DPCs)), самата транскрипционната машина или трудни за реплициране региони (Zeman and Cimprich, 2014). Освен тези „физически“ бариери, онкогенни стимуланти и изчерпване на нуклеотидите могат да попречат на прогреса на репликационната вилка (Kotsantis et al., 2018). Всичко посочено до тук може да бъде източник на репликационен стрес, състояние при което нормалната прогресия на вилките и стартирането на началата на репликация са нарушени. Това води до понижена точност на репликацията и скъсвания в ДНК (Técher et al., 2017). Въпреки че съществуват множество механизми, които да осъществяват отговора на повреди в ДНК и да разрешат или да толерират пречките за прогреса на репликацията, все пак вилките могат да се разпаднат и да се стигне до критичен брой двойноверижни скъсвания (DSBs), което да доведе до клетъчна смърт. Повишената митогенна сигнализация и дефектите в поправката на ДНК, които често се наблюдават при туморни клетки, индуцират постоянно състояние на търпимост на репликационния стрес, което се смята за основна причина за геномната нестабилност и туморната еволюция (Gaillard et al., 2015). Прехвърлянето на туморните клетки отвъд тези нива на търпимост на репликационния стрес се утвърждава като терапевтична стратегия за борба с ракови заболявания (da Costa et al., 2023).

За да могат ефективно да се справят с репликационния стрес, в процеса на еволюцията еукариотните клетки са изградили сложна мрежа от фактори. Този отговор срещу репликационния стрес се дирижира от ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related) серин/треонин киназата, която се активира от генерирането на едноверижни участъци (ssDNA), получени в резултат от множество стрес-асоциирани събития (Saldivar et al., 2017). Чрез фосфорилирането на редица субстрати, сред които реплизомни компоненти, фактори на ДНК поправката и контролно-пропускателните пунктове, ATR регулира стартирането на началата на репликация, стабилността на репликационната вилка и прогресията на клетъчния цикъл. Важността на ATR отговора срещу репликационен стрес е подчертана от ембрионалната леталност в условия на дефицит на ATR (Brown

and Baltimore, 2000; de Klein et al., 2000) както и тежкото заболяване синдром на Секел, причинено от хипоморфизъм на ATR (O'Driscoll et al., 2003).

Нарушенията в онкогенната активация могат да доведат до изчерпване на клетъчния резерв от нуклеотиди, повишен репликационен стрес и геномна нестабилност (Bester et al., 2011). Изчерпването на нуклеотидния резерв от страна на рибуниклеотидния редуктазен инхибитор хидроксиурея (HU), води до генерирането на ssDNA, която активира ATR отговора срещу репликационен стрес. Освен това е наблюдавано посредством електронна микроскопия, че средно високи нива на HU водят до процес наречен *fork reversal* (~20% от вилките) и образуването на пост репликативни едноверижни празнини в ДНК (~30% от вилките) (Sogo et al., 2002; Zellweger et al., 2015). Изчерпване на нуклеотидния резерв в комбинация с инхибирането на ATR води до *uncoupling* на развиването и синтезата на ДНК (Byun et al., 2005; Nedelcheva-Veleva et al., 2006; Nedelcheva et al., 2005) което резултира в бързо изчерпване на резерва на RPA в клетката (Toledo et al., 2013).

Анализи на ДНК влакна (DNA fiber analyses) разкриват повишен брой фактори намесени в процесите на *fork reversal,* деградацията и рестарта на вилките, като изпъкват ролите на BRCA1 и BRCA2 срещу нуклеотидната деградация на репликационни вилки спрени с HU (Mijic et al., 2017; Ray Chaudhuri et al., 2016; Schlacher et al., 2011), в добавка към ролята на PARP1 в регулацията на рестарта на вилките (Berti et al., 2013; Bryant et al., 2009). Протеомът на стресираните с HU вилки е характеризиран посредством iPOND в комбинация с масспектрометрия (Sirbu et al., 2013). Резултатите разкриват широк набор от белтъци участващи в стабилизирането на реплизомата и превенцията на разпада на вилките (Dungrawala et al., 2015). Съществуват и подобни резултати при репликационен стрес индуциран с камптотецин и афидиколин (Nakamura et al., 2021; Rivard et al., 2024). Създадени са голям брой базирани на секвенирането подходи с цел прецизното околичествяване на времето, скоростта и местата на колапс на репликационните вилки (Pavani et al., 2024; Tubbs et al., 2018; van den Berg et al., 2024). Но до ден днешен реплизомната динамика по време на целия процес на спиране на репликационната вилка, нейното обръщане и рестарт, не са проследявани на ниво единична клетка.

В настоящия дисертационен труд, в живи клетки е представен подход за изследването на динамиката на реплизомните компоненти в условия на репликационен

стрес и последващото възстановяване на вилките при времева резолюция от 30 секунди. Визуализирано беше премахването на клампата PCNA и натрупването на RPA при индуцирано с HU изчерпване на нуклеотидния резерв, като беше извършено прецизно измерване на кинетиките и на двата процеса. След което беше наблюдавано възстановяването на PCNA и премахването на RPA по време на рестарта на репликационните вилки в рамките на едни и същи репликационни фокуси. Влиянието на белтъците ATR, PARP1, ATM и MRE11 върху динамиката на вилките по време на тяхното спиране и рестарт също беше околичествено. Забележителното при представената методология е разкритието, че дисоциацията на PCNA се случва в период от 2 минути, докато натрупването на RPA е постепенно и се осъществява в рамките на повече от час. Докато при възстановяване на вилките натрупването на PCNA и дисоциацията на RPA се случват за минути. Инхибирането на ATR рязко увеличава както скоростта така и степента на натрупване на RPA, като в същото време не повлиява кинетиките нито на PCNA, нито на RPA при възстановяването на вилките. Интересно откритие е, че 20% от RPA, натрупан в следствие на индуцирания стрес, остава дори след възстановяването на вилките. Докато самостоятелното инхибиране на ATM не оказва влияние върху горе-описаните явления, комбинирането му с инхибитор на ATR увеличава тази част до 60%, което подсказва за защитна роля на ATM при възстановяването на вилките в условия на подтисната ATR сигнализация.

2. Цел и задачи

2.1. Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е да се изследват кинетиките на натрупване и премахване на ключови белтъци участващи в репликацията при спиране и рестарт на вилката.

2.2. Задачи

1. Изследване на кинетиката на натрупване и премахване на PCNA и RPA при спиране и рестарт на репликационната вилка в присъствие и отсъствие на ATM и ATR киназни инхибитори.
2. Изследване на кинетиката на натрупване и премахване на POLD2 при спиране и рестарт на репликационната вилка, както при активна и инактивирана ATR киназа.
3. Изследване на влиянието на инхибирането на MRE11 зависимата резекция върху динамиката на натрупване и премахване на PCNA и RPA при спиране и рестарт на репликационната вилка.
4. Изследване на влиянието на инхибирането на PARP1 зависимото парелиране върху кинетиката на натрупване и премахване на PCNA и RPA при спиране и рестарт на репликационната вилка.
5. Изследване на влиянието на инхибирането на ATM репликационния контролен пункт върху кинетиката на натрупване на PAXIP на местата на комплексни ДНК повреди.

3. Материали и методи

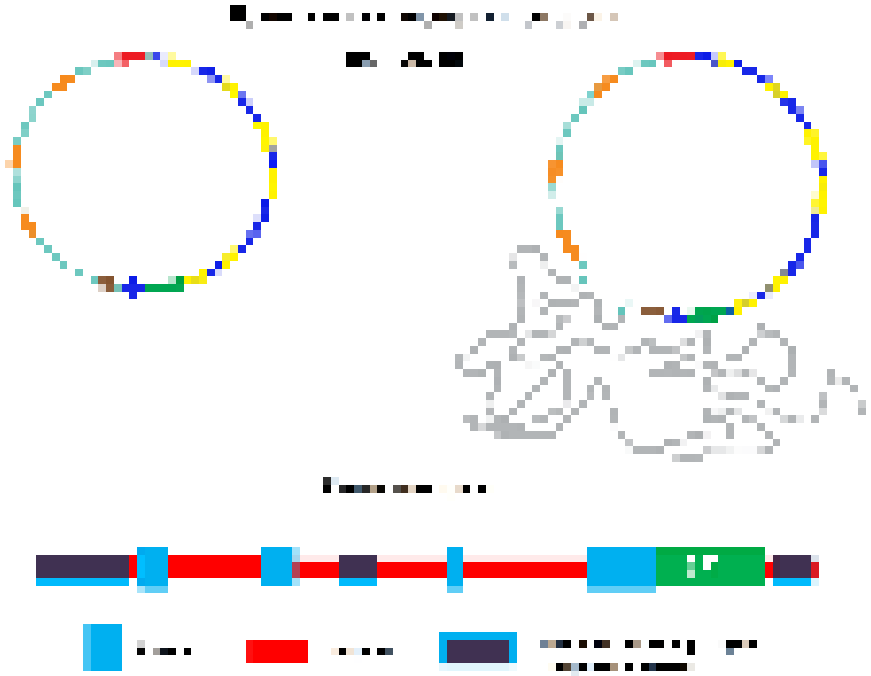
3.1. Материали

3.1.1. Клетъчни линии

За това изследване използвахме HeLa Kyoto клетъчни линии, получени чрез трансфекция с BAC (Bacterial Artificial Chromosome), които стабилно коекспресират интересуващите ни белтъците. Те се експресират под контрола на собствените им регулаторни елементи и промотори, благодарение на което тяхната концентрация в ядрото е близка до физиологичната. Бяха използвани BAC носещи гени за N- или C-крайно белязани белтъци от системите за поправка на ДНК (Фигура 1) (Poser et al., 2008a). Таговете, с които са белязани белтъците, са базирани на "*localization and affinity purification*" (LAP) тага, състоящ се от EGFP или mCherry и функционален линкерен участък. Изследвани бяха 3 двойни HeLa Kyoto клетъчни линии стабилно експресиращи белтъците RPA-EGFP, POLD2-EGFP, PAXIP-EGFP и PCNA-mCherry. Основен обект на интерес бяха промените в кинетиките на натрупване и дисоциация на съответните белязани от нас белтъци при спиране и рестарт на репликационната вилка под въздействието на хидроксиурея (HU) и репликационния контролен пункт с ATM и ATR инхибитори. Всички клетъчни линии стабилно коекспресират mCherry белязан миши PCNA като положителна контрола и EGFP-белязан белтък от репликационната вилка и двете под контрола на техните ендогенни регулаторни секвенции (Aleksandrov et al., 2018). Това подсигурява, че белтъците се експресират във физиологични нива и под контрола на клетъчния цикъл. В допълнение изучихме още една двойна PCNA клетъчна линия, която експресира и човешки и миши PCNA, за да потвърдим, че няма разлика между експресията на двете. За контрола бяха използвани PC3 и Du145 двойни клетъчни линии, експресиращи RPA-EGFP и PCNA-mCherry. Списък с използваните клетъчни линии е представен на Таблица 1.

Клетъчна линия	Източник
HeLa Kyoto RPA1-LAP/mPCNA-mCherry	Лаборатория по геномна стабилност
HeLa Kyoto POLD2-LAP/mPCNA-mCherry	Лаборатория по геномна стабилност
HeLa Kyoto PAXIP1-LAP/mPCNA-mCherry	Лаборатория по геномна стабилност
HeLa Kyoto hPCNA-LAP/mPCNA-mCherry	Лаборатория по геномна стабилност
PC3 RPA1-LAP/mPCNA-mCherry	Лаборатория по геномна стабилност
Du145 RPA1-LAP/mPCNA-mCherry	Лаборатория по геномна стабилност

Таблица 1: Списък с използвани клетъчни линии



Фигура 1: BAC конструкти използвани за създаването на клетъчни линии HeLa Kyoto, стабилно експресиращи на N- или C-крайно белязани белтъци, участващи в поправката на ДНК.

3.1.2. Използвани антитела

За контрол на качеството експресията на белязаните белтъци беше анализирана чрез western blot посредством анти-GFP антитяло на Roche (Hein et al., 2015)/ pc 10 sc-56 alpha PCNA AB and RPA70/RPA1 My Bio Sourse AB.

3.1.3. Използвани химикали и хранителни среди

Химикали или хранителни среди	Производител
Auxin	Sigma-Aldrich
Bovine serum albumin	Sigma-Aldrich
DMEM, high glucose	Thermo Fisher Scientific
Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher Scientific
FluoroBrite DMEM	Thermo Fisher Scientific
GlutaMAX™ Supplement	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific
Phosphate Buffer Saline	EMD Millipore
Ethanol	Sigma
Blasticidin	InvivoGen
Hydroxyurea	Sigma
AZD6738	Thermo Fisher Scientific
KU55933	Thermo Fisher Scientific
Mirin	Thermo Fisher Scientific
BMN673 (Talazoparib)	Selleckchem

3.1.4. Използвани компютърни програми и библиотеки

За обработка и измерване на получени в хода на експериментите микроскопски изображения беше използвана компютърната програма CellTool (Danovski et al., 2023). Тази програма беше създадена от нашия екип и е способна да анализира резултатите в настоящия дисертационен труд. За създаването ѝ бяха използвани следните библиотеки за .NetFramework 4.5 под формата на NuGet пакети (https://www.nuget.org/) : LibTiff.Net, Bio-Formats, ikvm, OpenTK, NCalc, Accord.Net, Math.NET, Numerics, Microsoft Solver Foundation. Програмата е написана на програмния език C#, като за целта беше използвано Microsoft Visual Studio IDE (https://visualstudio.microsoft.com/). За регистрация на изображенията беше използван ImageJ плъгина MultiStackReg (Thévenaz et al., 1998). Microsoft Office инструментите бяха използвани за анализ на резултатите и създаване на графики и фигури.

3.2. Методи

3.2.1. Клетъчно култивиране и третиране

3.2.2. Time-lapse експерименти в присъствие и отсъствие на различни инхибитори

3.2.3. Анализ на микроскопски изображения от Time-lapse експериментите в присъствие на инхибитори

3.2.4. Експерименти с микрооблъчване на живи клетки

3.2.5. Обработка на експериментите с микрооблъчване на живи клетки

3.2.6. Имуноблотен анализ (Western blot)

4. Резултати

4.1. CellTool - компютърна платформа за обработка на микроскопски изображения и математическо моделиране

Измерването на резултатите от нашите експерименти и в частност естествените фокуси в клетъчните ядра се оказа не лека задача. Клетките се движат, фокусите са многобройни и също се движат, трябва да се измерят в паралел двата цветни канала на едно изображение. Това е изключително трудно и времеемко с други програми. Възникна необходимост от специфичен протокол за измерването на такъв тип изображения. По това време в нашата лаборатория разработвахме CellTool, компютърна програма за анализ на микроскопски изображения. Тя комбинира всички нужни инструменти за измерването на кинетиките на белтъците участващи в процеса на ДНК поправка, получени от микроскопски експерименти. Тя има и редица други приложения включително анализ на FRAP експерименти. Наличието на удобен за работа графичен интерфейс осигуряващ бърз, лесен и точен анализ на изображенията значително скъсява времето за обработка на получените данни в хода на микроскопските експерименти (Фигура 2). Моето участие в развитието на програмата включва разработката на дизайна на графичния интерфейс. Направата на продукта по начин, по който той да е по-удобен за работа на крайния потребител. Имах значителен принос и по дизайна на протоколите за анализ на изображения, написването на документацията и тестването на CellTool. Също така и по дизайна на логото и много от функционалностите вътре в самата програма. Докато развивахме CellTool заедно със софтуерния инженер имплементирахме методология и нов протокол за измерването на такъв тип time-lapse експерименти с естествени фокуси, които са част от настоящия дисертационен труд. Методологията включва:

1. Измерване на цялата клетка, с помощта на проследяващ полигонален регион на интерес (Tracking ROI), който обхваща цялото клетъчно ядро, като преди това са приложени филтри и е извършена сегментация и регистрация на изображението
2. Измерване на фона в ядрото извън фокусите, с помощта на 3 статични региона на интерес (Static ROI) в местата с най-нисък интензитет в ядрото, но не попадащи в ядърце

3. Измерване на фона извън клетъчното ядро (Background ROI), необходим за елиминиране на фоновия шум

От получените данни успяхме да извлечем информация за движението на интересуващите ни белтъците към и от естествените фокуси в ядрото.

Фигура 2: Интерфейс на програмата за анализ на микроскопски изображения CellTool

CellTool е програма със свободен достъп и е наличен в платформата за споделяне на код GitHub: https://github.com/GDanovski/CellTool. Програмата може да бъде изтеглена и инсталирана от интернет страницата на CellTool: https://dnarepair.bas.bg/software/CellTool/. Подробна документация и протоколи за работа с продукта също могат да бъдат открити на горепосочения интернет адрес.

4.2. Измерване на кинетиките на натрупване и премахване на PCNA и RPA при спиране и рестарт на вилката с HU в присъствие и отсъствие на различни инхибитори

4.2.1. Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA при спиране и рестарт на репликационната вилка

За да изследваме какво се случва при спиране и рестарт на репликационната вилката, един от експериментите които извършихме е да проследим динамиката на натрупване и премахване на PCNA и RPA. PCNA представлява белтък участващ в състава на репликационната вилка, като една молекула участва в синтеза на водещата верига, а много молекули се свързват към фрагментите на Оказаки на изоставащата

верига (Kang et al., 2024). Той увеличава процесивността на полимеразата и служи като платформа за привличане на различни функционално разнообразни фактори на вилката. Количеството на PCNA на вилка в даден момент се определя от скоростта на неговото натрупване, което отразява скоростта на репликационната вилка, както и от скоростта на неговото премахване след завършване на синтеза на новата верига. RPA се свързва с едноверижната ДНК, генерирана на репликационната вилка, защитавайки я от деградация. Едноверижната ДНК се генерира, когато синтезата на ДНК на водещата или изоставащата верига е по-бавна от разсукването на ДНК (Chen and Wold, 2014; Fanning et al., 2006; Maréchal and Zou, 2015). Друг източник на едноверижна ДНК е резекцията от множество нуклеази по време на поправката на ДНК при репликационната вилка. Така количеството на RPA отразява количеството на едноверижната ДНК както по време на гладко протичаща репликация, така и по време на спиране и рестарт на репликационната вилка (Pasero and Vindigni, 2017). Следователно, количеството RPA отразява едноверижната ДНК генерирана по време на нормална репликация както и по време на сприране и рестарт на репликационната вилка.

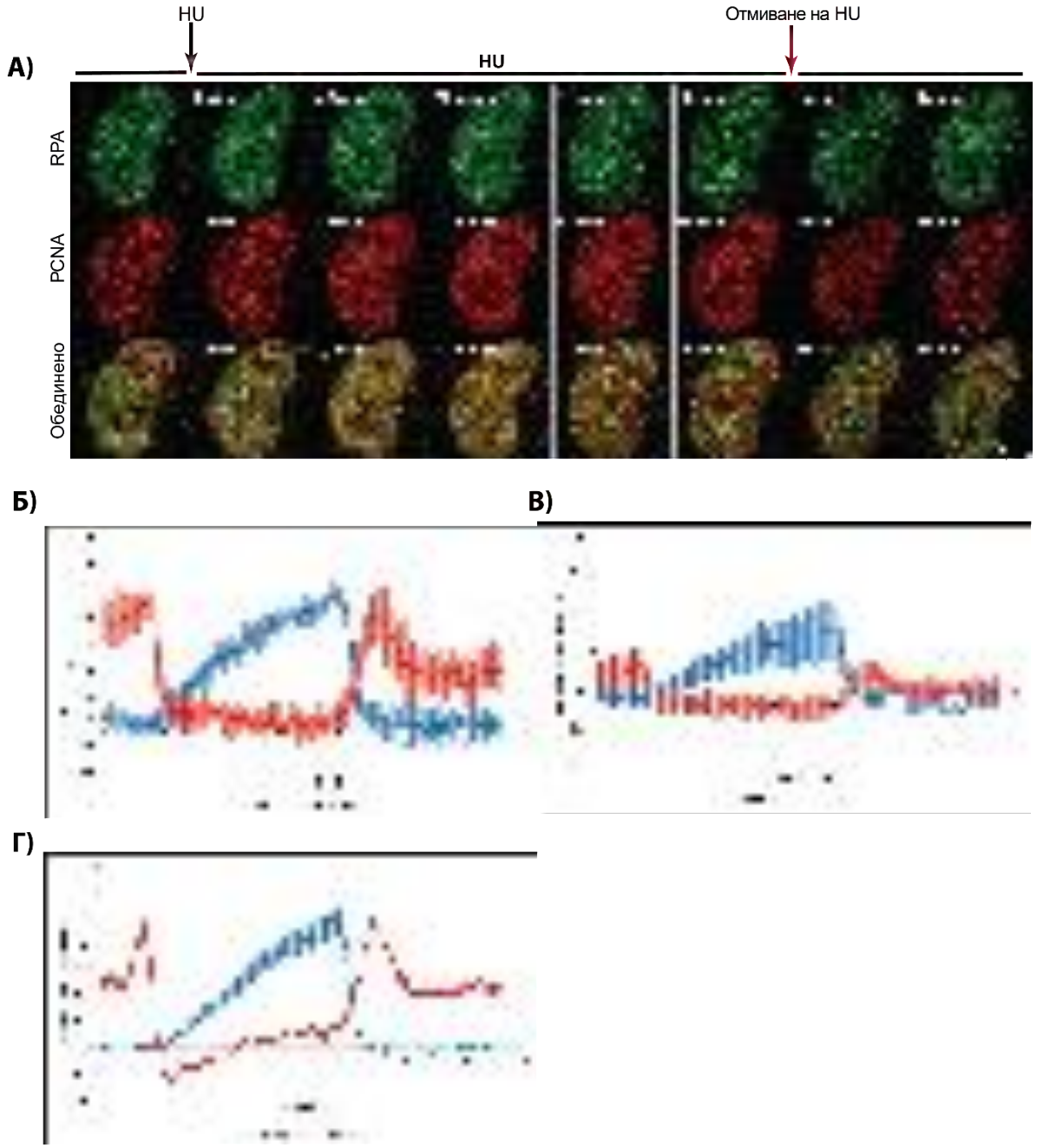
Извършена беше *time-lapse* микроскопия на живи клетки, като за целта беше използвана двойна клетъчна линия EGFP-маркиран RPA, с който да следим количеството на едноверижната ДНК, и mCherry маркиран PCNA (Poser et al., 2008b), който да ни показва местоположението на репликационните фокуси. Тази клетъчна линия беше създадена чрез рекомбиниране с бактериални изкуствени хромозоми (BAC) (Zhang et al., 1998), като при нея експресията на маркираните белтъци е сходна с ендогенни нива, което се дължи на това, че те са под контрола на собствените им регулаторни елементи (Hein et al., 2015). Извършена беше селекция на единични колонии с цел генериране на клетъчни линии с хомогенна експресия на двата белтъка в цялата популация клетки. Чрез имуноблот беше измерено, че нивата на RPA-EGFP са 1:3 спрямо ендогенните нива на RPA, докато нивата на mPCNA-mCherry са приблизително 1:4.2 спрямо ендогенните нива на PCNA (Фигура 31). Беше използвана *spinning-disk* и *airyscan* конфокална микроскопия. Докато отделните репликационни фокуси на PCNA бяха ясно видими и в двете изображения, *airyscan* микроскопията позволи значително по-голяма пространствена резолюция. Въпреки това, *time-lapse* изображенията с висока времева резолюция на *airyscan* предизвикаха значително фотоизбелване. Затова беше избрана *spinning-disk* микроскопия за извършване на необходимите експерименти.

Спирането на вилката беше осъществено чрез добавяне на хидроксиурея (HU), в следствие на което беше инхибирана синтезата на дезоксирибонуклеозид трифосфати (dNTPs), необходими за синтезата на ДНК, следователно репликационната вилка спира своя ход поради тяхното изчерпване. В хода на експеримента репликационната вилка беше рестартирана отново посредством отмиване на HU с предварително подготвена и затоплена клетъчна среда за култивиране. За да бъде изследвана динамиката на PCNA и RPA по време на спиране и рестарт на репликационната вилка, клетките бяха наблюдавани за 15 минути, след което беше добавена HU, последвано от наблюдение на клетките в продължение на 1 час. След това HU беше отмита, за да се стимулира рестарт на вилката, който беше проследен в продължение на още 55 минути. Липсата на нуклеотиди, предизвикана от HU, доведе до видимо бързо разпадане на фокусите на PCNA, последвано от постепенно натрупване на RPA1 в същите ядрени региони. Вариабилността на размера и формата на репликационните фокуси усложнява измерването на промените в интензитета им. Затова беше избран подход за измерване, при който се проследява изменението на интензитета на свободно дифузиращите PCNA/RPA1 в ядрени региони без видими фокуси. Разпадането на фокусите на PCNA след добавянето на HU доведе до значително увеличение на интензитета в тези места, което предполага, че премахнатият PCNA наистина става част от свободно дифузиращия пул. Следователно, проследяването на флуктуациите в свободно дифундиращия PCNA в тези региони ни позволи да измерим количеството на PCNA, което се премахва от вилките в рамките на репликационните фокуси. За да определим количествено тези промени, бяха избрани няколко региона на интерес в ядрото, където няма фокуси на PCNA преди третирането. След това бяха проследени промените в средния интензитет, предизвикани от HU, в тези региони. Накрая беше калкулирана средната стойност на тези промени в интензитета и беше разделен общия интензитет на клетъчното ядро на тази средна стойност. Като резултат беше получена фракцията на свободно дифундиращия и хроматин-свързания белтък, като хроматин-свързания беше получен като извадихме свободно дифундиращия от тоталното количество ядрен белтък. За да измерим кинетиката на премахването на PCNA, предизвикано от HU, нормализирахме количеството на PCNA, натрупано в репликационните фокуси, като неговата стойност преди третирането с HU беше взета за максимум (=1). Беше използван същия подход за измерването на средния интензитет на RPA-EGFP в същите региони на интерес, демонстрираме, че RPA следва модел, при който намаляването на свободно

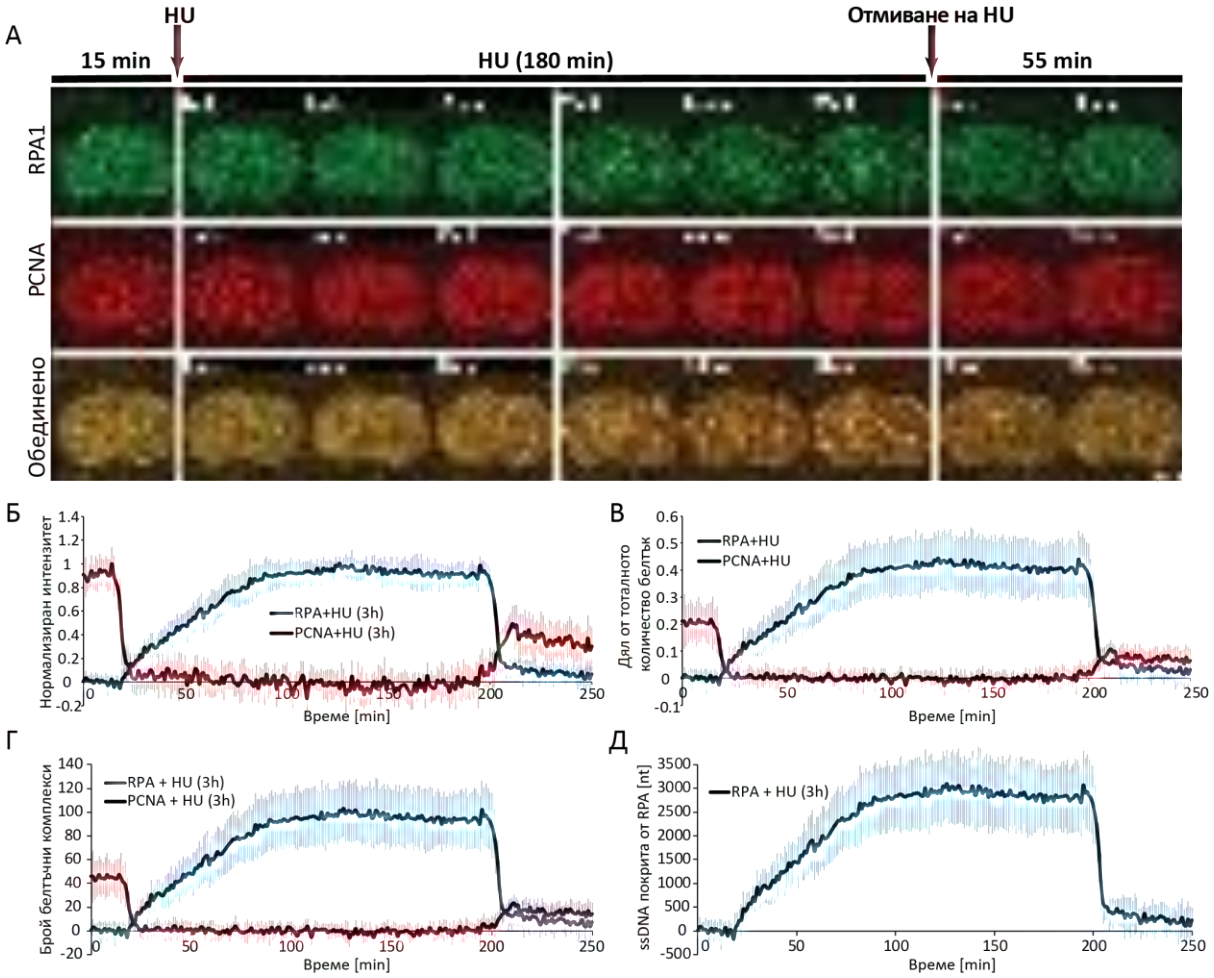
дифузиращия белтък съответства на натрупването на свързан RPA в спрелите репликационни вилки.

При спиране на репликационната вилка с HU беше наблюдавано почти мигновено премахване на PCNA и по-бавно натрупване на RPA (Фигура 3). В рамките на 5 минути след добавянето на HU, фокусите на PCNA почти напълно се разпаднаха ($t_{1/2}$ = 2.06±0.85 минути). Възможна причина за това е липсата на новонатрупан PCNA заради спрялата репликация, а PCNA, който вече е изпълнил своята функция, се премахва. В най-големите фокуси все още можеше да се наблюдава остатъчен PCNA след пълното разтваряне на по-малките им аналози. Количественото измерване показа, че приблизително 30% от общия ядрен PCNA беше ангажиран в репликационни фокуси преди третирането с HU. С премахването на фокусите на PCNA беше наблюдавано по-бавно натрупване на RPA на местата на PCNA, т.е. на местата на спрялата репликационна вилка. Интересно е, че натрупването на RPA, предизвикано от HU, се случва с много по-бавен темп ($t_{1/2}$ = 23.9±2,1 минути), достигайки максимум след 1 час. В този пик, 30% от ядрения RPA беше ангажиран в репликационни фокуси. Следователно активацията на репликационния контролен пункт предотвратява по-нататъшното развиване на ДНК от хеликазите и съответно количеството на ssDNA е по-малко, за което свидетелства по-бавното натрупване на RPA. В условия на третиране с HU в продължение на 3 часа 40% от ядрения RPA се ангажира в репликационните фокуси, като достига плато след 90-тата минута. RPA започва бързо да се дисоциира от спрелите вилки 5 минути след отмиването на HU, като пълното премахване беше наблюдавано приблизително 12 минути след отмиването. Не се наблюдават RPA1 фокуси след рестартирането на вилките при 1-часовото третиране с HU (Фигура 3), но се наблюдава 4-5% от RPA1 във фокусите след промиването на HU при експеримент с 3 часово третиране с HU (Фигура 4). Това е индикация, че едноверижната ДНК, генерирана по време на 1 часовото лишаване от нуклеотиди може да бъде премахната лесно при рестарта на вилките при промиване на HU. Докато продължителното лишаване от нуклеотиди води до образуване на недореплицирани региони. Поради тази причина ние избрахме 1 часовото третиране с HU за нашите експерименти. След промиването на HU, PCNA започна отново да се натрупва в преди това разпадналите се репликационни фокуси, също достигайки пик в рамките на приблизително 15 минути ($t_{1/2}$ = 5.1±2 минути), до нива, сравними с тези преди третирането с HU. Нивата на PCNA започнаха да намаляват малко след това, отразявайки изхода от S-фазата. Нашите

измервания показват, че докато премахването на PCNA и натрупването на RPA са несвързани по време на спиране на вилката, повторното натрупване на PCNA и премахването на RPA се случват с подобни темпове по време на рестарта на вилката.



Фигура 3: Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация.(В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро. (Г) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA чрез използване на Sobel филтър.



Фигура 4: Динамика на PCNA и RPA1 по време на продължително спиране на репликационната вилка при изчерпване на нуклеотидите, предизвикано чрез третиране с HU. (А) Представителни изображения на RPA1-EGFP и mCherry-PCNA преди, по време и след 3-часово третиране с HU. Времевите точки на добавяне и промиване на HU са обозначени с червени стрелки. (Б) Интензитет на RPA1-EGFP/PCNA-mCherry, свързани в репликационни фокуси, нормализирана до максималната стойност (макс = 1). (В) Дял на RPA1-EGFP/mPCNA-mCherry, свързани в репликационни огнища, когато общият клетъчен пул на RPA1/PCNA е нормализиран до 1. (Г) Среден брой на RPA и PCNA комплекси, участващи в една репликационна вилка. (Д) Средна дължина на ssDNA (nt), покрита от RPA в една репликационна вилка. За всички четири панела, n = 11 клетки. Данните са представени като средна стойност ± SD.

Както вече беше дискутирано нашите резултати позволяват определянето на относителната фракция на даден белтък участващ при всички репликационни вилки в даден момент. Комбинирането на тези резултати с количествените протеомни данни налични за HeLa Kyoto клетъчната линия, използвана в нашето проучване (Hein et al., 2015), позволява определянето на количеството белтъчни молекули, участващо в реплизомите по време и след индуцирането на репликационен стрес. Протеома на HeLa Kyoto клетъчната линия съдържа приблизително 2.6 милиона молекули PCNA аранжирани в ~865300 хомотримера и 926424 молекули RPA1 и същия брой RPA хетеротримерни комплекси. Общия брой вилки активни в даден момент на репликацията наскоро беше детерминиран около 4000, с изключение на много ранните и късни етапи на S фаза (van den Berg et al., 2024). Като се раздели броя на белтъчните молекули,

участващи във всички вилки на общия брой вилки може да се определи приблизително колко молекули участват в една вилка. Така беше установено, че в една вилка участват приблизително 59±22.6 хомотримера PCNA преди добавянето на HU. За определянето на количеството на остатъчния PCNA след лишаване от нуклеотиди бяха избрани най-големите фокуси на PCNA като интензитета на сигнала им все още може да се измери въпреки намаляването му в HU. Измерванията ни демонстрират, че 17.6±6.7% от PCNA остава свързан в репликационна вилка след третиране с HU, което средно се равнява на 10.4±4.7 комплекса (срещу 59 комплекса преди HU). Високата времева резолюция ни позволява да определим скоростта, с която тези комплекси се дисоциират от вилките, което се равнява на 15±6.9 комплекса в минута. При промиване на HU, PCNA отново се натрупва до 30 комплекса на вилка. Това частично реакумулиране може да се отдаде на клетки, излизащи от S-фаза скоро след промиването на HU. Прилагайки същия подход за околичествяването на RPA1 установихме, че броя на RPA1 молекули при една вилка достига максимум от 80.7±27.7 по време на 1 часовото третиране с HU. Вземайки предвид, че RPA1 хетеротримера заема регион от приблизително 30нт., (Blackwell et al., 1996; Gomes et al., 1996; Kim et al., 1992) изчислихме тоталната дължина на едноверижната ДНК генерирана след третиране с HU, като най-голямата дължина е приблизително 2400 нуклеотида на вилка. Получаването на броя молекули, участващи във вилките при 30 секундни интервали позволи определянето на скоростите на генериране на едноверижна ДНК и натрупване на RPA1, а именно 40 нт. в мин. за едноверижната ДНК и 1.3 RPA1 молекули в мин. Промиването на HU резултира в скорост на премахване на RPA1 от 8.9 ±5.2, което е приблизително 9 пъти по-бързо от скоростта на неговото натрупване.

С цел да се определи дали използваното за индуциране на репликационен стрес 1-часово третиране с 10mM HU е имало ефект върху прогреса на клетъчния цикъл беше извършен експеримент, при който клетките са заснети след промиването на HU, на 10-минутни интервали за 24 часа (Фигура 5). Клетките успешно преминават две последователни митози без наличието на нестандартно натрупване на RPA във всеки един момент от клетъчния цикъл. Това показва, че клетките ефективно се възстановяват от индуцираното с HU забавяне на репликационните вилки и успешно преминават през множество деления без да пренасят непоправени повреди в ДНК. Нашите измервания разкриват, че въпреки активната ATR сигнализация, RPA продължава да се натрупва при забавените вилки макар и с много по-ниска скорост от тази на премахването на PCNA.

Докато повторното натрупване на PCNA и премахването на RPA се осъществяват с близки скорости при рестартиране на вилката, което е последвано от гладка прогресия чрез множество клетъчни цикли.

Фигура 5: Изображение на представителна клетка, експресираща RPA и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto, илюстриращо прогресията през различни фази от клетъчния цикъл след третиране с HU. Клетката е заснета на 10 минутни интервали за 24 часа след промиване на HU.

4.2.2. Инхибирането на ATR значително увеличава количеството и скоростта на натрупване на RPA при спрени репликационни вилки.

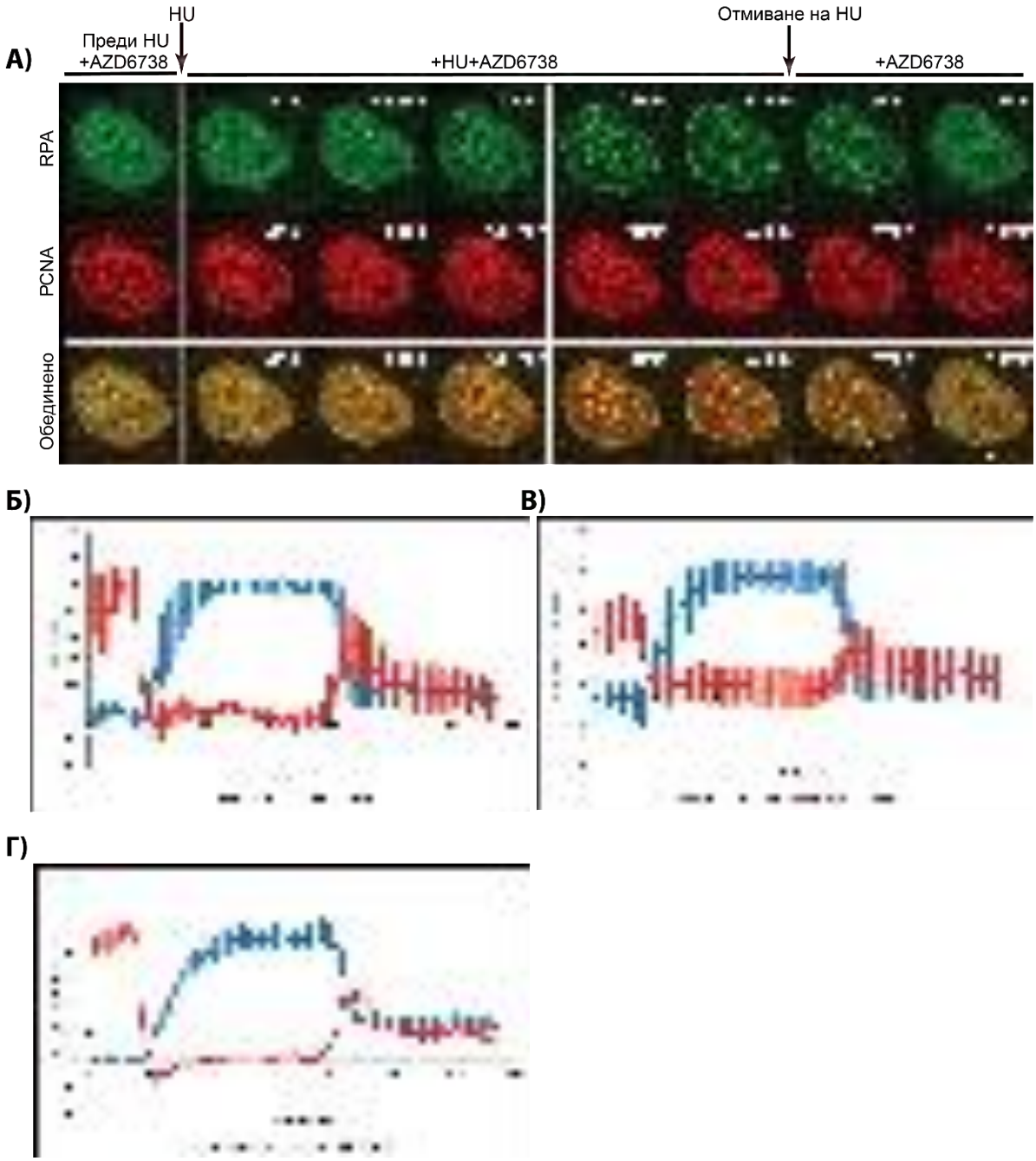
При условия на репликационен стрес, RPA покрива получената едноверижна ДНК (ssDNA) в репликационните вилки, което стимулира натрупването и активирането на ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related) киназата. Нейната функция е свързана със запазване, ремоделиране и рестартиране на вилките по време на репликационен стрес и се осъществява чрез фосфорилиране на компоненти на реплизомата и фактори на ДНК поправката, като същевременно потиска по-нататъшното стартиране на нови репликационни начала (Cortez et al., 2001; Saldivar et al., 2017; Zou and Elledge, 2003). ATR фосфорилира много от белтъците от репликационната вилка, което води до стабилизирането на вилката и предотвратява разгъването на ДНК (uncoupling) и/или резекцията, които резултират в едноверижна ДНК. ATR е отговорен и за активирането на ATR репликационния контролен пункт.

За да внесем яснота във функциите на ATR, беше проведен експеримент със спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU, в присъствието на AZD6738 (Vendetti et al., 2015) - инхибитор на ATR киназата (Фигура 6). Докато поведението на PCNA до голяма степен остава без сериозни разлики в сравнение с експеримента без инхибитора AZD6738, изразената разлика беше наблюдавана в натрупването на RPA след добавянето на HU. Отбелязано беше двукратно увеличение на нивата на RPA в репликационните фокуси, натрупващи се с 4

пъти по-бърз темп ($t_{1/2}$ = 5.6 минути) (Фигура 17А). Това е в съответствие с добре установената роля на ATR в ограничаването на разединяването на хеликазата и полимеразата и последващото изчерпване на RPA (Byun et al., 2005; Nedelcheva-Veleva et al., 2006; Nedelcheva et al., 2005; Toledo et al., 2013). Важно е, че натрупването на RPA достига плато приблизително 25 минути след третирането с HU, като около 70% от ядрения RPA беше включен в образуваните фокуси. Следователно, след този момент, RPA вече не може да покрива новосъздадената ssDNA, генерирана или чрез резекция, или чрез uncoupling. Без инхибитор на ATR, RPA1 при вилките достига плато на около 90-тата минута, като акумулира около 40% от ядрения пул. В този случай, не липсата на несвързан RPA1, а спирането на по-нататъшно генериране на едноверижна ДНК, би могло да е причината за наблюдаваното плато. Чрез гореспоменатите преобразувания беше изчислено, че общия брой RPA1 молекули на вилка се увеличава от 80 без ATR инхибитор до 150 в присъствие на инхибитор, като тези 150±15.3 молекули се свързват с приблизително 4000 нуцлеотида едноверижна ДНК. От където могат да се изведат скорости от 9.6±3.6 RPA1 молекули натрупващи се в минута и приблизително 290нт едноверижна ДНК генерирана в минута. По този начин инхибирането на ATR резултира в 9 пъти по-бързо, индуцирано от HU, натрупване на RPA1. Тоталното количество едноверижна ДНК генерирана при тези условия може много да надвиши тази цифра, тъй като RPA1 резерва се изчерпва, докато разсукването продължава.

След промиването на HU в условия на инхибиран ATR, повторното натрупване на PCNA и премахването на RPA се случват с подобен темп на този, наблюдаван без ATR инхибитор (Фигура 17А). Въпреки това, RPA не се премахва напълно по време на рестартирането на вилките, като 20% остава в репликационните фокуси. Това продължава да се наблюдава дори след повторното натрупване на PCNA. Средно 22±16 молекули RPA1 и 660нт едноверижна ДНК се задържат на вилка след рестарт.

Възможни обяснения включват генерирането на пост-репликативни едноверижни участъци или неуспех на рестартирането на вилките. След промиването, PCNA се натрупа отново до приблизително 60% от нивата преди третирането с HU, с по-бърз темп в сравнение с наблюдаваните резултати без ATR инхибитор ($t_{1/2}$ = 6 минути срещу 10 минути) (Фигура 17Б). По-бързият темп на повторно натрупване (т.е. рестартиране на вилките) съответства на ролята на ATR в потискането на нови репликационни начала.

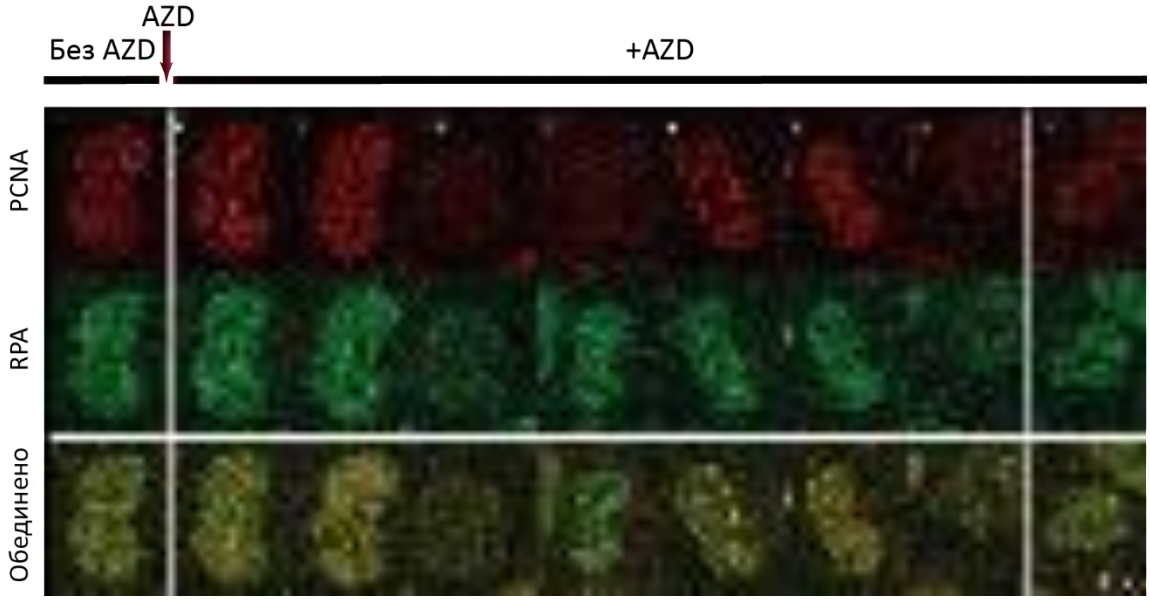


Фигура 6: Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU в присъствие на ATR инхибитора AZD6738. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро. (Г) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA чрез използване на Sobel филтър.

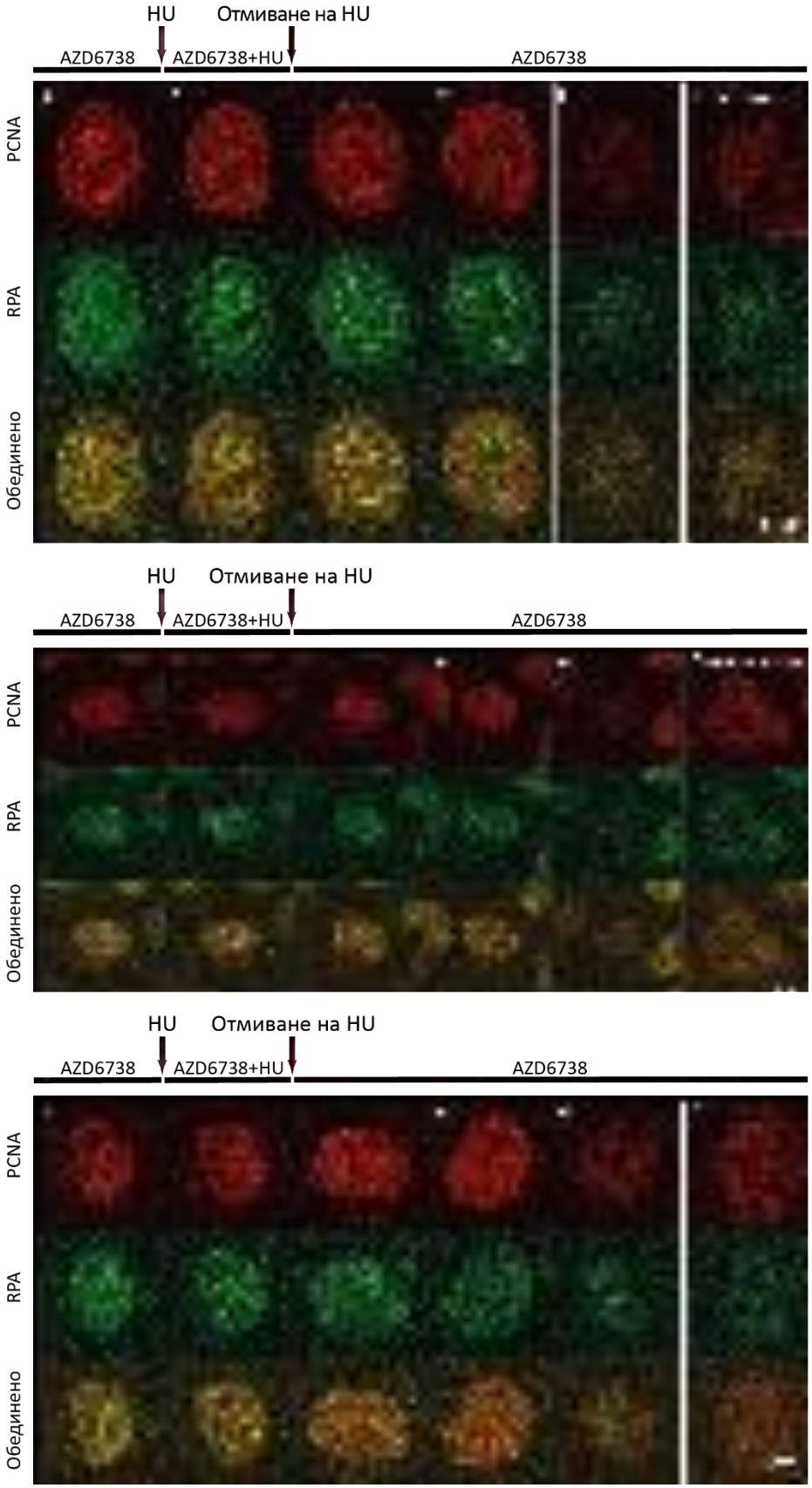
За да придобием по-задълбочена представа за съдбата на клетките след сериозен репликационен стрес в отсъствието на ATR активност, проследихме клетки подложени на третиране само с ATR инхибитор за 24 часа (Фигура 7), както и на комбинирано третиране с HU и ATR инхибитор (Фигура 8). Клетките третирани само с ATR инхибитор натрупаха RPA1 на местата на репликационните фокуси по време на S фаза,

което не се случи при нетретирани клетки, това подсказва натрупването на едноверижна ДНК. Въпреки това, натрупаното RPA1 се премахва в G2 и клетките преминават успешно през две митози в рамките на експеримента без натрупване на пост-репликативна едноверижна ДНК (Фигура 7). За разлика от този експеримент при инхибирането на ATR в комбинация с едночасово третиране с HU доведе до преминаването на едноверижната ДНК в лицето на RPA1 фокуси в G2 фаза. След което по-голямата част от клетките не успяват да излязат от митоза, като останалите навлизат в G1 със силно фрагментирани ядра (Фигура 8).

Нашите резултати демонстрират и околичествяват драстичното нарастване в скоростта на натрупване на RPA1 по време на спирането на репликационната вилка в условия на инхибиран ATR. В допълнение е показано, че ATR предотвратява пост-репликационното наличие на едноверижна ДНК след рестарт и последваща митотична катастрофа.



Фигура 7: Изображение на представителна клетка, експресираща RPA и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto, илюстриращо прогресията през различни фази от клетъчния цикъл в присъствие на ATR инхибитора AZD6738. Клетката е заснета на 10 минутни интервали за 24 часа след третиране с AZD6738.

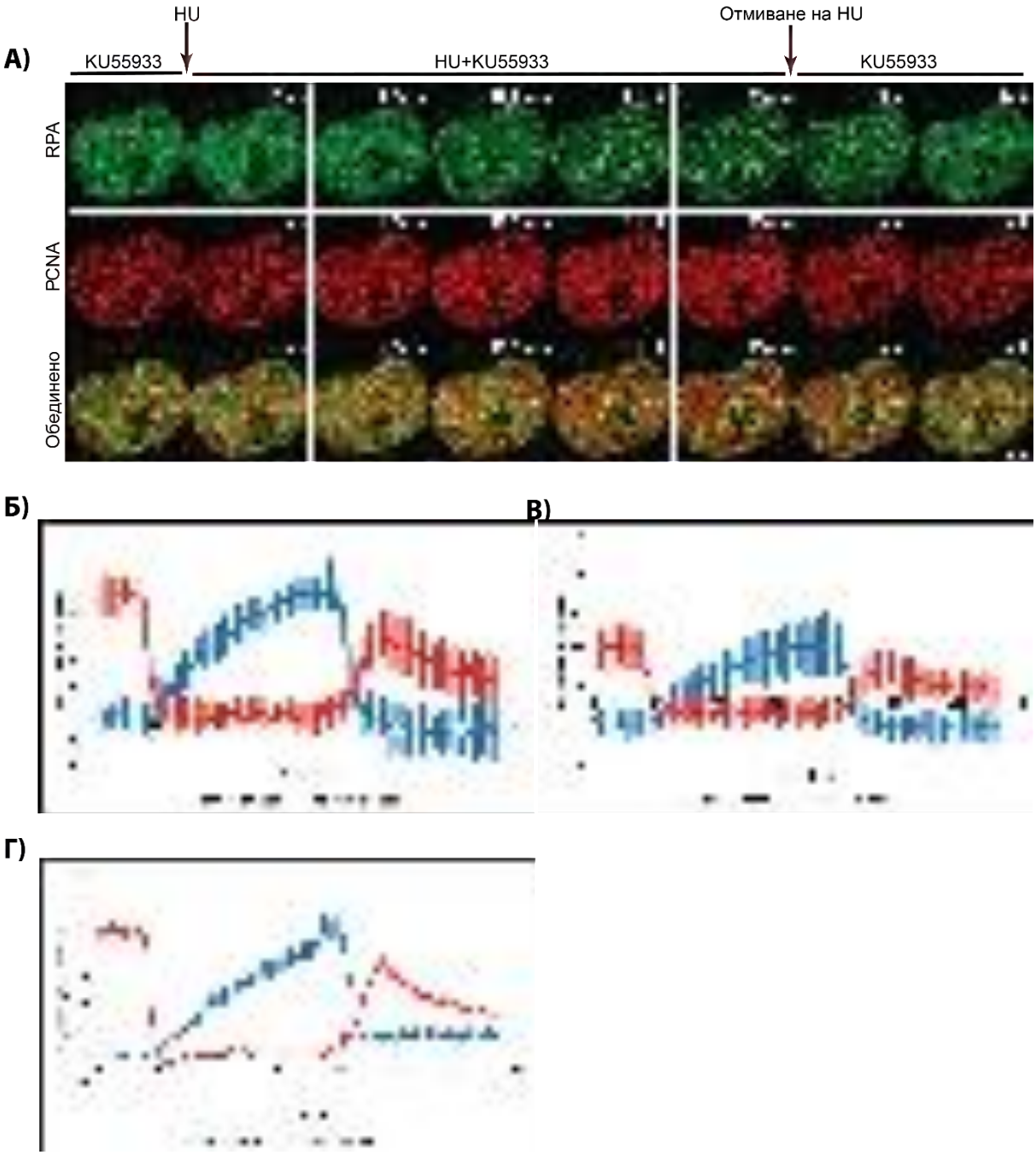


Фигура 8: Изображения на представителни клетки, експресиращи RPA и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto, илюстриращи невъзможността на клетките да прогресират през клетъчния цикъл в присъствие на ATR инхибитора AZD6738 след 1-часово третиране с HU. Клетките са в условия на инхибирана с AZD6738 ATR киназа и са заснети на 10 минутни интервали за 24 часа след промиване на HU.

4.2.3. Инхибирането само на ATM не оказва ефект върху динамиката и количествата на PCNA и RPA по време на спиране и рестартиране на репликационните вилки.

ATM киназата също участва в поддържане на целостта на репликационната вилка. Предполага се, че при спирането на репликационната вилка се образуват повреди в ДНК. ATM е белтък, който се натрупва на местата на увреждане на ДНК и катализира фосфорилирането на други белтъци. По този начин ATM участва в регулацията на клетъчния отговор при възникване на увреждания в ДНК. За потискането му е използван ATM инхибитора KU55933 (Hickson et al., 2004), като в средата за култивиране по време на експеримента е добавен само ATM инхибитора. Отново за спирането на репликационните вилки е използвано третиране с HU, а рестартирането е направено чрез промиване с клетъчна среда съдържаща ATM инхибитора.

Отново наблюдаваме почти мигновено отстраняване на PCNA и по-бавно натрупване на RPA (Фигура 9). В следствие на това може да се заключи, че при блокирана ATM киназа не се повлиява значително образуването на едноверижна ДНК. Наблюдаваният ефект е почти същия като в експеримента без инхибитори (Фигура 17А и Б). Следователно репликационния контролен пункт се е активирал посредством ATR киназата и е предотвратил по-нататъшното развиване на ДНК от хеликазите, съответно и количеството на ssDNA е по-малко. След отмиването на HU PCNA се възстановява, а RPA пада почти до първоначалните си нива, като все още се наблюдават слаби фокуси на RPA.

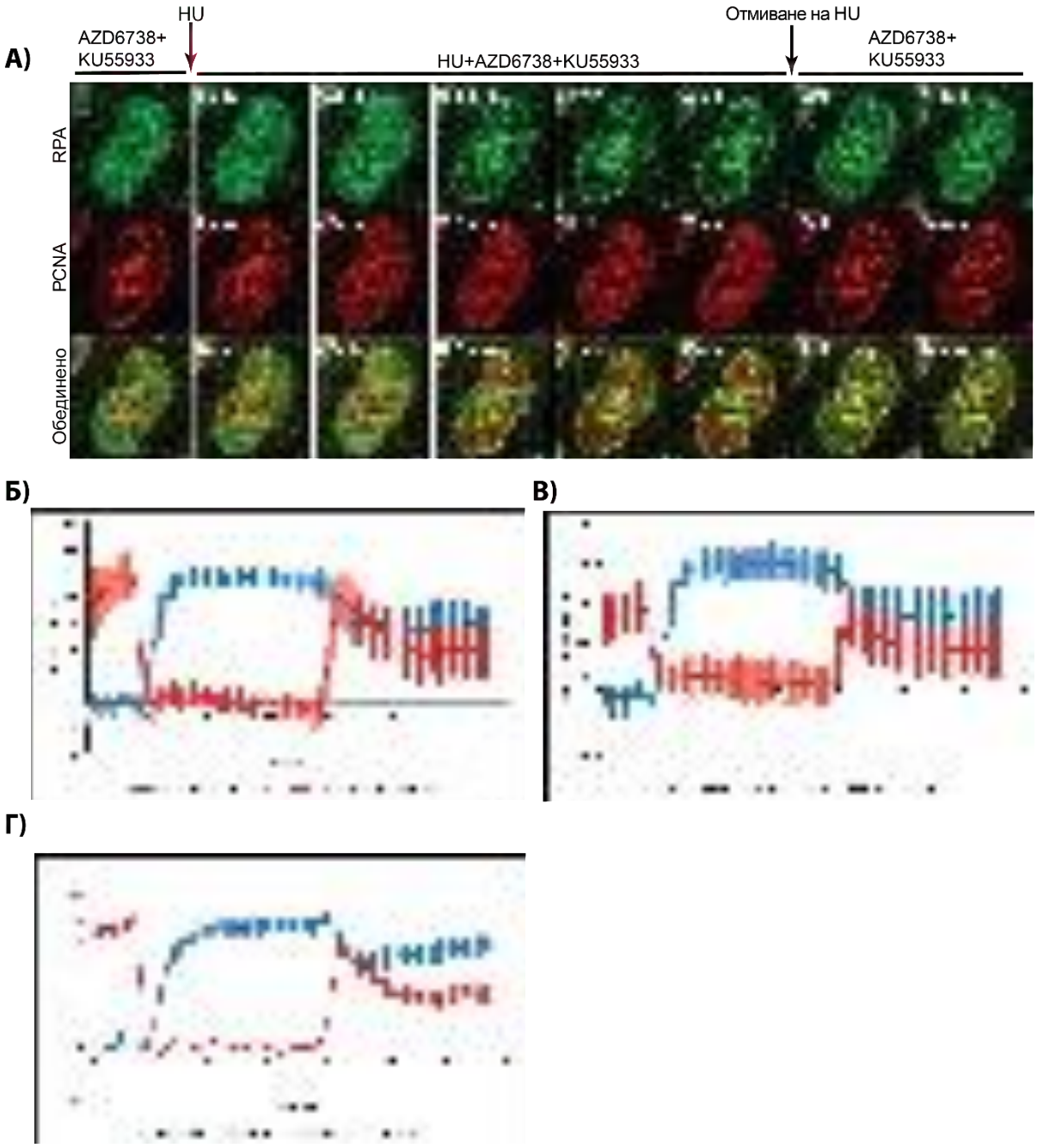


Фигура 9: Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU в присъствие на ATM инхибитора KU55933. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро. (Г) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA чрез използване на Sobel филтър.

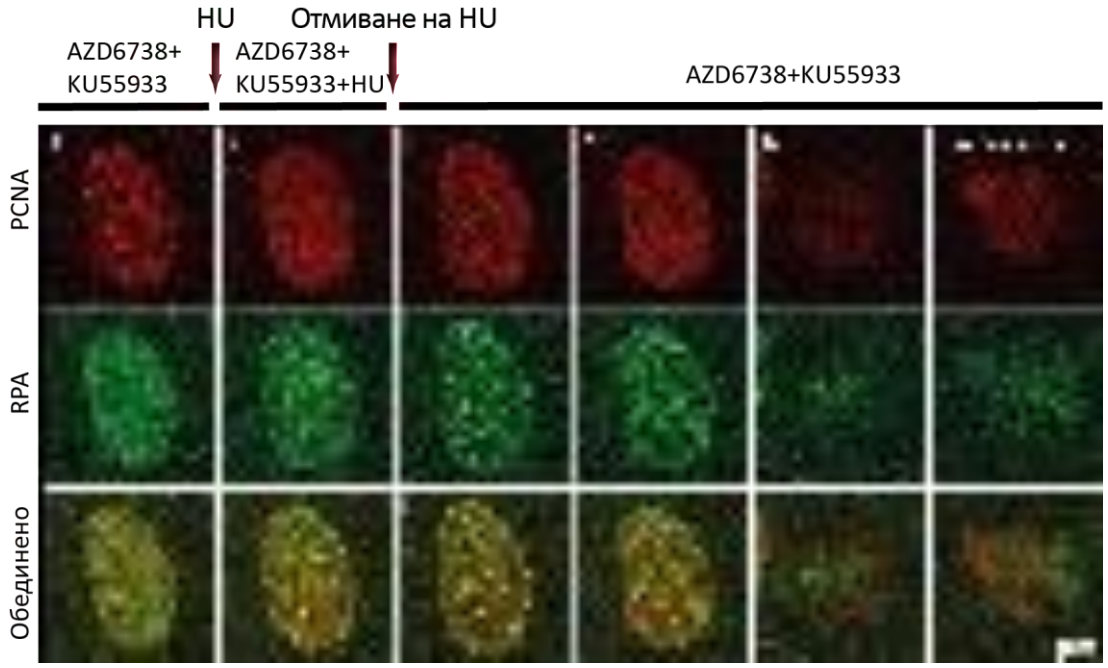
4.2.4. Съвместното инхибиране на ATM и ATR кумулативно предотвратява премахването на RPA по време на рестартиране на репликационните вилки.

При спиране на репликационната вилка с HU и блокиране на ATR и ATM киназите с инхибиторите AZD6738 и KU55933, се наблюдава премахване на PCNA и малко по-бързото натрупване на едноверижна ДНК, отколкото при експериментите само с AZD6738 (Фигура 10). Съвместното инхибиране на двете кинази доведе до малко по-бързо натрупване на RPA след третиране с HU в сравнение с инхибирането само на ATR (Фигура 17A). Докато полувремената и максималните нива на натрупване на RPA1 при двата експеримента са близки, RPA1 достига плато малко по-бързо в условия на комбинирано инхибиране на двете ATR и ATM кинази. Следователно отново след като е блокиран репликационния контролен пункт, той не може да забави действието на хеликазите и се генерират повече едноверижни участъци. След отмиването на HU бяха измерени осезаемо по-високи нива на остатъчния RPA след рестартиране на вилките, т.е по-високо количество на едноверижна ДНК. Съвместното инхибиране доведе до задържане на приблизително 60% от RPA в сравнение с 20% при инхибиране само на ATR (Фигура 17A). Резултата е приблизително 74±18 RPA1 молекули покриващи ~2200нт едноверижна ДНК.

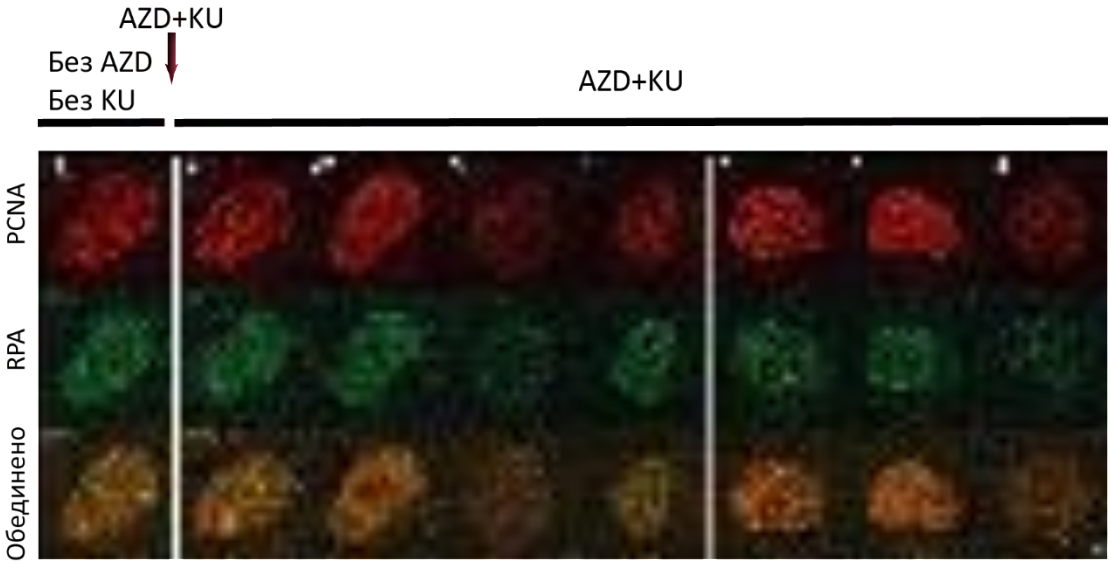
За да определим големината на остатъчната фракция RPA наблюдавахме клетки третирани с ATR и ATM инхибитори в период от 24 часа с и без третиране с HU (Фигура 11, Фигура 12). Дори след промиването на HU, голяма остатъчна фракция RPA остава през цялата S фаза и продължава и през G2 до митоза, след което настъпва масивна митотична катастрофа, която води до повсеместна клетъчна смърт, като никоя клетка не достига до G1. Така, в сравнение с инхибирането само на ATR, комбинираното инхибиране и на двете кинази ATR и ATM води до значително увеличаване на индуцираните с HU пострепликативни едноверижни ДНК участъци и невъзможност на клетките за прогресия в следващ клетъчен цикъл. Заедно тези открития подсказват, че докато ATM не повлиява спирането на вилката и нейния рестарт в присъствие на ATR активност, тя предотвратява масивното пострепликативно натрупване на едноверижна ДНК в клетки с инхибирана ATR киназа.



Фигура 10: Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU в присъствие на ATR инхибитора AZD6738 и ATM инхибитора KU55933. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро. (Г) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA чрез използване на Sobel филтър.



Фигура 11: Изображение на представителна клетка, експресираща RPA и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto, илюстриращо невъзможността на клетките да прогресират през клетъчния цикъл в присъствие на ATR инхибитора AZD6738 и ATM инхибитора KU55933 след 1-часово третиране с HU. Клетките са в условия на инхибирани ATR и ATM кинази и са заснети на 10 минутни интервали за 24 часа след промиване на HU. Всички клетки умират преди да навлязат в G1 фаза.



Фигура 12: Изображение на представителна клетка, експресираща RPA и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto, илюстриращо възможността на клетката да прогресира през клетъчния цикъл в присъствие на ATR инхибитора AZD6738 и ATM инхибитора KU55933, когато липсва блокиране на вилките с HU. Клетките са в условия на инхибирани ATR и ATM кинази и са заснети на 10 минутни интервали за 24 часа след добавяне на инхибиторите на ATR и ATM.

4.2.5. MRE11 зависимата резекция не повлиява динамиката на RPA при спиране и рестарт на вилката

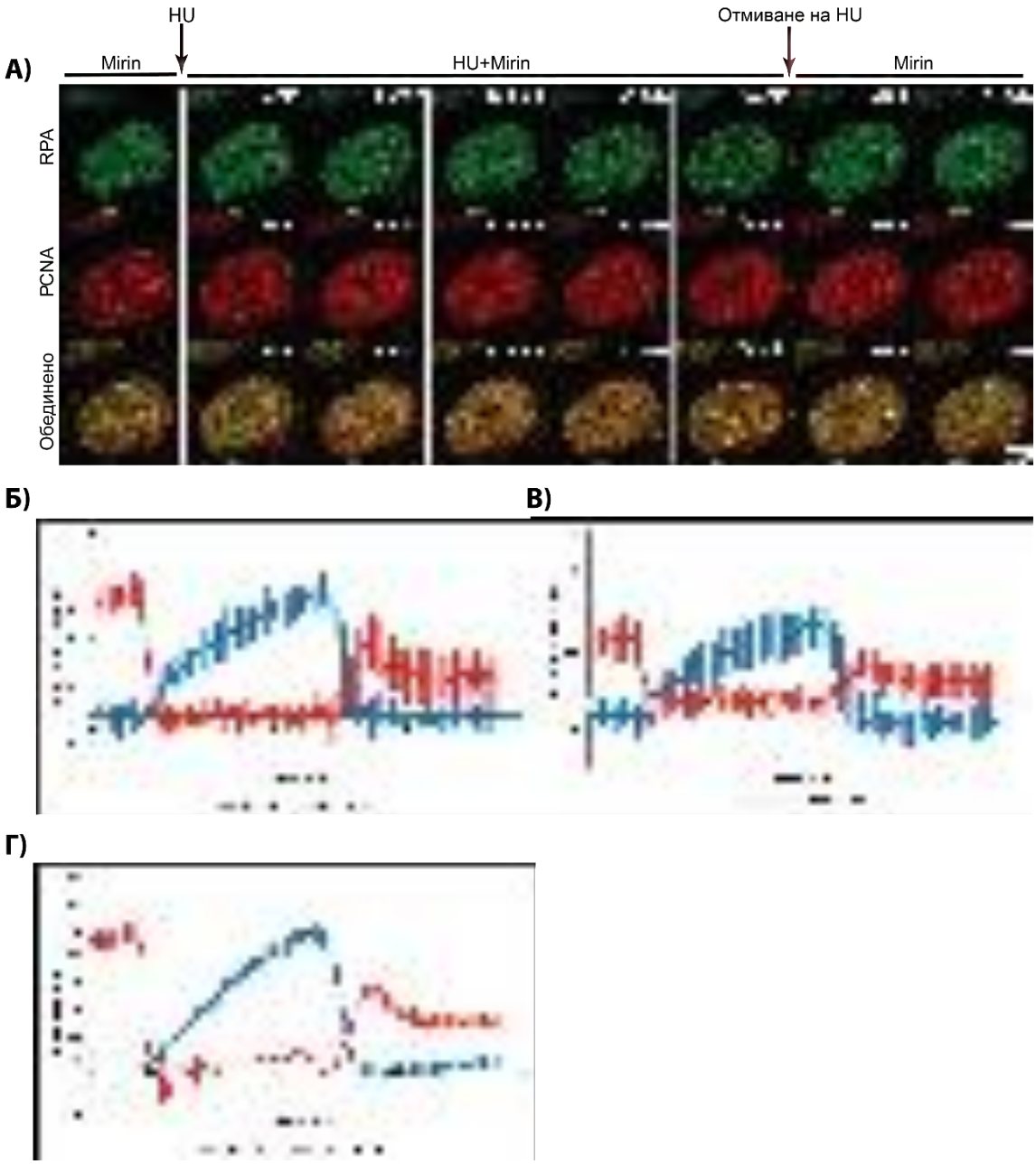
Тъй като едноверижната ДНК при стресираните вилки може да се генерира посредством нуклеотидна деградация бяха проведени експерименти, при които в

средата беше добавен mirin (Dupré et al., 2008) - инхибитор на MRN комплекса, в който участва и нуклеазата MRE11. За MRE11 се знае, че служи като медиатор на първичната, патологична деградация на веригата при спрени вилки. Бяха проведени експерименти, чрез които да се установи дали инхибирането на MRE11 ще окаже влияние върху динамиката на RPA и PCNA в условия на нуклеотиден глад предизвикан от HU. Инхибитора Mirin беше добавен с цел инхибиране на екзонуклеазната активност на MRE11 преди индуцирането на стрес върху вилките чрез HU и последващото му премахване. Самостоятелното инхибиране с Mirin не доведе до промяна в динамиката на RPA и PCNA по време на спирането на вилката. Освен това не бяха наблюдавани промени при реакумулирането на PCNA и премахването на RPA1 по време на рестарта на вилките. За да се определи дали MRE11 допринася за увеличената скорост на образуване на едноверижна ДНК в условия на HU и инхибирана ATR киназа, клетките бяха подложени на комбинираното третиране с Mirin и инхибитор на ATR преди добавянето на HU в средата. Отново не беше наблюдавана разлика в динамиката на RPA и PCNA (Фигура 13, Фигура 14 и Фигура 17 В,Г). Тези резултат съвпадат с твърдението, че вилките до голяма степен са предпазени от MRE11 медиирана нуклеотидна деградация в BRCA1/2 компетентни клетки.

4.2.6. Инхибирането на PARP1/2 забавя натрупването на RPA в условия на нуклеотиден глад индуциран посредством HU в отсъствието на ATR активност.

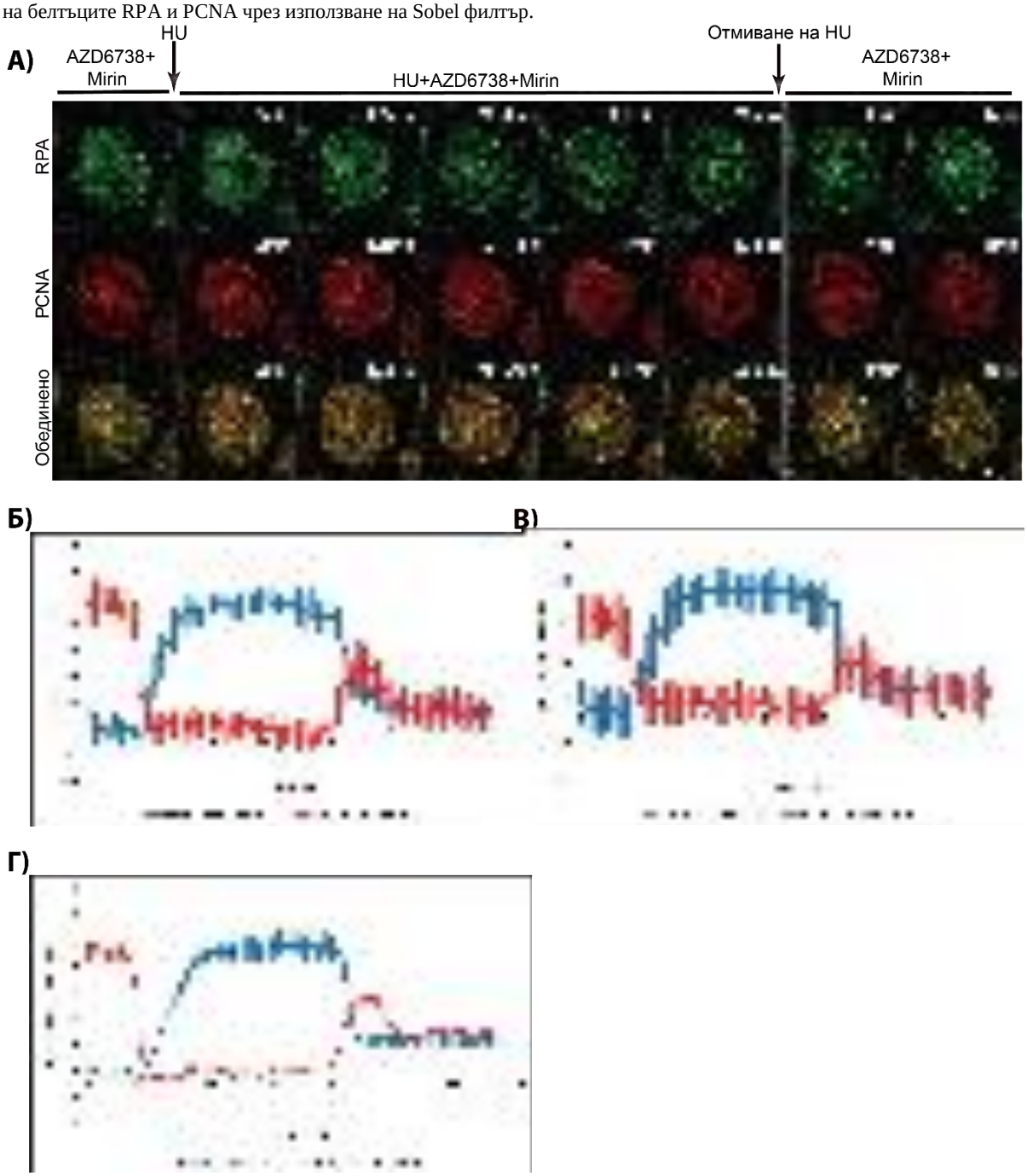
В светлината на нарастващите доказателства, в подкрепа на ролята на PARP1 по време на спиране и рестарт на репликационните вилки, бяха извършени експерименти за оценка на ефектите на талазопариб (BMN673) върху динамиката на PCNA и RPA в репликационните фокуси по време на HU-индуциран репликационен стрес (Фигура 15 и Фигура 16). Инхибирането на PARP1 не повлия значително на скоростта на премахване на PCNA, индуцирано от HU ($t_{1/2}$= 3 минути) (Фигура 17Е). Натрупването на RPA също протече с подобна скорост в сравнение с контролните условия ($t_{1/2}$= 22.5 минути)) (Фигура 17Д). Премахването на RPA след промиването на HU също протече със скорости, подобни на тези при контролните условия, като третирането с PARP инхибитор значително намали количеството на повторно натрупващия се PCNA в репликационните фокуси – четирикратно (Фигура 17Д, Е). Това е в съответствие с предишно докладваната роля на PARP1 в промотирането на рестарта на репликацията след третиране с HU (Bryant et al., 2009). Оценени бяха и ефектите от комбинираното инхибиране на ATR и PARP. Съвместното инхибиране не промени динамиката на

премахване на PCNA, индуцирано от HU в сравнение със самостоятелното инхибиране на ATR. Но натрупването на RPA1 беше забавено. Нито динамиката на премахване на RPA след промиване на HU, нито повторно натрупване на PCNA бяха повлияни, в сравнение с тези в условия само на ATR инхибитор (Фигура 17Д, Е). Активността на PARP1/2 допринася за индуцираното от HU по-бързо натрупване на едноверижна ДНК в условия на ATR инхибитор.

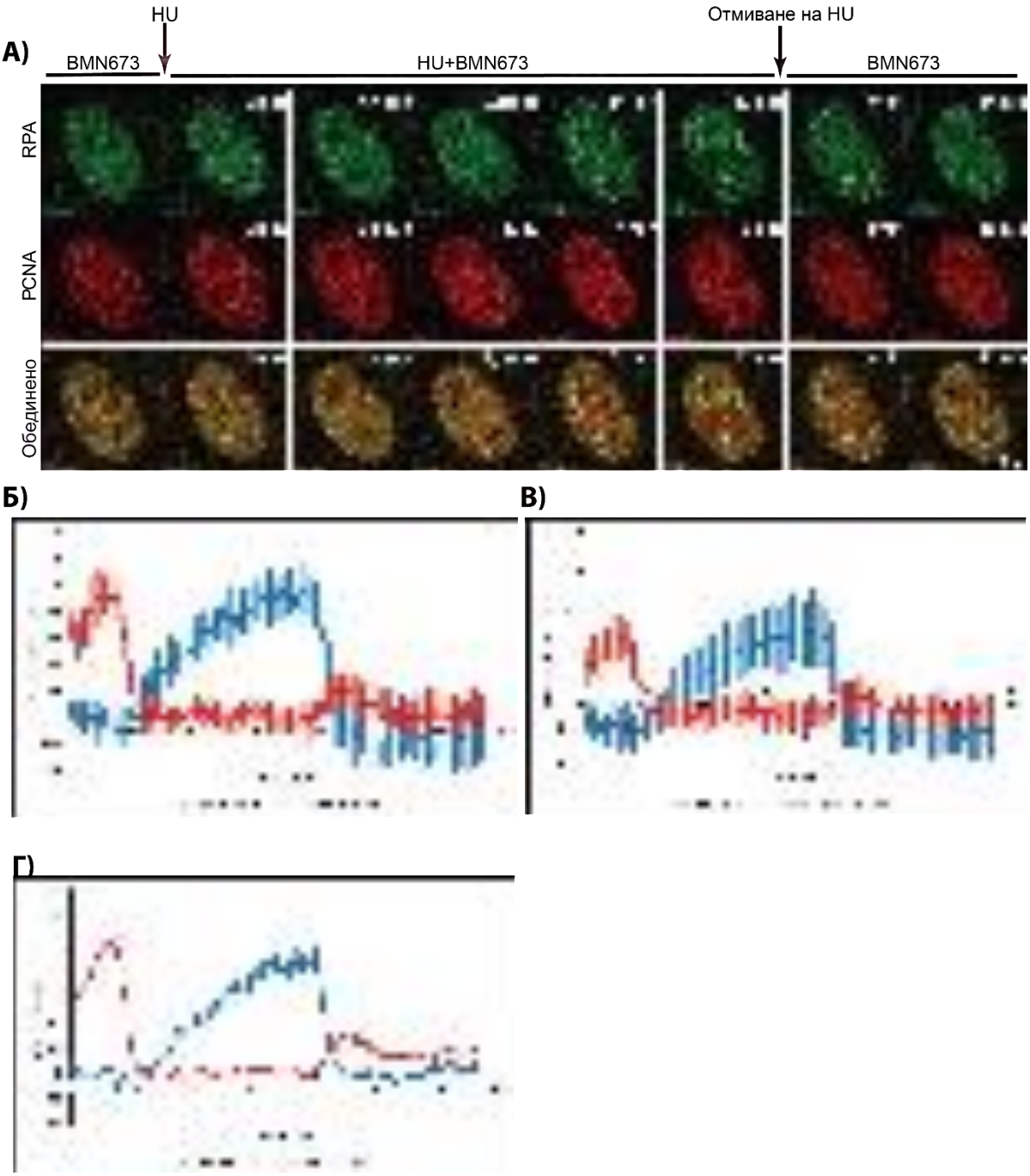


Фигура 13: Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU в присъствие на MRN инхибитора Mirin. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при

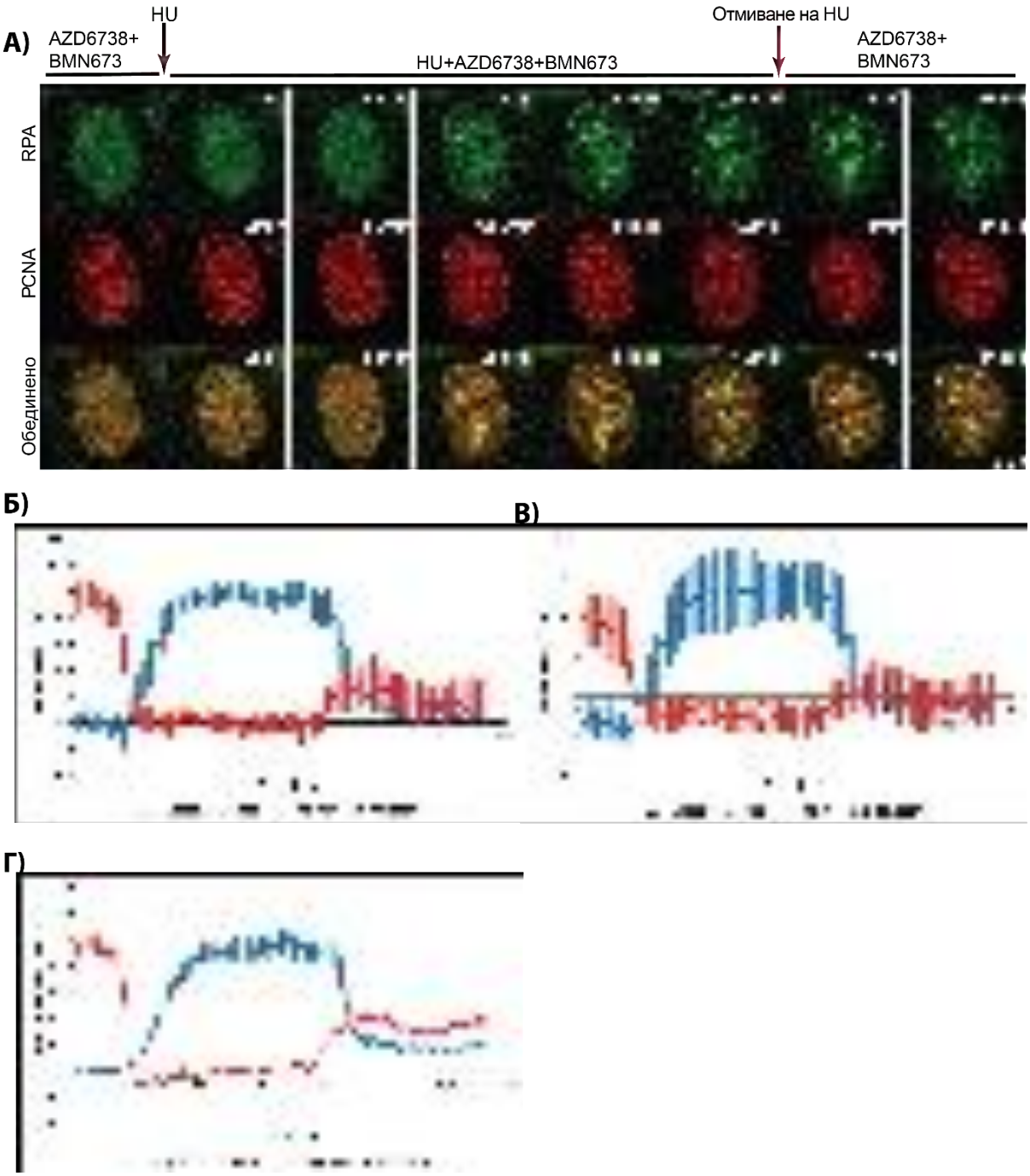
нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро. (Г) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA чрез използване на Sobel филтър.



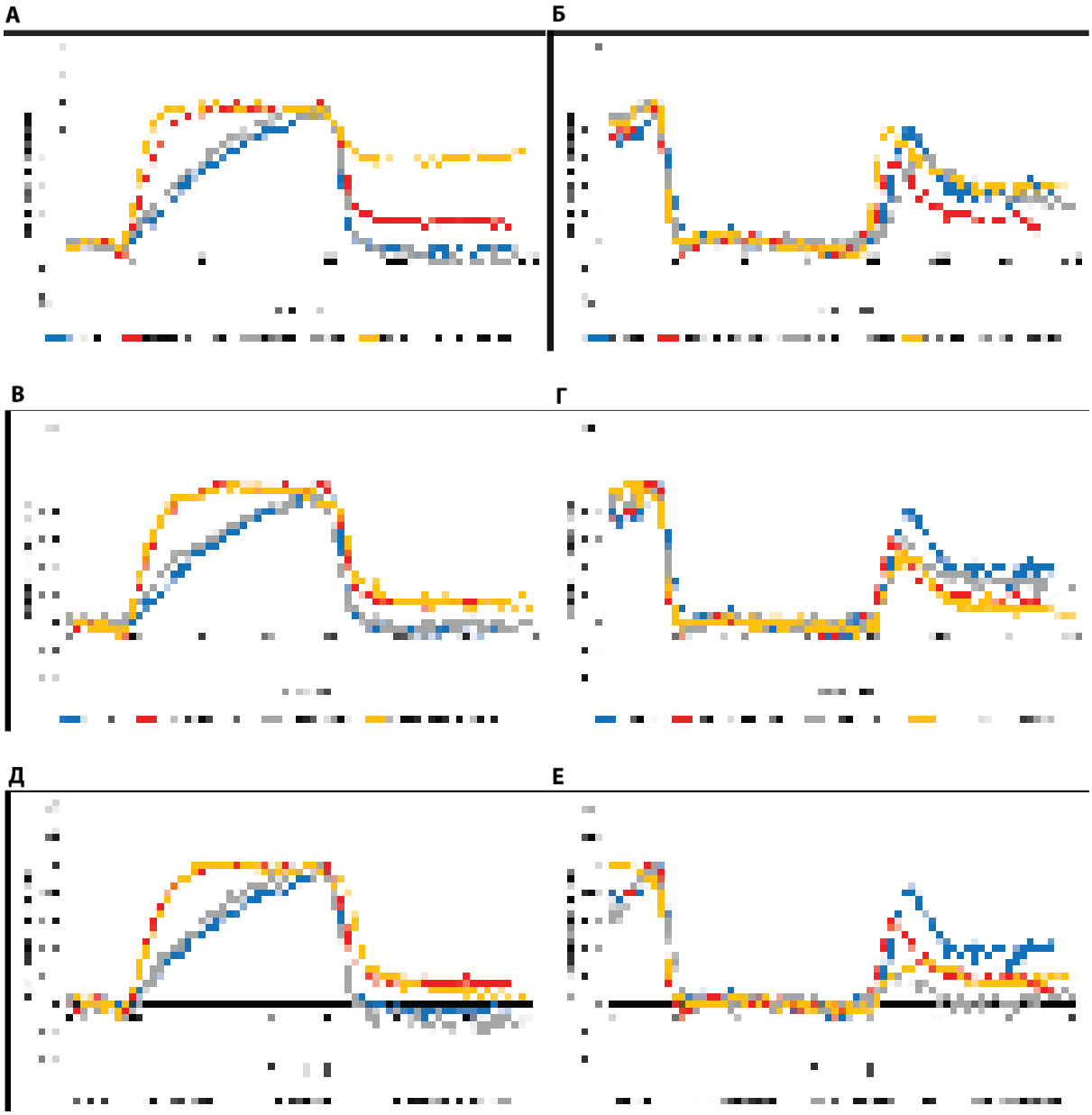
Фигура 14: Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU в присъствие на ATR инхибитора AZD6738 и MRN инхибитора Mirin. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро. (Г) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA чрез използване на Sobel филтър.



Фигура 15: Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU в присъствие на PARP инхибитора BMN673. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро. (Г) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA чрез използване на Sobel филтър.



Фигура 16: Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU в присъствие на ATR инхибитора AZD6738 и PARP инхибитора BMN673. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро. (Г) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA чрез използване на Sobel филтър.



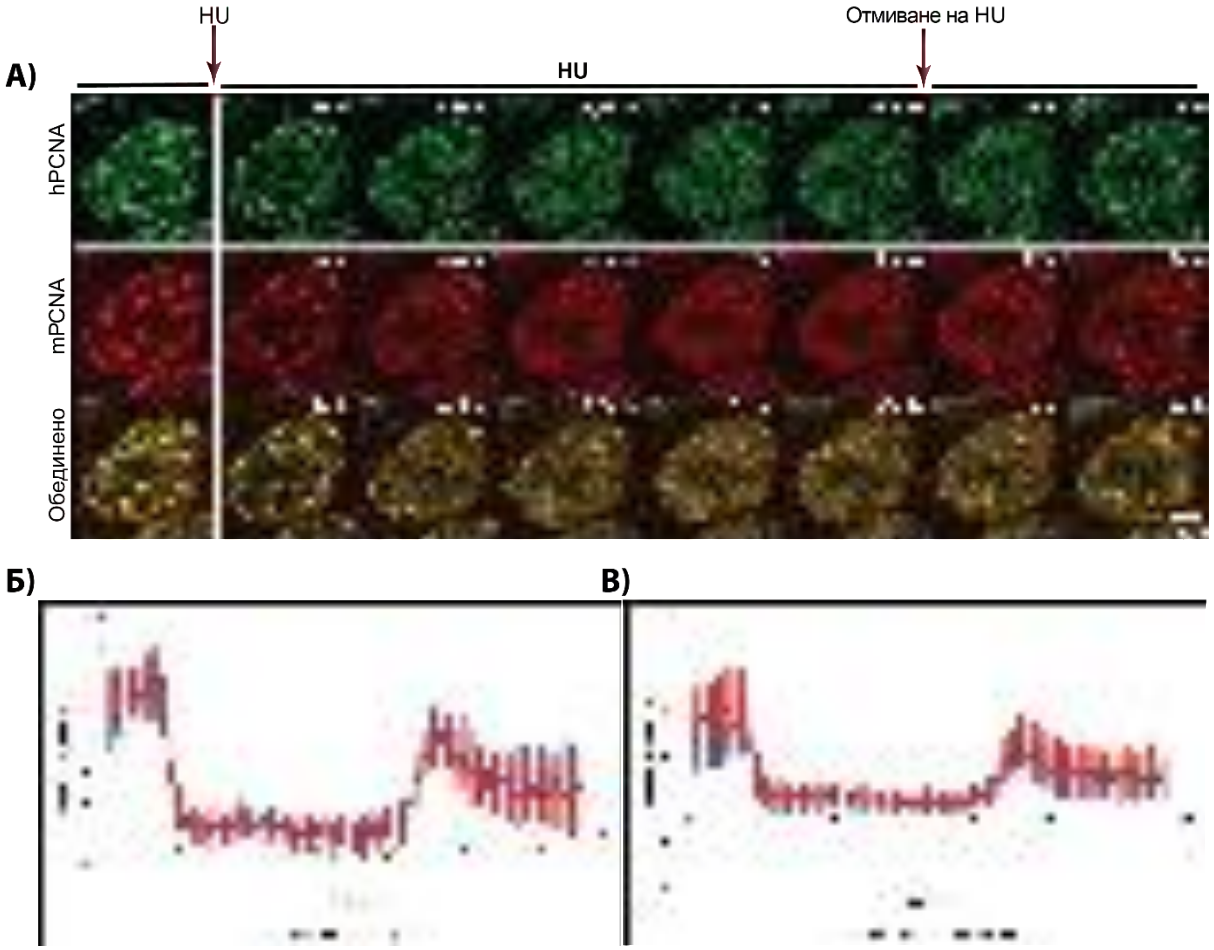
Фигура 17: Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU в присъствие на различни комбинации от инхибитори на ATM (KU55933), ATR (AZD6738), PARP1 (BMN673) и MRN (Mirin). (А) Съпоставка на динамиката на натрупване и премахване на RPA по време на спиране и рестарт на репликационната вилка чрез третиране с HU в присъствие и отсъствие на ATM и ATR инхибитори. (Б) Съпоставка на динамиката на натрупване и премахване на PCNA по време на спиране и рестарт на репликационната вилка чрез третиране с HU в присъствие и отсъствие на ATM и ATR инхибитори. (В) Съпоставка на динамиката на натрупване и премахване на RPA по време на спиране и рестарт на репликационната вилка чрез третиране с HU в присъствие и отсъствие на MRN и ATR инхибитори. (Г) Съпоставка на динамиката на натрупване и премахване на PCNA по време на спиране и рестарт на репликационната вилка чрез третиране с HU в присъствие и отсъствие на MRN и ATR инхибитори. (Д) Съпоставка на динамиката на натрупване и премахване на RPA по време на спиране и рестарт на репликационната вилка чрез третиране с HU в присъствие и отсъствие на PARP1 и ATR инхибитори. (Е) Съпоставка на динамиката на натрупване и премахване на PCNA по време на спиране и рестарт на репликационната вилка чрез третиране с HU в присъствие и отсъствие на PARP1 и ATR инхибитори.

4.3. Верификация на резултатите за RPA и PCNA при спиране и рестарт на репликационната вилка

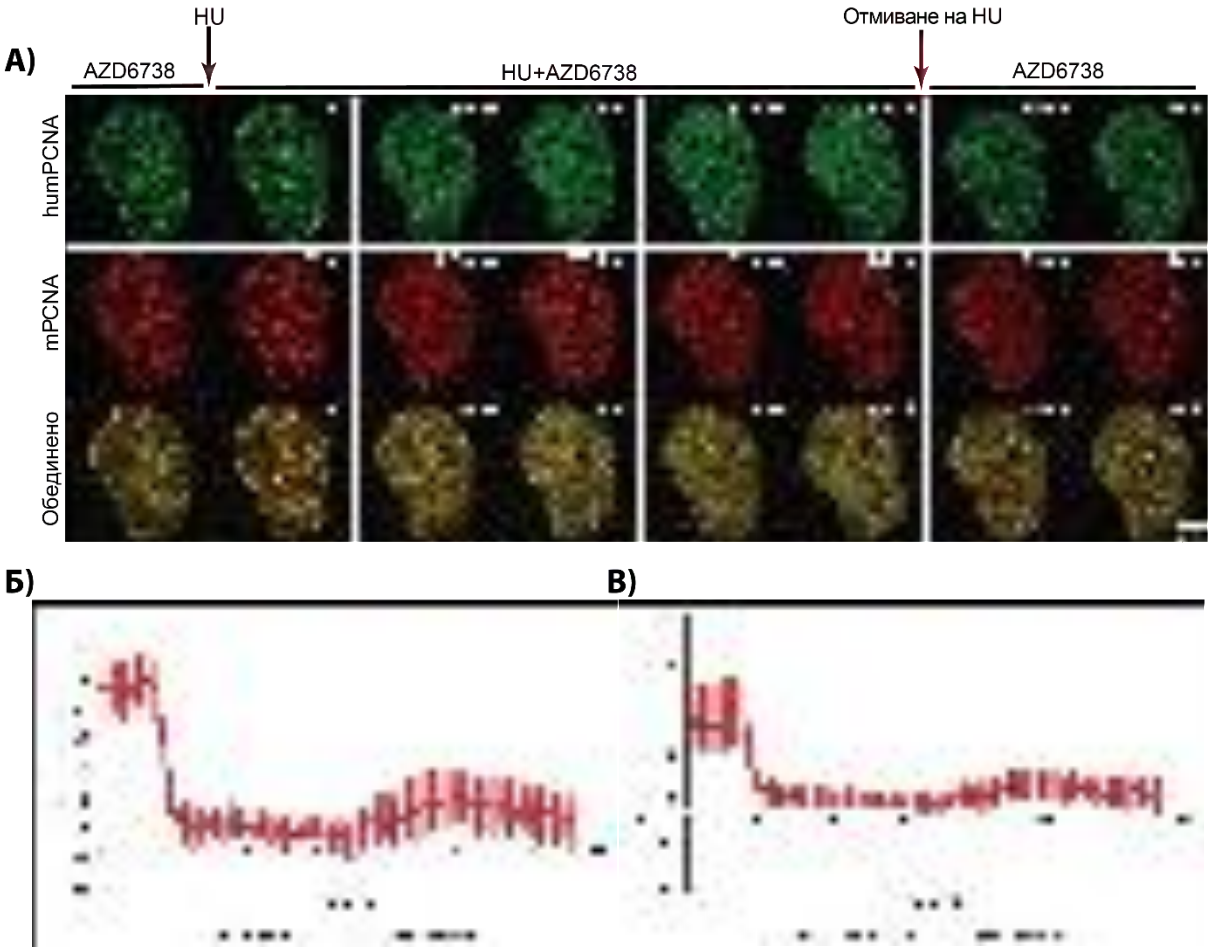
При нашите експерименти беше използван миши PCNA. За да потвърдим, че поведението на мишия и човешкия PCNA не се различава бяха проведени контролни експерименти с клетъчна линия експресираща миши и човешки PCNA. Беше извършен експеримент, при който репликационните вилки бяха спрени посредством третиране с HU и рестартиране след промиване с хранителна среда без HU. Този експеримент беше извършен в отсъствие (Фигура 18) или в постоянно присъствие (Фигура 19) в хранителната среда на ATR инхибитора AZD6738. Измерените резултати за кинетиката на натрупване на мишия и човешкия PCNA показаха пълно съвпадение.

За да верифицираме дали динамиката на PCNA и RPA в условия на индуциран с HU репликационен стрес са постоянни в различни клетъчни линии генерирахме PC3 и Du145 създадени от човешки рак на простатата, които да експресират mCherry-белязан PCNA и EGFP-белязан RPA. Те бяха получени посредством BAC и подложени на третиране само с HU или в комбинация с ATM и ATR инхибитори. За целта беше изследвана кинетиката на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при спиране и рестарт на вилката в следствие на третиране с HU и последващо промиване. Експериментите бяха направени в отсъствие на инхибитори (Фигура 20 и Фигура 24), в присъствие на ATR инхибитор AZD6738 (Фигура 21 и Фигура 25), в присъствие на ATM инхибитор KU55933 (Фигура 22 и Фигура 26) и в присъствие на двата инхибитора в клетъчната среда (Фигура 23 и Фигура 27). Индуцираното с HU премахване на PCNA се извършва с еднаква скорост помежду трите клетъчни линии във всички експериментални условия. В съответствие с резултатите при HeLa Kyoto клетъчната линия инхибирането на ATR значително увеличи скоростта на индуцираното в условия на HU натрупване на RPA при PC3 и Du145 клетките, докато инхибирането на ATM не демонстрира значителен ефект върху този процес. Трябва да се отбележи, че при всички експериментални условия натрупването на RPA е по-бавно при PC3 и Du145 клетъчните линии, отколкото при HeLa Kyoto. Докато премахването на RPA след промиването на HU се осъществява с близки скорости и при трите клетъчни линии, то се инициира на по-късен етап при PC3 и Du145, особено при PC3, където беше наблюдавано забавяне от 10 минути в сравнение с HeLa Kyoto клетъчната линия. Бяха наблюдавани и забавяния и в повторното натрупване на PCNA след промиването на HU. В заключение, докато

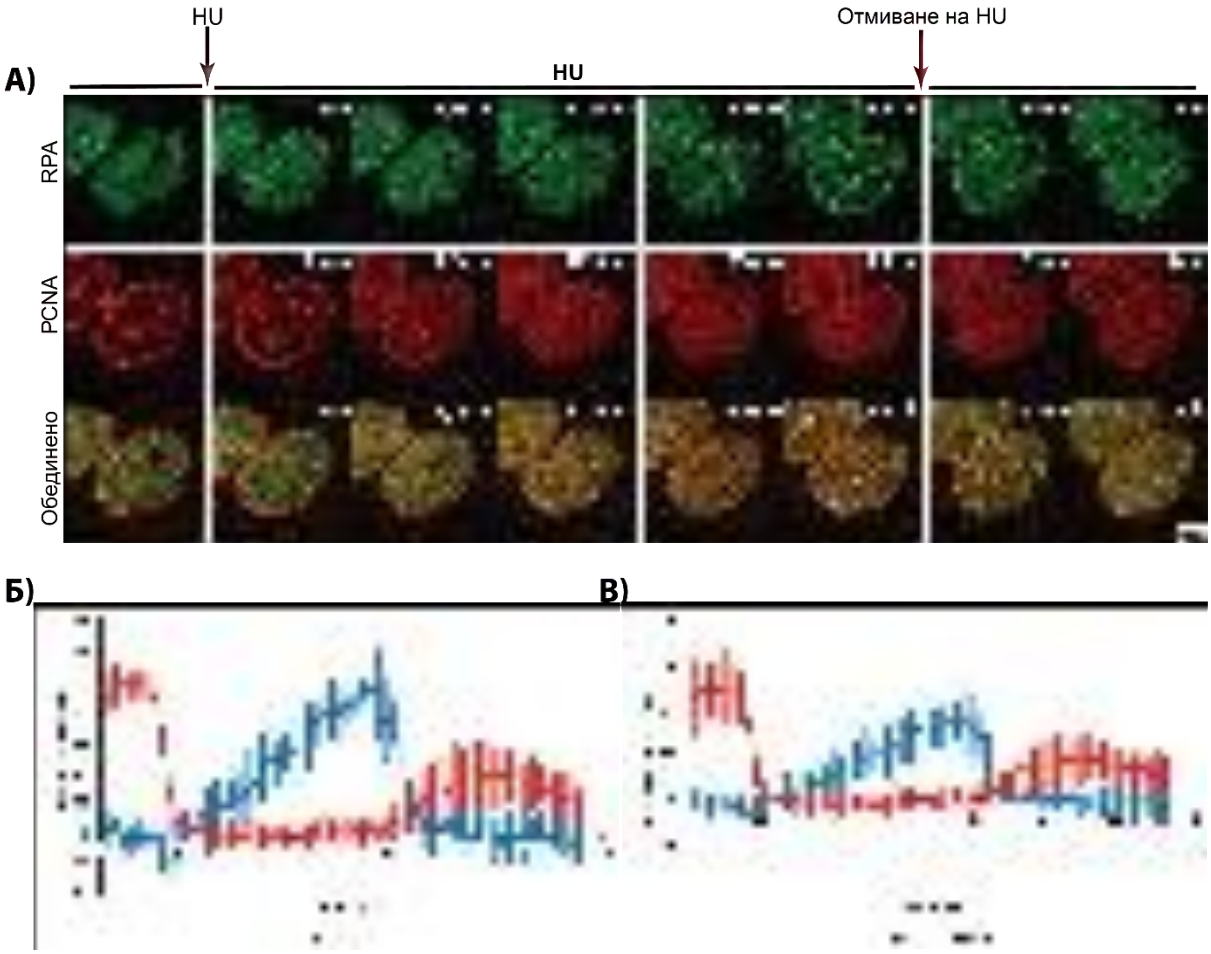
цялостната динамика на PCNA и RPA са константни при трите клетъчни линии, се наблюдават и разлики при натрупването и премахването на RPA, особено при PC3. Това може да произлиза от разлики в нуклеотидния метаболизъм, например по-бавно възстановяване на нуклеотидния резерв.



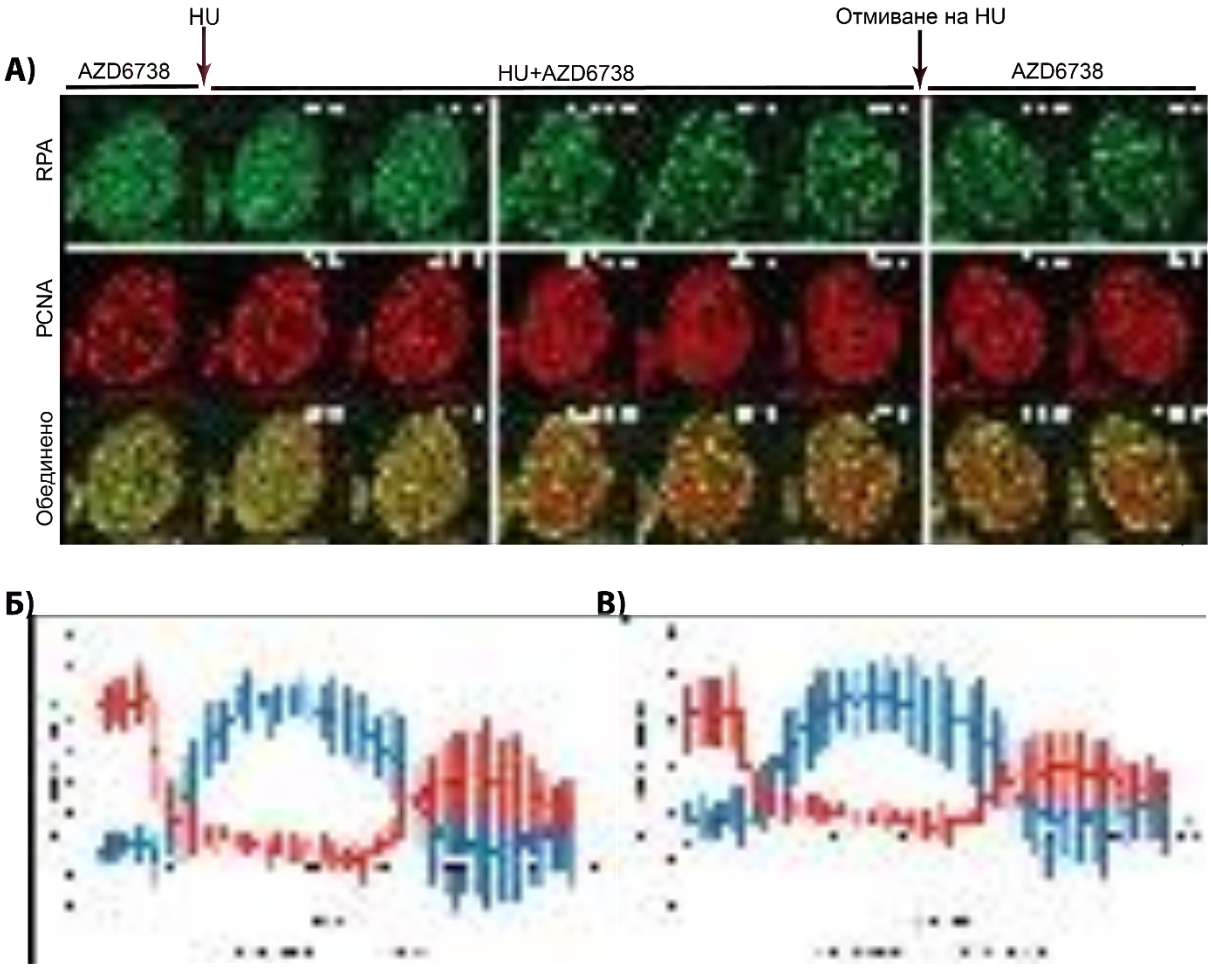
Фигура 18: Кинетика на натрупване и премахване на humPCNA (човешки) и mPCNA (миши) при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците humPCNA и mPCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците humPCNA и mPCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро.



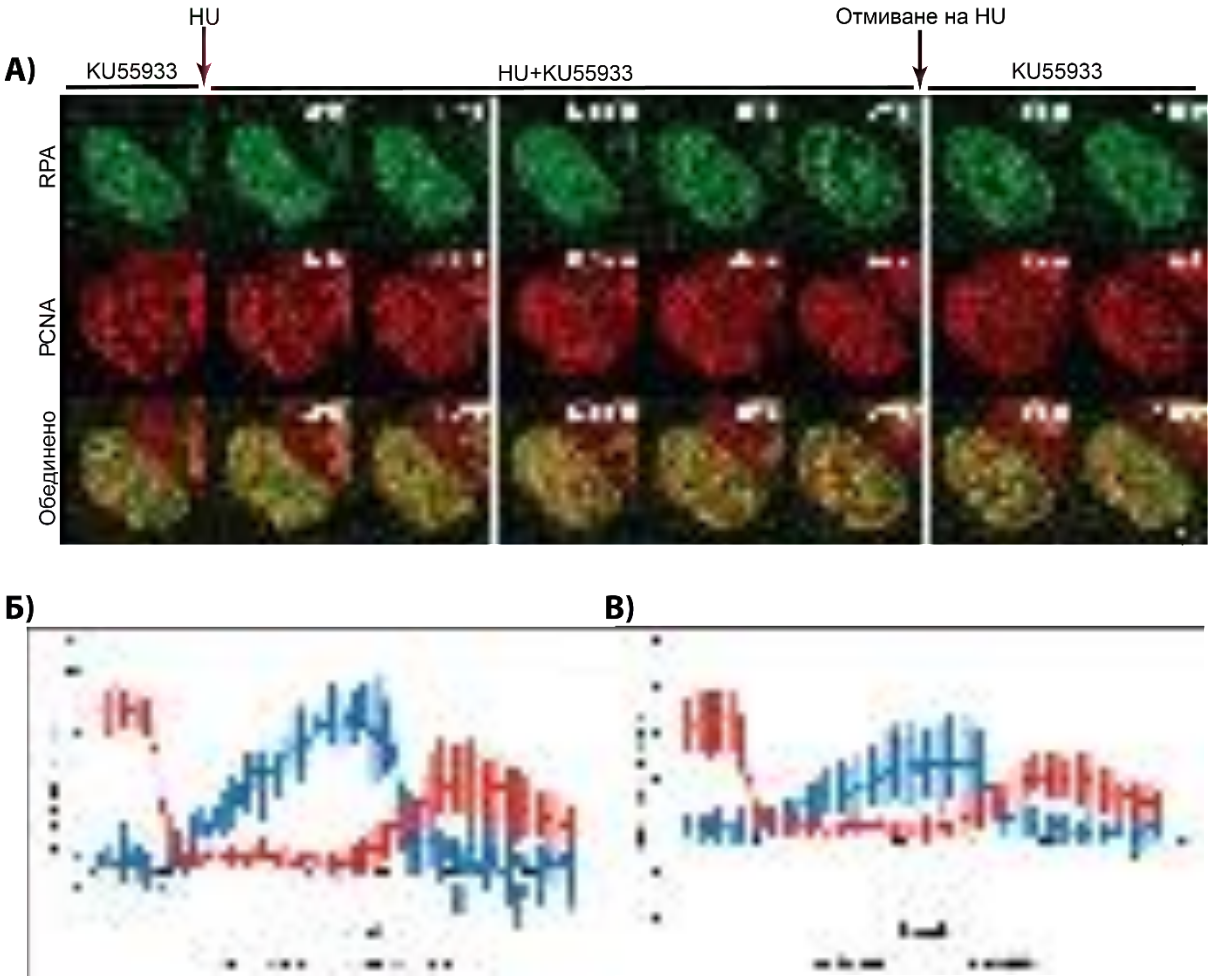
Фигура 19: Кинетика на натрупване и премахване на humPCNA (човешки) и mPCNA (миши) при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU в присъствие на ATR инхибитора AZD6738. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците humPCNA и mPCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация.(В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците humPCNA и mPCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро.



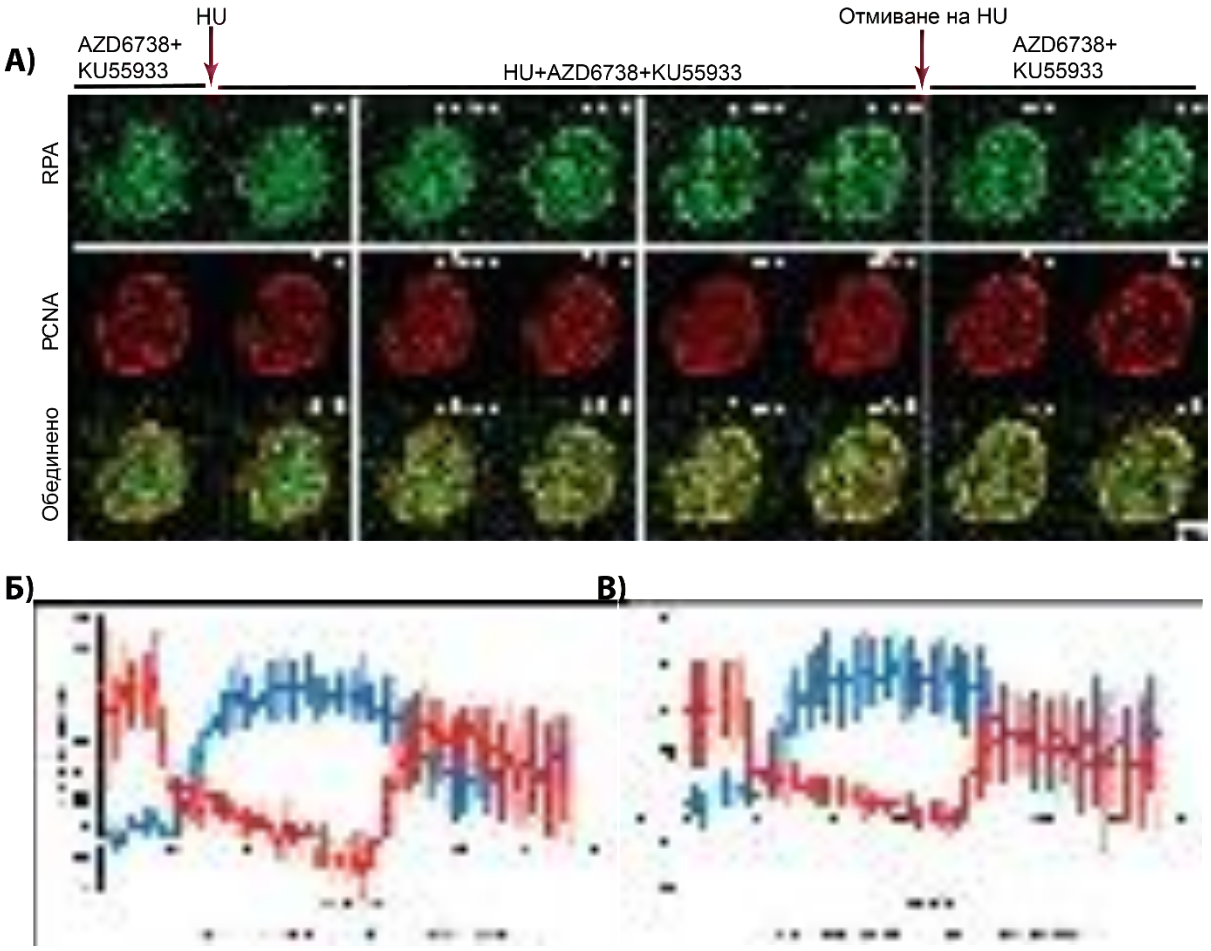
Фигура 20: Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия DU145 при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро.



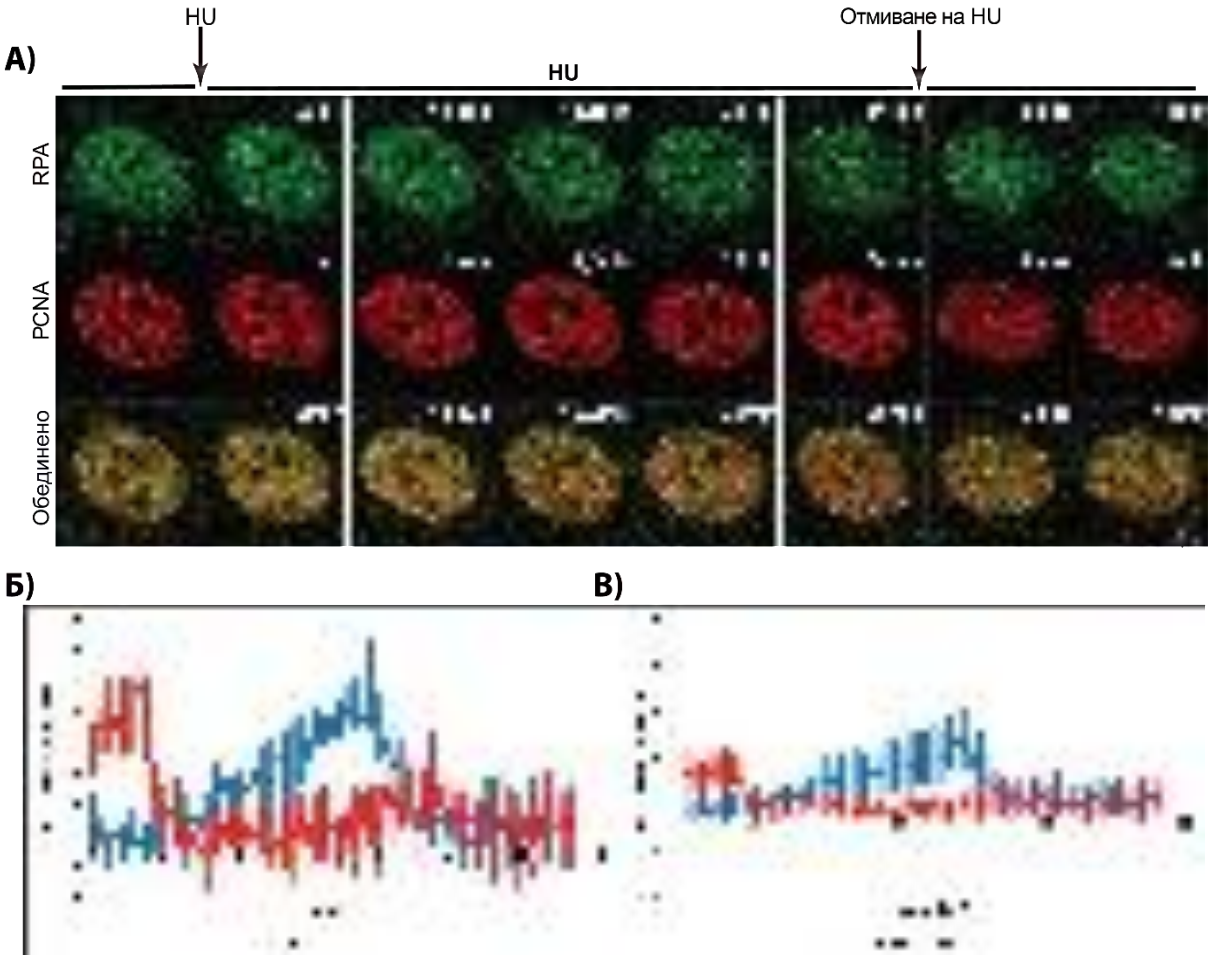
Фигура 21: Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия DU145 при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU в присъствие на ATR инхибитора AZD6738. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро.



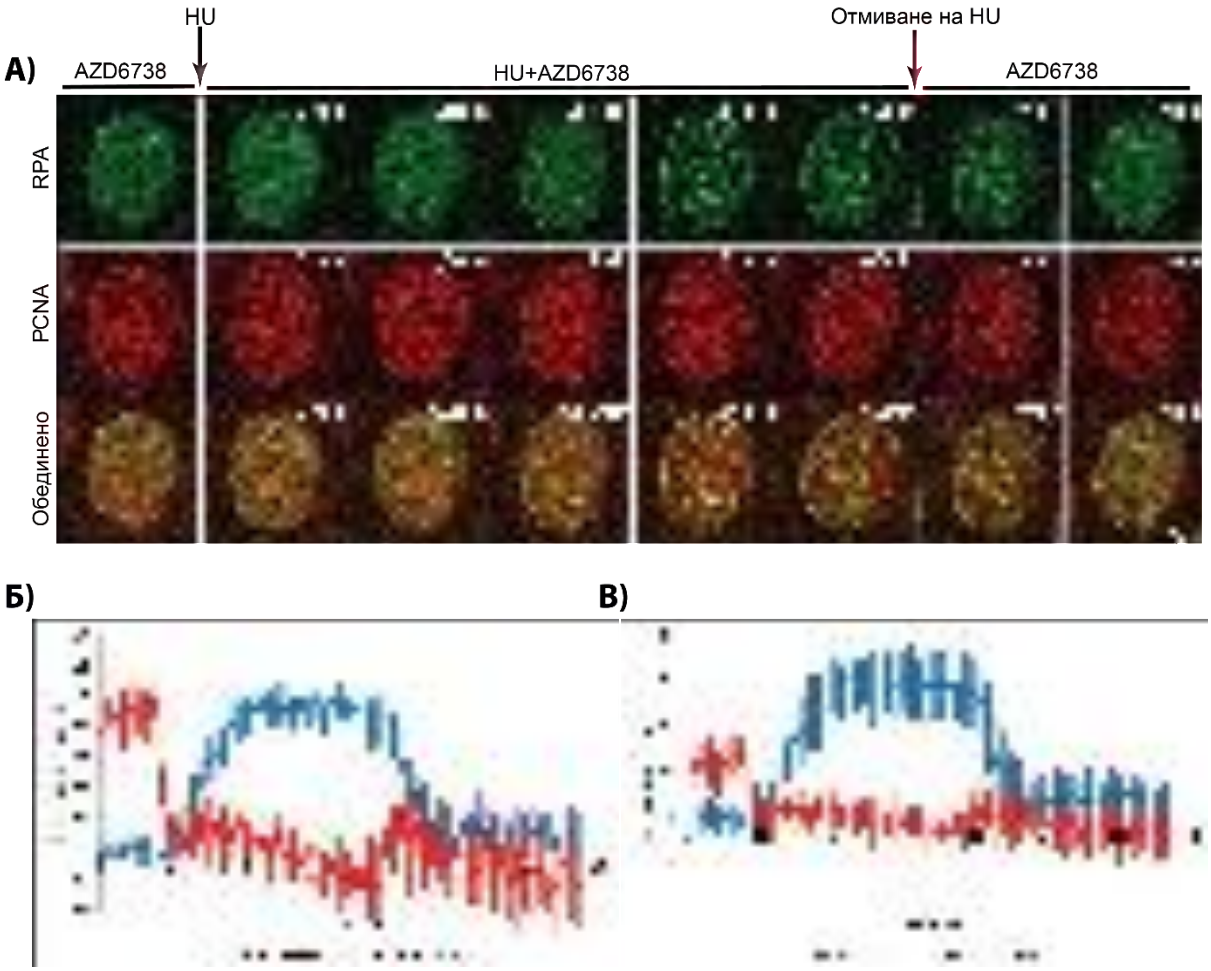
Фигура 22: Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия DU145 при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU в присъствие на ATM инхибитора KU55933. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро.



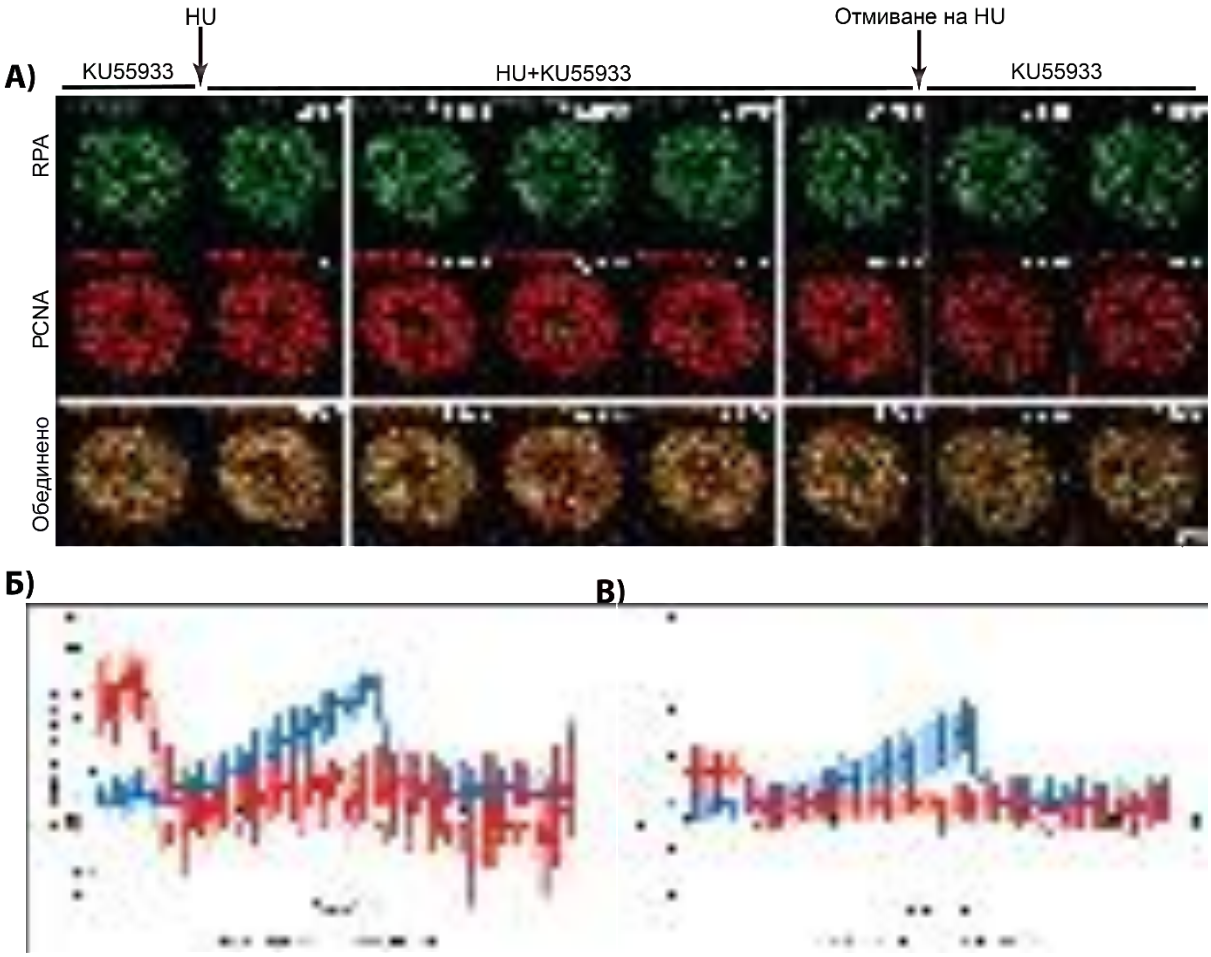
Фигура 23: Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия DU145 при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU в присъствие на ATR инхибитора AZD6738 и ATM инхибитора KU55933. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро.



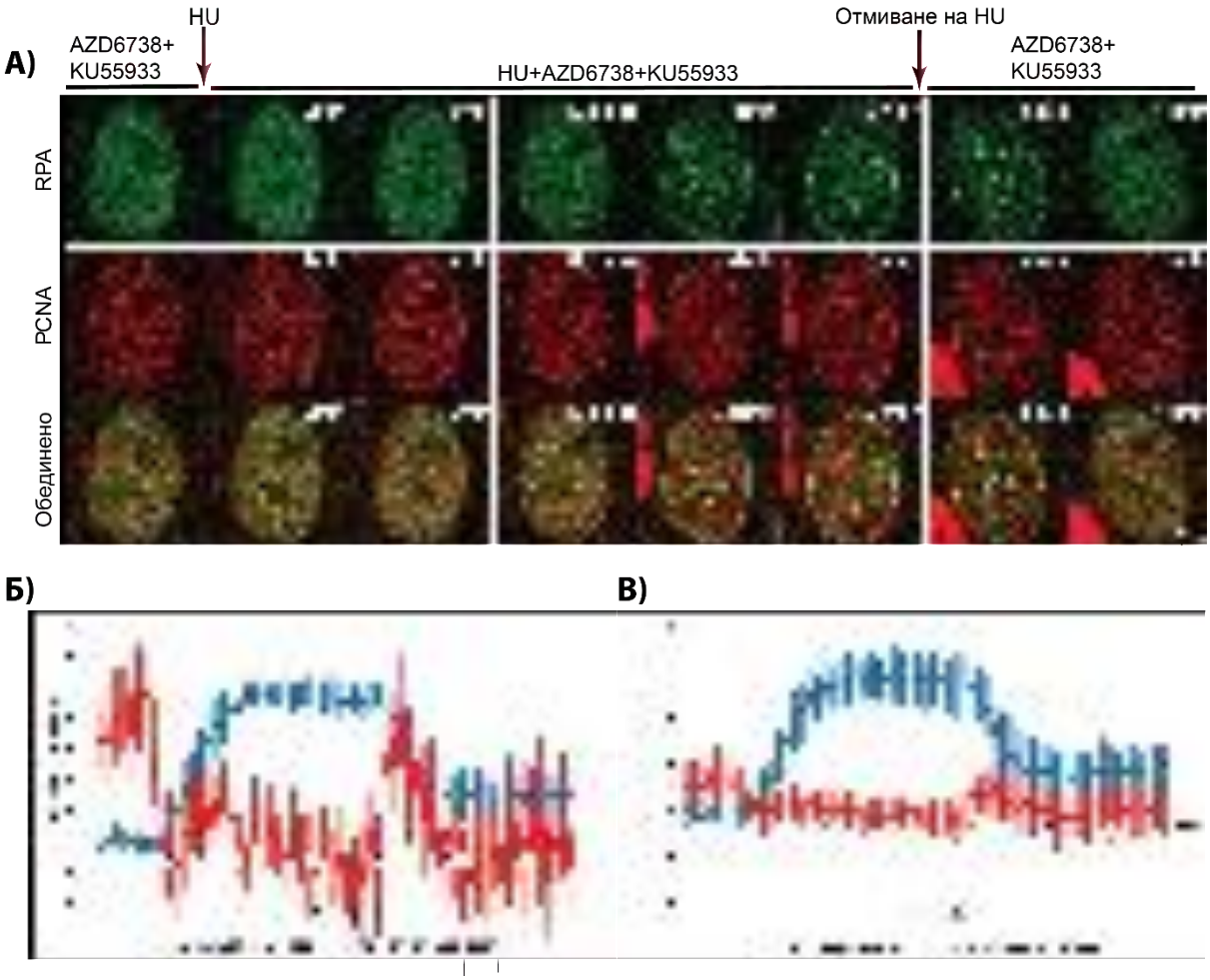
Фигура 24: Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия PC3 при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро.



Фигура 25: Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия PC3 при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU в присъствие на ATR инхибитора AZD6738. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро.



Фигура 26 Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия PC3 при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU в присъствие на ATM инхибитора KU55933. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро.



Фигура 27: Кинетика на натрупване и премахване на RPA и PCNA в клетъчна линия PC3 при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU в присъствие на ATR инхибитора AZD6738 и ATM инхибитора KU55933. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро.

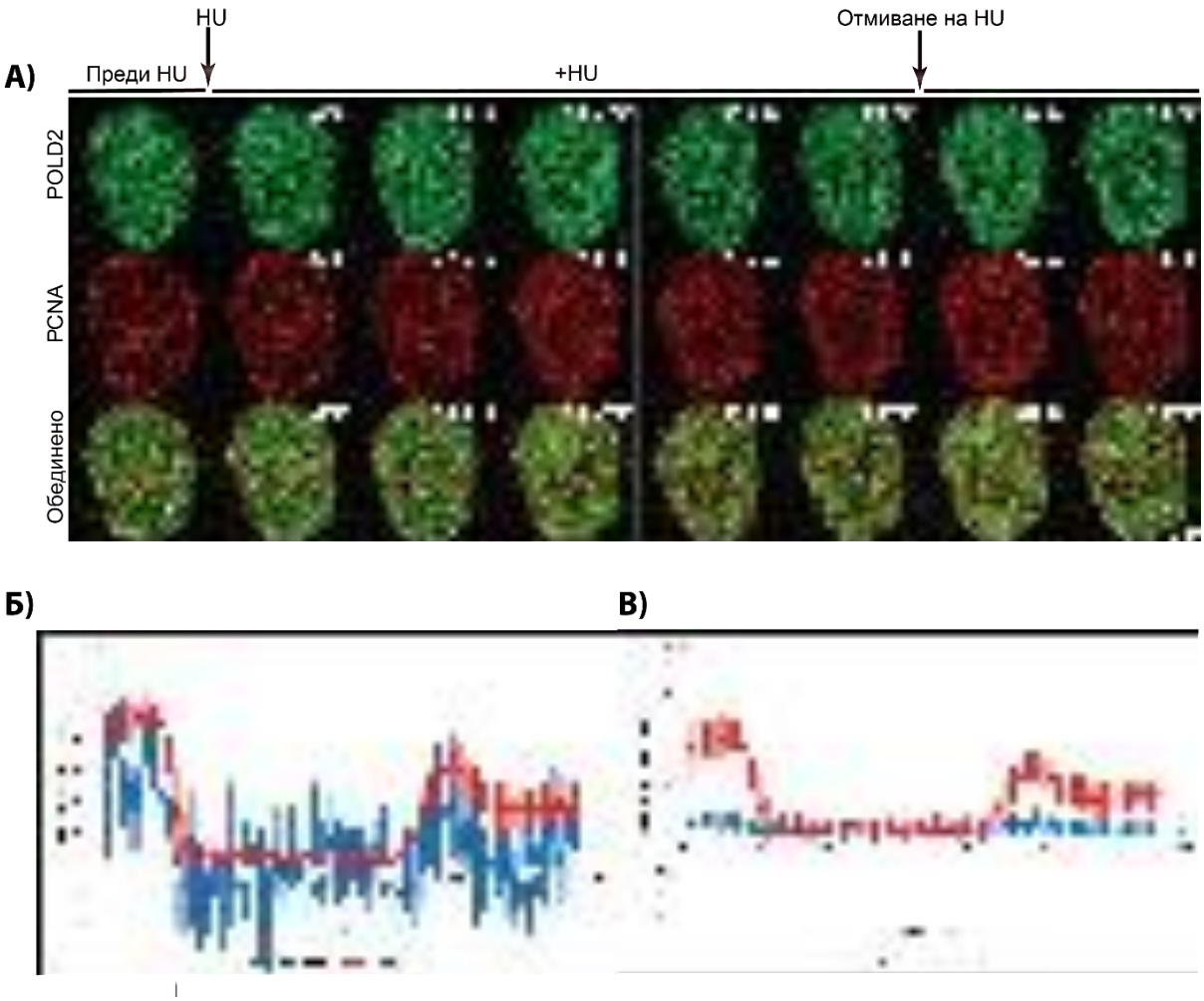
4.4. PCNA и POLD2 в присъствие и отсъствие на ATR инхибитор

Изследвана беше и кинетиката на натрупване и премахване при спиране и рестарт на репликационната вилка след третиране с HU на флуоресцентно белязан белтък POLD2 в двойна клетъчна линия HeLa Kyoto експресираща и флуоресцентно белязан PCNA. Нашите резултати показаха че при спиране на репликационната вилка с HU POLD2 се премахва заедно с PCNA. При премахване на HU, POLD2 се възстановява на рестартираната вилка заедно с PCNA (Фигура 28). При експеримент проведен в присъствие на ATR инхибитор AZD6738 след спиране на репликационната вилка след третиране с HU заедно с намаляване на фокусите на PCNA започва да се натрупват фокуси на POLD2 (Фигура 29). Това може да се дължина на случайна синтеза поради наличието на големи едноверижни участъци. Друга възможна причина е и появата на двойноверижни скъсвания, в поправката на който POLD2 може да взима участие.

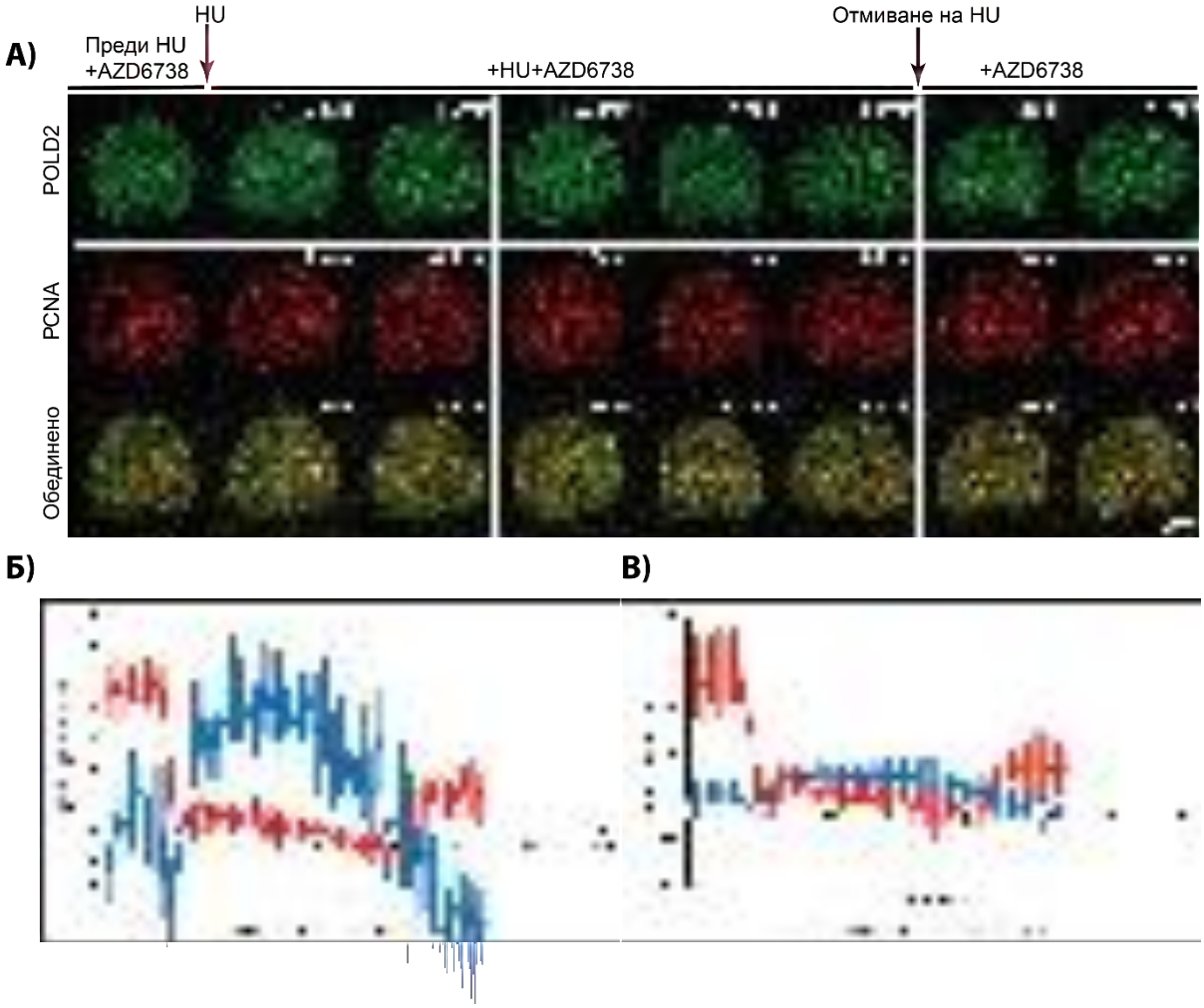
4.5. PAXIP - резултати от експерименти с микрооблъчване

При извършените до тук експерименти не се наблюдава добре ролята на ATM. Ролята на ATM е по-значителна при по-сериозни повреди. За това бяха извършени експерименти с цел изследване на ролята на ATM при наличието на по-сериозни повреди, а именно комплексни ДНК увреждания индуцирани с UV лазер. Може ли да детектираме влиянието на ATM върху натрупването на белтъците? Това наблюдавахме при PAXIP. Проведен беше експеримент с цел установяването на кинетиката на натрупване и премахване на белтъка PAXIP на местата на комплексни ДНК увреждания индуцирани с UV лазер в присъствие и отсъствие на ATM инхибитора KU55933. PAXIP представлява ядрен белтък с роля в отговора на повреди в ДНК и регулацията на генната експресия. Той се натрупва на местата на двойноверижни скъсвания, където инхибира резекцията. При свързването на 53BP1 към хроматина, той се фосфорилира от ATM, което води до натрупването на PAXIP. Изследвана беше зависимостта на натрупването на PAXIP от фосфорилирането на 53BP1 от ATM. За тази цел беше използван ATM инхибитора KU55933. Измерена беше кинетиките на натрупване и премахване на PAXIP в местата на комплексни ДНК увреждания в присъствието и отсъствието на KU55933 (Фигура 30).

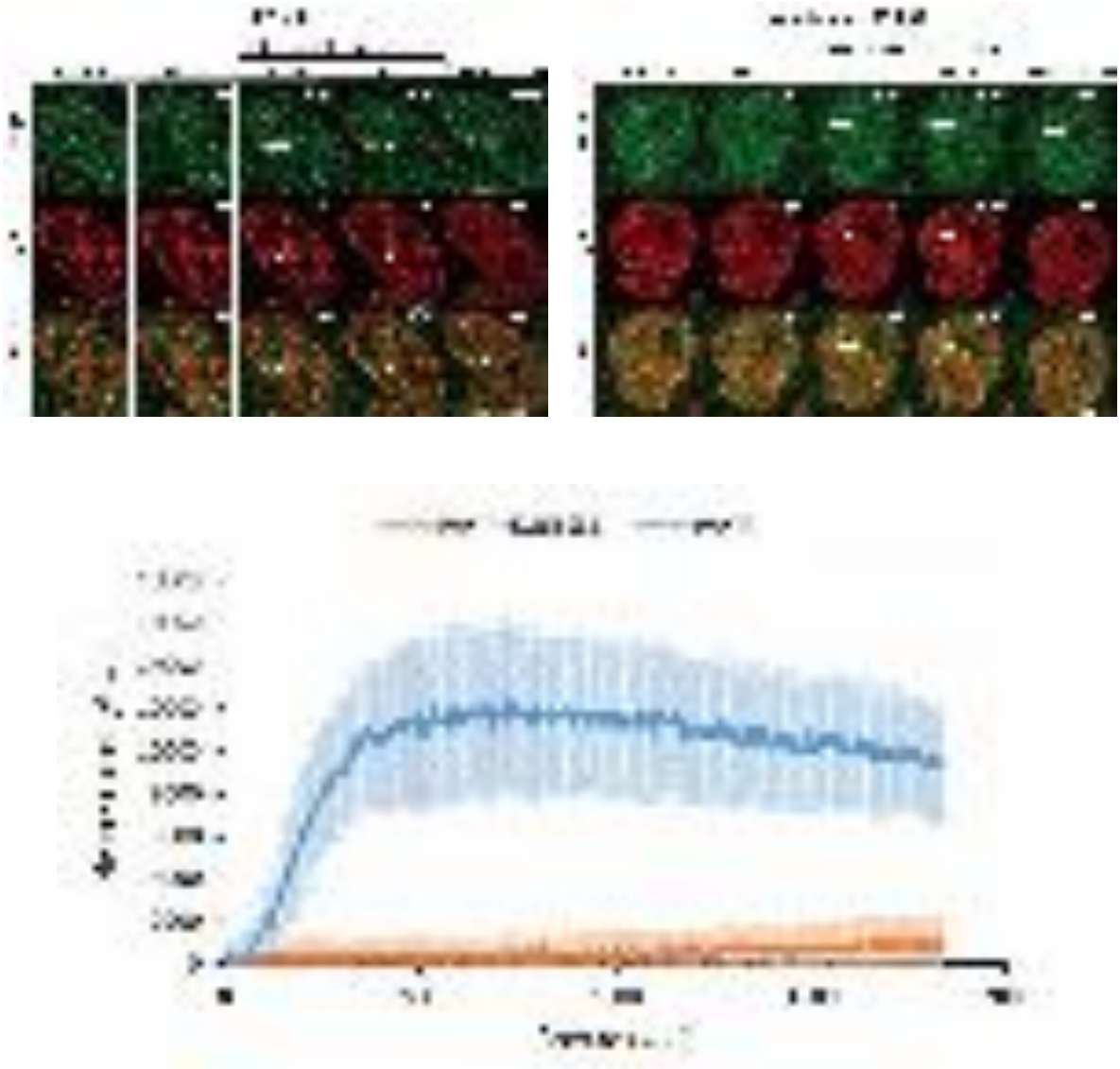
Наблюдавано беше натрупване на PAXIP и PCNA на местата на индуцираните с микроирадиация комплексни ДНК увреждания. В присъствие на ATM инхибитора KU55933 обаче не беше наблюдавано никакво натрупване на PAXIP, докато нивата на PCNA остават същите. Това подсказва, че инхибирането на ATM е причината за липсата на PAXIP на местата на комплексни увреждания. Според литературните данни (Gong et al., 2009) за натрупването на PAXIP на местата на ДНК увреждане се изисква RNF8/UBC13 зависимо убиквитинилиране. Това обаче се случва след активацията на ATM по време на поправката на ДНК и не изключва пълната зависимост на PAXIP от каталитичната активност на ATM, което наблюдаваме в нашите експерименти.



Фигура 28: Кинетика на натрупване и премахване на POLD2 и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците POLD2 и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците POLD2 и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро.



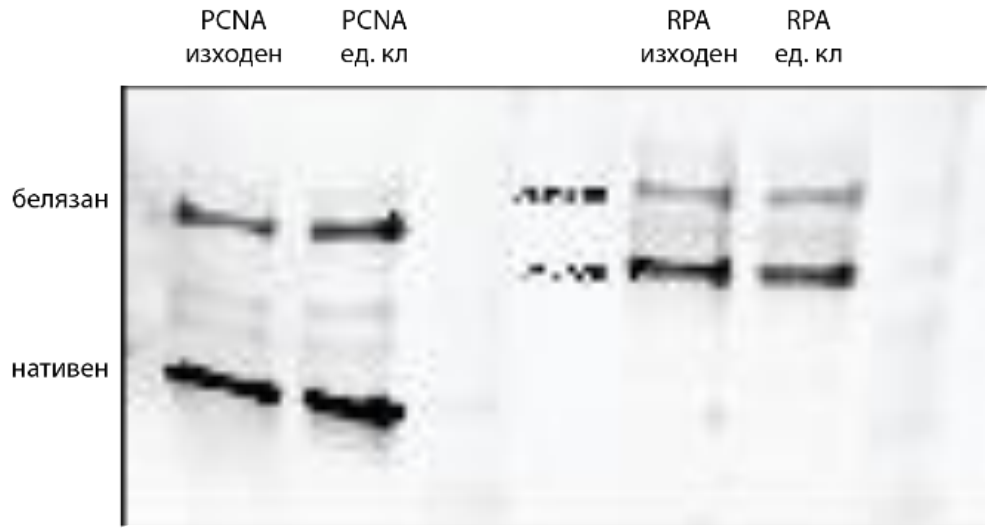
Фигура 29: Кинетика на натрупване и премахване на POLD2 и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto при спиране и рестарт на репликационната вилка в следствие на третиране с HU в присъствие на ATR инхибитора AZD6738. (А) Монтаж на представителни кадри от time-lapse микроскопски експерименти. (Б) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците POLD2 и PCNA при нормализация до максималното наблюдавано количество белтък във фокусите на репликация. (В) Измерена кинетика на натрупване и премахване на белтъците POLD2 и PCNA при нормализация до тоталното количество белтък в клетъчното ядро.



Фигура 30: Резултати от time-lapse микроскопски експеримент с микрооблъчване с UV лазер на клетъчна линия HeLa Kyoto коекспресираща флуоресцентно белязан PAXIP и PCNA в отсъствие и присъствие на ATM инхибитора KU55933.

4.6. Резултати от имуноблот анализ (western blot) на RPA и PCNA

Проведен беше имуноблотен анализ за верификация на количеството белтък белязано с EGFP или mCherry отнесено към нативния такъв. За целта беше използвана SDS-полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE). Експеримента беше извършен с проби от изходните и от получените от единични клетки клетъчни линии. Сравнена беше концентрацията на нативната форма на белтъците и трансгенните белтъци. Беше измерено, че нивата на RPA-EGFP са 1:3 спрямо ендогенните нива на RPA, докато нивата на mPCNA-mCherry са приблизително 1:4.2 спрямо ендогенните нива на PCNA. При изходните клетъчни линии това отношение беше измерено за RPA 1: 2.8, а за PCNA 1: 4.2 (Фигура 31). Разликата се дължи на наличието на нетрансфектирани клетки в изходните линии, които експресират само нативния белтък.



Фигура 31: Имуноблотен анализ на RPA и PCNA в клетъчна линия HeLa Kyoto. Изображение на резултатите от имуноблотния анализ.

5. Дискусия

Time-lapse микроскопията на живи клетки е незаменимо средство за изучаването на ДНК поправката и геномната стабилност, тъй като натрупването на различни фактори на поправката може да бъде визуализирано чрез сливането им с флуоресцентни молекули, което позволява тяхното наблюдение във времето. Сериозна пречка обаче е анализът на такъв вид микроскопски изображения, което подсилва нуждата от софтуер притежаващ всички стъпки за обработка и анализ на подобни изображения. Уверени сме, че разработката на CellTool допринася до голяма степен за решението на този проблем като осигурява стандартизиран подход за анализ на изображения получени вследствие от микроирадиция и FRAP, две основни техники за разкриване на процесите на клетъчния отговор на повреди в ДНК. Възможностите му не са ограничени до там, доказателство за това е и разработения от нас протокол за измерване на естествени фокуси на белтъци участващи в репликацията на ДНК, които се разглеждат в рамките на този дисертационен труд.

Лекотата, с която се анализират изображенията при тези три подхода поставя CellTool сред най-добрите платформи и го прави отличен избор за всеки учен изучаващ, с помощта на микроскопия, процеси свързани с геномната стабилност. Допълнителни функционалности отвъд извършените по темата на този дисертационен труд са дискутирани в инструкциите за употреба на програмата.

Нашият екип приложи възможностите на CellTool и за изучаването на кинетиките на натрупване и дисоциация на местата на комплексни ДНК увреждания, индуцирани с UV радиация на повече от 70 белтъка, участващи в поправката на ДНК (Aleksandrov et al., 2018). Програмата позволи удобното и бързо измерване на формирането и разпадането на фокусите на поправка. Чрез CRC математическото моделиране интегрирано в програмата успяхме да получим полувремената на натрупване и дисоциация на белтъците, като по този начин успешно сравнихме и резултатите в присъствието и отсъствието на инхибитора на PARP - BMN673. Освен това, моделирането дава важна информация за механизмите, по които определени фактори на поправката се натрупват и дисоциират на местата на увреждане.

Преимуществото на микроирадиацията, индуцирана с UV радиация е, че може да се извърши в точно определен момент от време, което дава възможност за времеви анализ на последващите процеси на поправка. Повреди индуцирани чрез други средства

като генотоксична терапия или инхибитори на клетъчния отговор на повреди в ДНК (DNA damage response - DDR) също могат да се изучават с помощта на CellTool стига получените фокуси, в резултат на увреждания да могат да се сегментира и проследят във времето, т.е. когато се наблюдава промяна в интензитета на сигнала. Множество фактори на поправката образуват естествени фокуси при нормални условия, без индуциране на повреди, те също могат да се проследят с помощта на програмата във времето. Такъв е случаят и с редица репликационни белтъци, каквито се изследват в рамките на този дисертационен труд, както и транскрипционни белтъци, което увеличава приложението на CellTool отвъд поправката на ДНК. Важно е да се отбележи, че програмата има възможност да се разшири, ако има стъпка, която може да се добави за процесиране на информацията, тя би могла да се включи като се напише на програмният език C#, и да бъде свързана като plug-in и използвана без проблем. Към момента CellTool се поддържа на две операционни системи - Windows и Linux.

В настоящия труд е използван подход за наблюдение на живи клетки за изучаването на динамиката на PCNA и RPA1 по време на спирането и последващото рестартиране на репликационната вилка в единични клетки в реално време. Нашите резултати дават с точност времената и скоростите на значими молекулярни процеси при наличието на репликационен стрес, в частност премахването на PCNA и генерирането на едноверижна ДНК. Освен това, в този дисертационен труд е категоризирано и как нарушенията в интра-S-фазения контролен пункт, както и нарушенията в активността на ключови фактори от сигнализацията за повреди в ДНК повлияват кинетиките на гореспоменатите белтъци.

Нашите резултати показват, че по-голямата част от PCNA (80-90%) свързан в репликационните фокуси се премахва в резултат от третиране с HU. Количеството на PCNA във вилката зависи от натрупването му на водещата и изоставащата вериги от RFC комплекса, както и премахването му от ATAD5-RLC при завършване на синтезата на ДНК (Kang et al., 2024). Следователно, премахването на PCNA, което ние наблюдаваме би могло да се отдаде на намаляване на натрупването на PCNA в следствие на изчерпване на нуклеотидния резерв и постоянното премахване на вече свързания PCNA след завършването на синтезата на изоставащата верига. Малката фракция от PCNA, която остава в репликационните сайтове е възможно да участва в продължаващ остатъчен синтез на ДНК.

Кинетиката на RPA в условия на изчерпване на нуклеотидния резерв разкрива, че независимо от наличието на активен интра-S-фазен контролен пункт, постепенното натрупване на RPA продължава до 90 минути. Преобладаващата хипотеза е, че натрупването на RPA върху едноверижната ДНК активира ATR, което води до фосфорилирането на реплизомните компоненти, включително Claspin, RPA и MCM субединиците, което ограничава разсукването на ДНК, за да предотврати по-нататъшно натрупване на едноверижна ДНК и изчерпване на RPA (Saldivar et al., 2017; Toledo et al., 2013). Нашите резултати показват, че докато ATR забавя скоростта на натрупване на едноверижна ДНК около девет пъти, количеството RPA натрупано при репликационните вилки след 1 час се увеличава два пъти. Но резултата е много различен в условия на ATR инхибитор, едноверижната ДНК остава налична и в G2 фаза, което води до митотична катастрофа, за разлика от гладкото протичане на клетъчния цикъл, което се наблюдава при клетки в отсъствие на ATR инхибитор. Инхибирането на MRE11 екзонуклеазната активност не демонстрира ефект върху натрупването на RPA1, което съвпада с BRCA-зависимата защита на вилката срещу MRE11 индуцирана деградация на веригата (Ray Chaudhuri et al., 2016). Следователно бихме могли да отдадем бързото и мащабно натрупване на RPA1 в условия на ATR инхибитор на *uncoupling* на развиването и синтезата на ДНК (Byun et al., 2005; Nedelcheva-Veleva et al., 2006; Nedelcheva et al., 2005). Резултатите ни демонстрират, че докато ATR-зависимия интра-S-фазен контролен пункт сериозно забавя разсукването, той не предотвратява значителното натрупване на едноверижна ДНК във времето. Тези скорости бяха сравнени със скоростта на генериране на едноверижна ДНК, която беше определена на базата на натрупването на RPA1 в условия на нуклеотиден глад. Когато ATR киназата е инхибирана, едноверижна ДНК се генерира със скорост от 290 нуклеотида (нт) в минута (4.8 нт в сек.). Като се вземе предвид това, че едноверижната ДНК се генерира от двете вериги ДНК, разсукването на ДНК е два пъти по-бавно, а именно, 2.4 базови двойки (бд) в сек. Интересното е, че тази стойност е много близка до скоростта на разсукване на единични молекули *in vitro*, за *Drosophila melanogaster* Cdc45/Mcm2–7/GINS (CMG) хеликазата при 6.1бд в сек.(Burnham et al., 2019; Kose et al., 2020) и 5-10 бд в сек. за дрождевия GMC (Wasserman et al., 2019). Близките скорости на *in vitro* разсукване и генерирането на едноверижна ДНК *in vivo*, в условия на ATR инхибитор, са в подкрепа на uncoupling като движеща сила за натрупването на RPA1.

Докато нашите открития не изключват обръщане посоката на вилката (fork reversal), продължителното генериране на едноверижна ДНК по време на едночасовото спиране на вилката трудно може да се съгласува със структурите при обръщане посоката на вилката, което теоретично би трябвало да намали количеството едноверижна ДНК като резултат от появата на повторни процеси на анилинг на веригата.

Възползвайки се от времевата резолюция подсигурена от нашата система, ние потърсихме приноса и на ATM при спирането на репликационната вилка и нейния рестарт в условия на нуклеотиден глад. Докато инхибирането на ATM не демонстрира ефект върху динамиката на PCNA и RPA по време на спиране и рестарт на вилката в условия на активна ATR киназа, ко-инхибирането и на двете кинази ATM и ATR разкри, че ATM до голяма степен предотвратява наличието на едноверижна ДНК след S фаза, когато ATR е инхибиран. На този етап точния механизъм, чрез който ATM потиска образуването на едноверижна ДНК остава неизяснено. Едно правдоподобно обяснение би могло да бъде, че бързото и мащабно разсукване, което се осъществява по време на инхибирането на ATR, води до генерирането на участъци от едноверижна ДНК, които не са предпазени от RPA и съответно са податливи към образуването на двойноверижни скъсвания. ATM-зависимата поправка би могла да допринесе за премахването на тези скъсвания, понижавайки количеството на пост-репликативния RPA.

За да детектираме влиянието на ATM върху натрупването на белтъците участващи във репликационната вилка беше извършен експеримент проследяващ натрупването на PAXIP. Той е ядрен белтък с роля в отговора на повреди в ДНК и регулацията на генната експресия. Прибавянето на инхибитор на ATM драстично намалява натрупването на PAXIP. Той се натрупва на местата на двойноверижни скъсвания на ДНК, където инхибира резекцията. Това показва по-сериозно застъпената роля на ATM в ДНК поправката и демонстрира, че ATM е необходим за натрупването на PAXIP. Наблюдаваното беше натрупване на PAXIP и PCNA на местата на индуцираните с микроирадиация комплексни ДНК увреждания. В присъствие на ATM инхибитора KU55933 не се наблюдава никакво натрупване на PAXIP, докато нивата на PCNA остават същите. Това подсказва, че инхибирането на ATM е причината за липсата на PAXIP на местата на комплексни ДНК увреждания. Според литературните данни за натрупването на PAXIP на местата на ДНК увреждане се изисква RNF8/UBC13 (Gong et al., 2009) зависимо убиквитинилиране. Това обаче се случва след активацията на ATM

по време на поправката на ДНК и не изключва пълната зависимост на PAXIP от каталитичната активност на ATM, което наблюдаваме в нашите експерименти.

Растящ брой проучвания намесват PARP1 в множество аспекти на ДНК репликацията. Доказано е, че PARP1 промотира мутации във фрагментите на Оказаки (Vaitsiankova et al., 2022), лимитира скоростта на вилките (Maya-Mendoza et al., 2018), предотвратява преждевременния рестарт на вилките като регулира RECQL1 (Berti et al., 2013), и отскоро е доказано, че участва в разрешаването на конфликти между транскрипцията и репликацията (Xie et al., 2015; Young et al., 2015), чрез взаимодействието си с белтъка Timeless (Petropoulos et al., 2024). Динамиката на PCNA и RPA1 в условия на индуцирано в резултат на изчерпване на нуклеотиди спиране на вилката и последващия й рестарт не се повлияват от инхибирането на PARP1/2 с потентния инхибитор talazoparib (BMN673). Въпреки това, инхибирането на PARP1/2 и коинхибирането само с ATR, в нашите експерименти доведоха до забавяне на бързото натрупване на RPA1 при спрели репликационни вилки, като не демонстрираха влияние върху динамиката на PCNA и RPA1 при рестартиране на вилката. Дали това би могло да се дължи на инхибирането на каталитичната активност или на обширно задържане на PARP1, остава неизяснено. Докато механизмът лежащ в основата на по-бавното натрупване на RPA1 оставя неясен, едно възможно обяснение би могло да бъде, че задържането на молекулите на PARP1 може да доведе до забавянето на несвързаните хеликази.

В заключение настоящия труд предлага подробен поглед в динамиката на спрелите репликационни вилки и техния рестарт в условията на нуклеотиден глад. Предложеният метод за наблюдение на процесите директно в живи клетки, комбиниран с модернистичен подход за анализ на изображенията позволи ясното разграничаване на двете фази на спиране на вилките. Първо е дисоциацията на по-голямата част от молекулите на PCNA от реплизомата, което отразява резкия спад в синтезата на ДНК. Като това е последвано от постепенното увеличаване на количеството едноверижна ДНК, покрита от RPA независимо от наличието на активен интра-S-фазен контролен пункт и независимо от екзонуклеазната активност на MRE11. Инхибирането на ATR киназата драстично увеличава скоростта на генериране на едноверижна ДНК, което е в съответствие с предишни *in vitro* измервания на разсукването на ДНК от еукариотните репликативни хеликази. Основната сила на предложения от нас метод е, че той позволи да бъдат проследени спирането и последващия рестарт на вилките в едни и същи

репликационни региони в единични клетки. Околичествяването на скоростите на индуцираното с HU премахване на RPA1 по време на рестарта на вилките разкри, че не съществуват разлики в скоростите на премахване на RPA1 в условия на присъствие или отсъствие на инхибитори на ATR и/или ATM киназите. Получените от нас резултати предполагат, че ATR, но не и ATM, е необходим за премахването на едноверижната ДНК, генерирана по време на индуцирания с хидроксиурея репликационен стрес. Въпреки това, едновременното инхибиране на ATR и ATM киназите, разкри, че в отсъствието на ATR, ATM предотвратява натрупването на големи региони едноверижна ДНК при рестарта на вилките. Предложения от нас подход позволява наблюдението на основни процеси при спирането и рестарта на репликационната вилка, в условия на безпрецедентна времева резолюция, което дава възможност за изучаването на ефектите на противоракови агенти, таргетиращи регионите на репликационен стрес.

Широк спектър от методики са намесени и изучаването на отговора срещу репликационен стрес. От една страна, по-класическите методи са дали възможност на изследователите да детектират инкорпорация на нуклеотиди, активацията на фактори срещу репликационен стрес, прогресията на клетъчния цикъл и ДНК повреди. ДНК файбър анализите дават възможност за определянето на скоростта, деградацията и рестарта на вилките. Електронната микроскопия беше използвана за разкриване на структурите при смяната на посоката на вилките. Специализирани методики също са разработени за изучаването на фактори, свързани със новосинтезираща се ДНК, позволявайки прецизен анализ на протеома на вилките по време на репликативен стрес и възстановяването от него.

Понастоящем основната хипотеза е, че репликационните вилки са силно пластични структури. За превенцията на разпадането на вилките и двойноверижните скъсвания в резултат от това, множество различни фактори осъществяват взаимовръзки, които позволяват на вилките да продължат в условия на стрес, чрез рестарт посредством репраимиране или обръщане на посоката на движение на вилките, с или без нуклеолитична обработка. След репраймирането, могат да се инициират механизми за толериране на ДНК повреди, включително транслезионна синтеза (TLS) и смяна на матриците. Разпознаването на стабилността на репликационната вилка като определяща резултата от химиотерапия и PARP инхибитори води до насочването на изследванията към факторите, които изменят динамиката на вилката. В резултат от насочените в тази посока изследвания, са идентифицирани нарастващ брой фактори от поправката на ДНК

на местата на стресирани вилки. А именно RAD51, ZRANB3, SMARCAL1, HLTF и FBH1, които са намесени в обръщането на посоката на вилките. Гени за чувствителност към рак като BRCA1 и BRCA2 както и RIF1, DONSON, mH2A1.2, наред с други вземат участие в предпазването на вилките от деградация на нуклеотидите. Освен това, PARP1, DNA2, WRN и PrimPol са предложени като промотиращи рестарта на вилките. Характеризирането на факторите, които повлияват пластичността на вилките се очаква да разкрие зависимости с развитието на ракови заболявания и съответните терапевтични слабости.

6. Изводи

1. При спиране на репликационната вилка с HU се наблюдава бързо премахване на PCNA и по-бавно натрупване на RPA1, като след отмиването на HU репликацията стартира успешно с премахване на RPA1 и възстановяване на PCNA.
2. При спиране на репликационната вилка с HU в присъствието на ATR инхибитор се наблюдава по-бързо натрупване на RPA и силно намаляване на несвързания RPA. При рестарт на репликацията се наблюдава остатъчно количество на RPA1 демонстриращо непълното възстановяване на всички вилки.
3. При спиране на репликационната вилка в присъствието само на ATM инхибитор не се забелязва значителна разлика, в сравнение с експеримента при активен ATM. При комбинацията на ATM и ATR киназните инхибитори, се стига до по-бързото натрупване и изчерпване на RPA1, като при рестарт на репликацията повечето RPA1 остава на вилките, показвайки, че те не се възстановяват.
4. Инхибирането на MRE11 зависимата резекция или на PARP1 зависимото парелиране не променя динамиката на RPA и PCNA при спиране и рестарт на репликационна вилка, както при активна, така и при инхибирана ATR киназна активност.
5. При спиране на репликационната вилка с HU POLD2 се премахва от местата на активна репликация, като при рестарт се възстановява. Докато при спиране на репликационната вилка в присъствие на ATR инхибитор се наблюдава вторично натрупване на POLD2.
6. Инхибирането на ATM киназната активност предотвратява натрупването на PAXIP на местата на комплексни ДНК увреждания.

7. Приноси на дисертационния труд

1. Разработена бе методология за измерване и изследване на динамиката на белтъци участващи в ДНК репликацията при спиране и рестарт на репликационната вилка с висока времева разделителна способност.
2. Измерена бе динамиката на RPA1, PCNA и POLD2 при спиране и рестарт на репликационната вилка в условията на активен и инхибиран S-фазен контролен пункт.

8. Използвана литература

1. Aleksandrov, R., Dotchev, A., Poser, I., Krastev, D., Georgiev, G., Panova, G., Babukov, Y., Danovski, G., Dyankova, T., Hubatsch, L.*, et al.* (2018). Protein Dynamics in Complex DNA Lesions. Mol Cell *69*, 1046-1061 e1045.
2. Berti, M., Ray Chaudhuri, A., Thangavel, S., Gomathinayagam, S., Kenig, S., Vujanovic, M., Odreman, F., Glatter, T., Graziano, S., Mendoza-Maldonado, R.*, et al.* (2013). Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. Nat Struct Mol Biol *20*, 347-354.
3. Bester, A.C., Roniger, M., Oren, Y.S., Im, M.M., Sarni, D., Chaoat, M., Bensimon, A., Zamir, G., Shewach, D.S., and Kerem, B. (2011). Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. Cell *145*, 435-446.
4. Blackwell, L.J., Borowiec, J.A., and Mastrangelo, I.A. (1996). Single-stranded-DNA binding alters human replication protein A structure and facilitates interaction with DNA-dependent protein kinase. Mol Cell Biol *16*, 4798-4807.
5. Brown, E.J., and Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. Genes Dev *14*, 397-402.
6. Bryant, H.E., Petermann, E., Schultz, N., Jemth, A.S., Loseva, O., Issaeva, N., Johansson, F., Fernandez, S., McGlynn, P., and Helleday, T. (2009). PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. Embo j *28*, 2601-2615.
7. Burnham, D.R., Kose, H.B., Hoyle, R.B., and Yardimci, H. (2019). The mechanism of DNA unwinding by the eukaryotic replicative helicase. Nat Commun *10*, 2159.
8. Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M.C., Walter, J.C., and Cimprich, K.A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. Genes Dev *19*, 1040-1052.
9. Chen, R., and Wold, M.S. (2014). Replication protein A: single-stranded DNA's first responder: dynamic DNA-interactions allow replication protein A to direct single-strand DNA intermediates into different pathways for synthesis or repair. Bioessays *36*, 1156-1161.
10. Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. Science *294*, 1713-1716.
11. da Costa, A., Chowdhury, D., Shapiro, G.I., D'Andrea, A.D., and Konstantinopoulos, P.A. (2023). Targeting replication stress in cancer therapy. Nat Rev Drug Discov *22*, 38-58.
12. Danovski, G., Dyankova-Danovska, T., Stamatov, R., Aleksandrov, R., Kanev, P.-B., and Stoynov, S. (2023). CellTool: An Open-Source Software Combining Bio-Image Analysis and Mathematical Modeling for the Study of DNA Repair Dynamics. International Journal of Molecular Sciences *24*, 16784.
13. de Klein, A., Muijtjens, M., van Os, R., Verhoeven, Y., Smit, B., Carr, A.M., Lehmann, A.R., and Hoeijmakers, J.H. (2000). Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. Curr Biol *10*, 479-482.
14. Dungrawala, H., Rose, K.L., Bhat, K.P., Mohni, K.N., Glick, G.G., Couch, F.B., and Cortez, D. (2015). The Replication Checkpoint Prevents Two Types of Fork Collapse without Regulating Replisome Stability. Mol Cell *59*, 998-1010.
15. Dupré, A., Boyer-Chatenet, L., Sattler, R.M., Modi, A.P., Lee, J.H., Nicolette, M.L., Kopelovich, L., Jasin, M., Baer, R., Paull, T.T.*, et al.* (2008). A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. Nat Chem Biol *4*, 119-125.
16. Fanning, E., Klimovich, V., and Nager, A.R. (2006). A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. Nucleic Acids Res *34*, 4126-4137.

17. Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P., and Méchali, M. (2015). DNA replication origin activation in space and time. Nat Rev Mol Cell Biol *16*, 360-374.
18. Gaillard, H., García-Muse, T., and Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. Nat Rev Cancer *15*, 276-289.
19. Gomes, X.V., Henricksen, L.A., and Wold, M.S. (1996). Proteolytic mapping of human replication protein A: evidence for multiple structural domains and a conformational change upon interaction with single-stranded DNA. Biochemistry *35*, 5586-5595.
20. Gong, Z., Cho, Y.W., Kim, J.E., Ge, K., and Chen, J. (2009). Accumulation of Pax2 transactivation domain interaction protein (PTIP) at sites of DNA breaks via RNF8-dependent pathway is required for cell survival after DNA damage. J Biol Chem *284*, 7284-7293.
21. Hein, M.Y., Hubner, N.C., Poser, I., Cox, J., Nagaraj, N., Toyoda, Y., Gak, I.A., Weisswange, I., Mansfeld, J., Buchholz, F., *et al.* (2015). A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances. Cell *163*, 712-723.
22. Hickson, I., Zhao, Y., Richardson, C.J., Green, S.J., Martin, N.M., Orr, A.I., Reaper, P.M., Jackson, S.P., Curtin, N.J., and Smith, G.C. (2004). Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. Cancer Res *64*, 9152-9159.
23. Kang, S., Yoo, J., and Myung, K. (2024). PCNA cycling dynamics during DNA replication and repair in mammals. Trends Genet *40*, 526-539.
24. Kim, C., Snyder, R.O., and Wold, M.S. (1992). Binding properties of replication protein A from human and yeast cells. Mol Cell Biol *12*, 3050-3059.
25. Kose, H.B., Xie, S., Cameron, G., Strycharska, M.S., and Yardimci, H. (2020). Duplex DNA engagement and RPA oppositely regulate the DNA-unwinding rate of CMG helicase. Nat Commun *11*, 3713.
26. Kotsantis, P., Petermann, E., and Boulton, S.J. (2018). Mechanisms of Oncogene-Induced Replication Stress: Jigsaw Falling into Place. Cancer Discov *8*, 537-555.
27. Maréchal, A., and Zou, L. (2015). RPA-coated single-stranded DNA as a platform for post-translational modifications in the DNA damage response. Cell Res *25*, 9-23.
28. Maya-Mendoza, A., Moudry, P., Merchut-Maya, J.M., Lee, M., Strauss, R., and Bartek, J. (2018). High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability. Nature *559*, 279-284.
29. Mijic, S., Zellweger, R., Chappidi, N., Berti, M., Jacobs, K., Mutreja, K., Ursich, S., Ray Chaudhuri, A., Nussenzweig, A., Janscak, P., *et al.* (2017). Replication fork reversal triggers fork degradation in BRCA2-defective cells. Nat Commun *8*, 859.
30. Nakamura, K., Kustatscher, G., Alabert, C., Hödl, M., Forne, I., Völker-Albert, M., Satpathy, S., Beyer, T.E., Mailand, N., Choudhary, C., *et al.* (2021). Proteome dynamics at broken replication forks reveal a distinct ATM-directed repair response suppressing DNA double-strand break ubiquitination. Mol Cell *81*, 1084-1099.e1086.
31. Nedelcheva-Veleva, M.N., Krastev, D.B., and Stoynov, S.S. (2006). Coordination of DNA synthesis and replicative unwinding by the S-phase checkpoint pathways. Nucleic Acids Res *34*, 4138-4146.
32. Nedelcheva, M.N., Roguev, A., Dolapchiev, L.B., Shevchenko, A., Taskov, H.B., Shevchenko, A., Stewart, A.F., and Stoynov, S.S. (2005). Uncoupling of unwinding from DNA synthesis implies regulation of MCM helicase by Tof1/Mrc1/Csm3 checkpoint complex. J Mol Biol *347*, 509-521.
33. O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V.L., Woods, C.G., Jeggo, P.A., and Goodship, J.A. (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. Nat Genet *33*, 497-501.

34. Pasero, P., and Vindigni, A. (2017). Nucleases Acting at Stalled Forks: How to Reboot the Replication Program with a Few Shortcuts. Annu Rev Genet *51*, 477-499.
35. Pavani, R., Tripathi, V., Vrtis, K.B., Zong, D., Chari, R., Callen, E., Pankajam, A.V., Zhen, G., Matos-Rodrigues, G., Yang, J.*, et al.* (2024). Structure and repair of replication-coupled DNA breaks. Science *385*, eado3867.
36. Petropoulos, M., Karamichali, A., Rossetti, G.G., Freudenmann, A., Iacovino, L.G., Dionellis, V.S., Sotiriou, S.K., and Halazonetis, T.D. (2024). Transcription-replication conflicts underlie sensitivity to PARP inhibitors. Nature *628*, 433-441.
37. Poser, I., Sarov, M., Hutchins, J.R., Heriche, J.K., Toyoda, Y., Pozniakovsky, A., Weigl, D., Nitzsche, A., Hegemann, B., Bird, A.W.*, et al.* (2008a). BAC TransgeneOmics: a high-throughput method for exploration of protein function in mammals. Nat Methods *5*, 409-415.
38. Poser, I., Sarov, M., Hutchins, J.R., Hériché, J.K., Toyoda, Y., Pozniakovsky, A., Weigl, D., Nitzsche, A., Hegemann, B., Bird, A.W.*, et al.* (2008b). BAC TransgeneOmics: a high-throughput method for exploration of protein function in mammals. Nat Methods *5*, 409-415.
39. Ray Chaudhuri, A., Callen, E., Ding, X., Gogola, E., Duarte, A.A., Lee, J.E., Wong, N., Lafarga, V., Calvo, J.A., Panzarino, N.J.*, et al.* (2016). Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. Nature *535*, 382-387.
40. Rivard, R.S., Chang, Y.C., Ragland, R.L., Thu, Y.M., Kassab, M., Mandal, R.S., Van Riper, S.K., Kulej, K., Higgins, L., Markowski, T.M.*, et al.* (2024). Improved detection of DNA replication fork-associated proteins. Cell Rep *43*, 114178.
41. Saldivar, J.C., Cortez, D., and Cimprich, K.A. (2017). The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome. Nat Rev Mol Cell Biol *18*, 622-636.
42. Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., and Jasin, M. (2011). Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. Cell *145*, 529-542.
43. Sirbu, B.M., McDonald, W.H., Dungrawala, H., Badu-Nkansah, A., Kavanaugh, G.M., Chen, Y., Tabb, D.L., and Cortez, D. (2013). Identification of proteins at active, stalled, and collapsed replication forks using isolation of proteins on nascent DNA (iPOND) coupled with mass spectrometry. J Biol Chem *288*, 31458-31467.
44. Sogo, J.M., Lopes, M., and Foiani, M. (2002). Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. Science *297*, 599-602.
45. Técher, H., Koundrioukoff, S., Nicolas, A., and Debatisse, M. (2017). The impact of replication stress on replication dynamics and DNA damage in vertebrate cells. Nat Rev Genet *18*, 535-550.
46. Toledo, L.I., Altmeyer, M., Rask, M.B., Lukas, C., Larsen, D.H., Povlsen, L.K., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Bartek, J., and Lukas, J. (2013). ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. Cell *155*, 1088-1103.
47. Tubbs, A., Sridharan, S., van Wietmarschen, N., Maman, Y., Callen, E., Stanlie, A., Wu, W., Wu, X., Day, A., Wong, N.*, et al.* (2018). Dual Roles of Poly(dA:dT) Tracts in Replication Initiation and Fork Collapse. Cell *174*, 1127-1142.e1119.
48. Vaitsiankova, A., Burdova, K., Sobol, M., Gautam, A., Benada, O., Hanzlikova, H., and Caldecott, K.W. (2022). PARP inhibition impedes the maturation of nascent DNA strands during DNA replication. Nat Struct Mol Biol *29*, 329-338.
49. van den Berg, J., van Batenburg, V., Geisenberger, C., Tjeerdsma, R.B., de Jaime-Soguero, A., Acebrón, S.P., van Vugt, M., and van Oudenaarden, A. (2024). Quantifying DNA replication speeds in single cells by scEdU-seq. Nat Methods *21*, 1175-1184.

50. Vendetti, F.P., Lau, A., Schamus, S., Conrads, T.P., O'Connor, M.J., and Bakkenist, C.J. (2015). The orally active and bioavailable ATR kinase inhibitor AZD6738 potentiates the anti-tumor effects of cisplatin to resolve ATM-deficient non-small cell lung cancer in vivo. Oncotarget *6*, 44289-44305.
51. Wasserman, M.R., Schauer, G.D., O'Donnell, M.E., and Liu, S. (2019). Replication Fork Activation Is Enabled by a Single-Stranded DNA Gate in CMG Helicase. Cell *178*, 600-611.e616.
52. Xie, S., Mortusewicz, O., Ma, H.T., Herr, P., Poon, R.Y., Helleday, T., and Qian, C. (2015). Timeless Interacts with PARP-1 to Promote Homologous Recombination Repair. Mol Cell *60*, 163-176.
53. Young, L.M., Marzio, A., Perez-Duran, P., Reid, D.A., Meredith, D.N., Roberti, D., Star, A., Rothenberg, E., Ueberheide, B., and Pagano, M. (2015). TIMELESS Forms a Complex with PARP1 Distinct from Its Complex with TIPIN and Plays a Role in the DNA Damage Response. Cell Rep *13*, 451-459.
54. Zellweger, R., Dalcher, D., Mutreja, K., Berti, M., Schmid, J.A., Herrador, R., Vindigni, A., and Lopes, M. (2015). Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. J Cell Biol *208*, 563-579.
55. Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. Nat Cell Biol *16*, 2-9.
56. Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J.P., and Stewart, A.F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli. Nat Genet *20*, 123-128.
57. Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. Science *300*, 1542-1548.

Публикации по темата на дисертацията

Dyankova-Danovska T, Danovski G, Uzunova S, Stamatov R,Aleksandrov R, Kanev P-B, Atemin A, Ivanova A, Stoynov S. *In and out of replication stress: PCNA/RPA1-based dynamics of fork stalling and restart at the single-cell level.* **International Journal of Molecular Sciences**. 2024 – изпратено за публикация

Impact Factor: **4.9**

Danovski G, **Dyankova-Danovska T**, Stamatov R, Aleksandrov R, Kanev P-B, Stoynov S. *CellTool: An Open-Source Software Combining Bio-Image Analysis and Mathematical Modeling for the Study of DNA Repair Dynamics*. **International Journal of Molecular Sciences**. 2023; 24(23):16784.

https://doi.org/10.3390/ijms242316784

Impact Factor: **5.6**

Забелязани цитати към 19.02.2024: **7**

Aleksandrov, R, Dotchev, A, Poser, I, Krastev, D, Georgiev, G, Panova, G, Babukov, Y, Danovski, G, **Dyankova, T,** Hubatsch, L, Ivanova, A, Atemin, A, Nedelcheva-Veleva, M, Hasse, S, Sarov, M, Buchholz, F, Hyman, A, Grill, S, Stoynov, S. *Protein Dynamics in Complex DNA Lesions*. **Molecular Cell**, 69, 6, 2018, 1046-1061.

https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.016

Impact Factor: **14.714**

Забелязани цитати към 19.02.2024: **136**

Други публикации

Ishkitiev N, Micheva M, Miteva M, Gaydarova S, Tzachev C, Lozanova V, Lozanov V, Cheshmedzhieva D, Kandinska M, Ilieva S, Gargallo R, Baluschev S, **Dyankova-Danovska T**, Nedelcheva-Veleva M, Landfester K, Vasilev A. *Nanoconfined Chlorine Substituted Monomethine Cyanine Dye with Propionamide Function Based on Thiazole Orange Scaffold – Fluorogenic Probe for Cells Staining and Nucleic Acids Visualization*. **Molecules.** 2024 – прието за публикация.

Impact Factor: **4.2**

Участия в конференции

1. 4-6 Януару 2020 - “The 4th NEUBIAS Conference & Symposium” Бордо, Франция.
2. 12-19 Юли 2019 - “Genome Architecture and Dynamics International Workshop and Summer School”, Варна, България.
3. 8-11 Юли 2019 - “International Physics of Living Systems Network (iPoLS) Annual Meeting”, MPI of Biochemistry, Мюнхен, Германия.
4. 7-8 Март 2019 - “Докторантски симпозиум”, София, България.
5. 31 Януари 2018 - 02 Февруари 2018 - “The 2nd NEUBIAS Conference“, Сегет, Унгария.
6. 15-17 Февруари 2017 - “The 1st NEUBIAS 2020 Conference” Лисабон, Португалия.
7. 16-18 Ноември 2017 - Humboldt Kolleg "Humboldtians and Scientific Progress in the Central and Eastern European (CEE) Countries", София, България.
8. 19-21 Юни 2017 - “18th International Workshop on Combinatorial Image Analysis”, Пловдив, България.
9. 6-7 Април 2017 - “Molecular Biology - New Horizons”, София, България.
10. 6-7 Април 2016 - “Interdisciplinary PhD Forum”, София, България.