Българска Академия на Науките
Институт по Молекулярна Биология
акад. „Румен Цанев“

Лаборатория по Геномна Стабилност

Изучаване динамиката на процеси в живи клетки чрез съвременни микроскопски подходи

АВТОРЕФЕРАТ

на

дисертация за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
по научна специалност „Молекулярна Биология“
на

Александър Сергеев Атемин

Научен ръководител: **доц. Марина Неделчева-Велева**
Научен консултант: **доц. Стойно Стойнов**

София, 2024г.

I. Въведение

COVID-19 (Ковид-19) е заболяване, причинено от SARS-CoV-2 вируса, от което по официални данни, към днешна дата, страдат над 774 милиона души, с над 7 милиона смъртни случаи. Пандемията, официално обявена от Световната здравна организация (WHO-World Health Organization) през януари 2020 г., доведе до тоталния срив както на човешкото ежедневие, така и на световната икономика. Тази световна криза показа, че човешката раса е способна да се справи с подобни кризисни ситуации, но и доказа, че времето за реакция е прекалено бавно и се отплаща с човешки животи.

През последните четири години множество изследвания върху вируса на SARS-CoV-2 подсказаха какъв е жизненият му цикъл. Смята се, че първоначално той се закача за различни клетъчни рецептори, като най-честият е ACE2, но е възможно и други клетъчни рецептори да участват в процеса, като например Neuropili-1, L-SIGN, CD147 и други. Клетките, които експресират тези рецептори, биват заразявани, като това определя и разпространението на вируса в човешкия организъм. Основна роля за закачането на SARS-CoV-2 вируса играе Spike (S) белтъкът му, който е уникален за този вирус. След като се получи разпознаване между S и клетъчния рецептор, е необходимо специфично срязване, което да позволи сливането на мембраните на вируса и клетката гостоприемник. В зависимост от това коя протеаза ще осъществи срязването, се определя дали сливането на мембраните се осъществява на клетъчната повърхност с помощта на TMPRSS2 протеазата на клетката или във везикул с помощта на L-cathepsin.

След като мембраните се слеят, вътре вирусното съдържимо бива освободено в цитоплазмата на клетката гостоприемник и мигновено се започва синтез на вирусни белтъци и вирусни геноми. Получените белтъци преминават през серия автопротеолитични срязвания, които довеждат до формирането на неструктурните белтъци, които са отговорни за синтеза на още вирусни белтъци и формирането на репликационния комплекс на вируса. Този комплекс, от своя страна, започва синтез на нови вирусни геноми, от които се синтезират и структурните белтъци. Новополучените белтъци заедно с вирусния геном и прикрепените към него Nucleocapsid (N) белтъци се самосглобяват във вътреклетъчни мембрани структури в междуклетъчните компартменти между Ендоплазмения ретикулум и апарата на Голджи (ERGIC). След това, посредством екзоцитоза се извеждат от заразената клетка с цел заразяване на нови клетки.

Въпреки че голяма част от жизнения цикъл на вируса е вече изяснена, липсва информация за ключов етап, а именно навлизането на вируса в клетката гостоприемник. Не е изяснен точният и прецизен механизъм на навлизане на вируса, както и неговата динамика и кинетика. Тази информация е от изключително значение за разработването на терапии, както и за определяне на това дали дадено лекарство е ефективно.

Поради тази причина, ние се нагърбихме със задачата да определим точната динамика и кинетика на процеса на навлизане на вируса на SARS-CoV-2 в клетката гостоприемник. Изяснявайки тази информация, ние може да заключим и кой е точният механизъм, който вирусът използва, за да навлезе в клетката гостоприемник.

За да решим тази задача, решихме да проследим индивидуални белязани вирусо-подобни частици (virus-like particles-VLPs), които притежават всички структурни белтъци на вируса заедно с несъществена генетична информация. Тези частици могат да навлизат в клетките гостоприемници като нормални вируси, но не могат да се размножават и да заразяват други клетки след това. За да оценим динамиката и кинетиката на процеса на навлизане в клетката гостоприемник, белязахме различни структурни белтъци на SARS-CoV-2. Белязането на Membrane (M) белтъка с различни флуорофори ни позволява да проследим какво се случва с вирусната мембрана, бележейки N можем да проследим генома на вируса, а в допълнение използвахме флуорофор, чувствителен на pH, за да околичествим и промените в pH във вирусната частица. Използвайки тези белязани частици заедно с наличната в института по молекулярна биология „акад. Румен Цанев“ Andor Dragonfly спининг диск конфокална система с Nikon Eclipse Ti2-E инвертен микроскоп и разработените в лабораторията софтуерни решения (SPARTACUSS), ние проследихме белязаните индивидуални частици и визуализирахме тяхното навлизане в клетките гостоприемници.

В допълнение, тъй като темата на този дисертационен труд е динамика на биологични системи, решихме да изследваме и динамиката на различни репликационно-асоциирани белтъци. За тази цел създадохме двойно белязани клетъчни линии HeLa Kyoto, които експресират белязани с EGFP-ORC1, MCM6, CLASPIN, RIF1 или PCNA, заедно с белязан с mCherry PCNA. С така получените линии, ние проследихме експресията и дистрибуцията на изследваните белтъци, използвайки Nikon Eclipse Ti-E обратен микроскоп като част от Andor Revolution спининг-диск конфокална система, снабдена с Nikon Perfect Focus System (PFS). След многостъпкова нормализация, която ни позволи точния анализ на микроскопските изображения, ние сравнихме получените резултати и установихме с много висока времева резолюция поведението на горепосочените белтъци по време на целия клетъчен цикъ

II. Цел и Задачи

Цел

1. Да се изследва динамиката на процесите, съпътстващи навлизането на SARS-CoV-2 вирусо-подобни частици в клетки-гостоприемници.
2. Да се изследва динамиката на нивата и разпределението в клетката на белтъци, участващи в репликацията на ДНК по време на клетъчния цикъл.

Задачи

1.1. Да се визуализира навлизането и да се проследи движението на SARS-CoV-2 вирусо-подобни частици в клетката.

1.2. Да се измери скоростта в 3D на частиците при навлизане в клетката.

1.3. Да се измери промяната на pH по време на навлизането на SARS-CoV-2 вирусо-подобните частиците.

1.4. Да се измери динамиката на освобождаване на нуклеокапсида от SARS-CoV-2 вирусо-подобните частици при навлизане в клетката.

1.5. Да се измерят промените в скоростта, pH, както и динамиката на освобождаването на нуклеокапсида на варианти на SARS-CoV-2 вирусо-подобните частици.

2.1. Да се определят нивата и разпределението на ORC1, MCM6, CLASPIN, RIF1, PCNA по време на клетъчния цикъл на ниво единична клетка

III. Методи

Клетъчно култивиране, траснфекция при различни клетъчни линии с различни белтъци, инхибиране с различни реагенти, микроскопия на живи обекти за продължителен период от време, разработване на различни софтуерни решения и бази от данни, проследяване и анализ на обекти получени след микроскопско наблюдение.

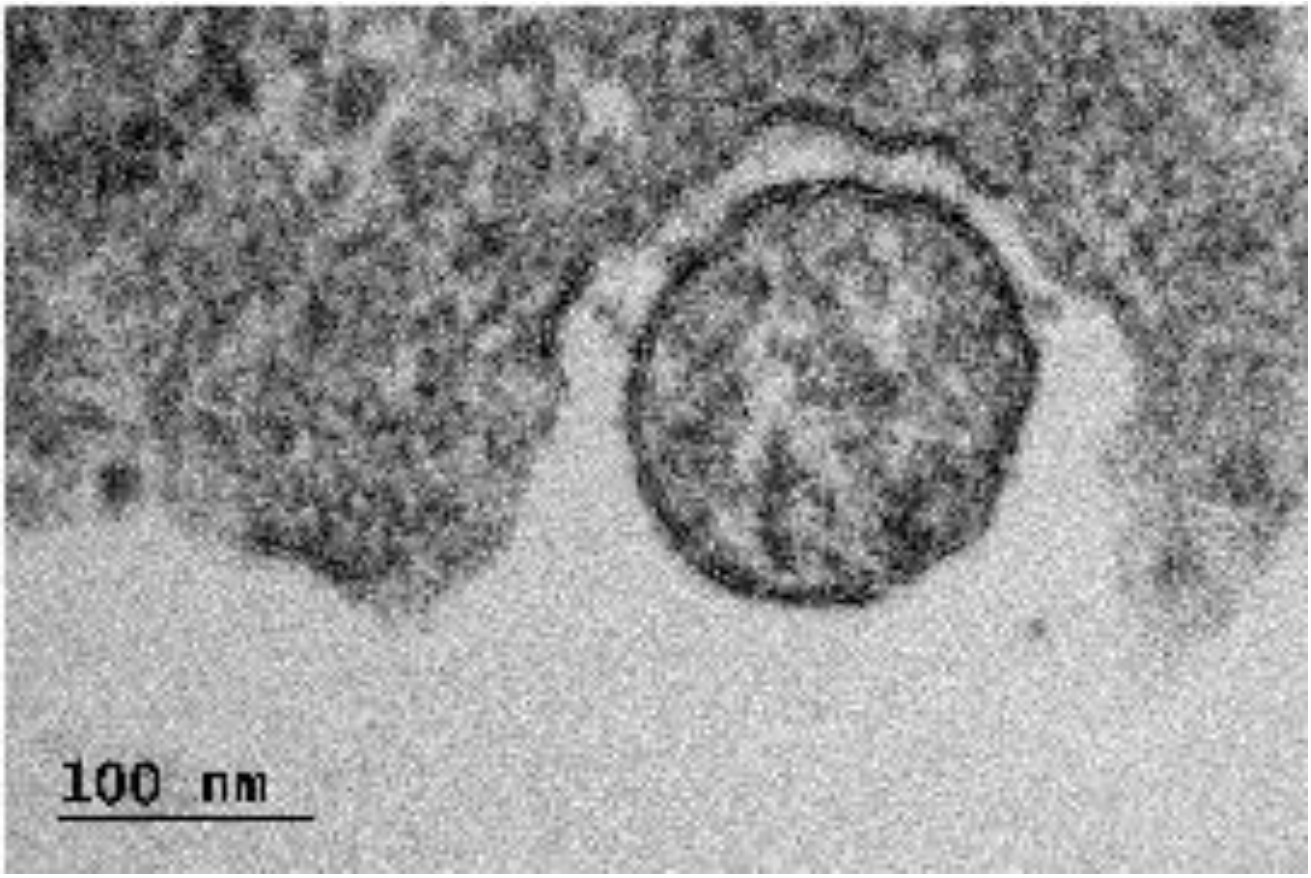
IV. Резултати

1. Динамика на интернализацията на вирусо-подобни частици

1.1. Визуализация на интернализирането на вирусо-подобните частици

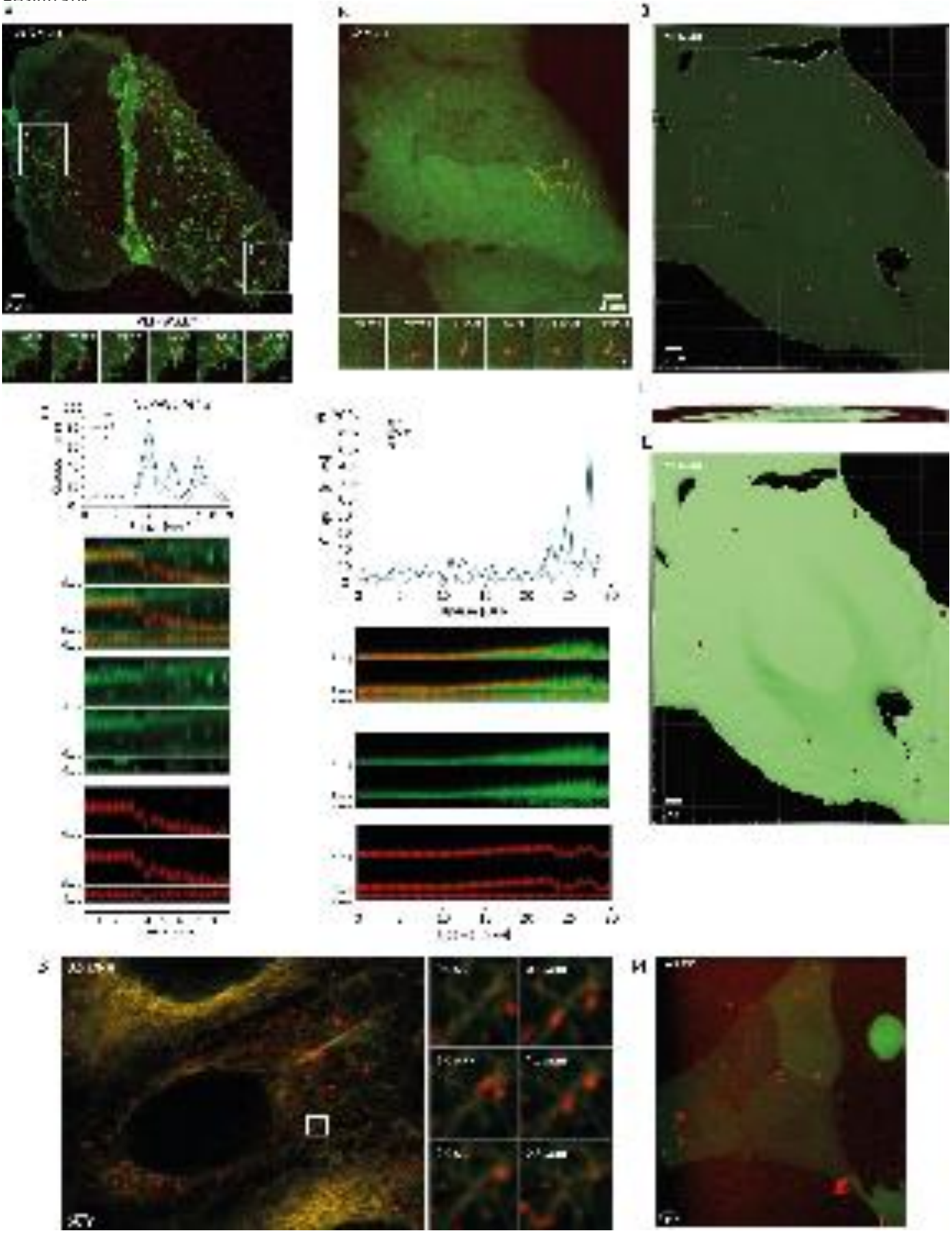
За да изследваме кинетиката на навлизането на SARS-CoV-2 вируса в клетката, използвахме вирусо-подобни частици, продуцирани в HEK293 (човешки ембрионални бъбречни) клетки, които са често използвана система за експресия на различни белтъци [12]. За да се получи максимален добив на частици, клетките свръхекспресират структурните белтъци M, E и S от дивия вариант (Wuhan) на SARS-CoV-2 вируса, които се самосглобяват във функционални вирусо-подобни частици [13]. Тези частици успешно възпроизвеждат естествената интернализация на SARS-CoV-2 вируса [3,14]. Както е при естествения механизъм, вирусът разпознава и се асоциира към клетъчния рецептор посредством S белтъка. Това бе потвърдено посредством TEM (Transmission emission microscopy) микроскопия на тънък срез MLE-12 клетки (Фиг. 1) [1].

[1] *Продукцията на вирусо-подобните частици, както и експериментите с TEM микроскопията са извършени от нашите колаборатори от Университета в Юта, Америка.



Фигура 1. Интернализация на вирусо-подобни частици SARS-CoV-2^{Wu}: (E, S, M) наблюдавани при електронна микроскопия на тънък срез от епител от миши бял дроб (MLE). Единична вирусо-подобна частица може да бъде наблюдавана как е свързана към клетъчната мембрана посредством S белтъка си.

За да покажем в реално време динамичната интернализация, използвахме вирусо-подобни частици, които съдържат белязан с mCherry M белтък, както и не белязан такъв [4]. От този момент в текста тези частици ще се изписват като VLP^{Wu}:M^{Ch}, което е съкратено от (VLP^{Wuhan}:(E, S, M&M-mCherry). С така получените частици, третирахме клетки U2OS (ракови остеосаркомни клетки), които свръхекспресират рецептора ACE2, протеазата TMPRSS2, както и белязан с NeonGreen ACE2 рецептор. В допълнение, наблюдавахме и заснемахме движението им в 3D на всеки 30 секунди, посредством спиниг-диск конфокална микроскопия. Нашите наблюдения показаха, че частиците адхерират към клетъчните мембрани, като потвърдиха, че много често се закачат към филоподите на клетките (Фиг. 2) [15].



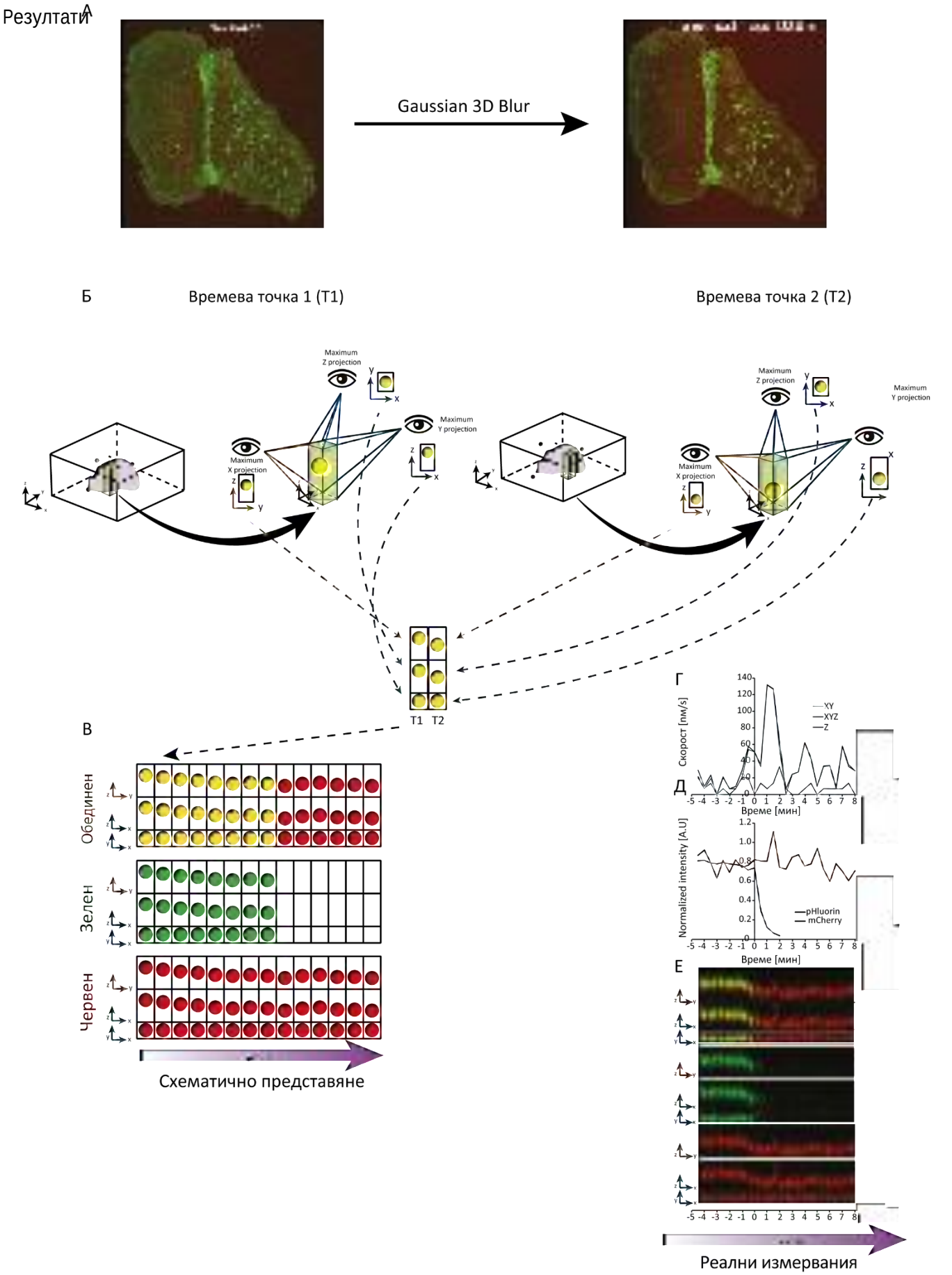
Фигура 2. Визуализация на свързването и интернализацията на SARS-CoV-2 вирусо-подобни частици.

А. Свързване и интернализация на SARS-CoV-2 VLP^{Wu}:M^{Ch} в U2OS клетки, които свръхекспресират ACE2-NeonGreen и TMPRSS2. Монтажът показва частици, които първоначално се свързват към филоподи, а след това мигрират към вътрешността на клетките.
Б. U2OS клетки, експресиращи mNeonGreen (за да се визуализира клетъчния обем), третирани с VLP^{Wu}:M^{Ch}.
В. Позицията на вирусо-подобните частици в прозрачния 3D обем на U2OS клетка (изглед отгоре)
Г. Клетката от (В) погледната отстрани.
Д. Клетката от (В), в която е представен 3D обема ѝ, с цел да се покаже кои от VLP^{Wu}:M^{Ch} частиците са интернализирани (погледната отгоре).
Е. Графика, показваща скоростта на частица (2) от (А). Всяка точка в графиката представлява скоростта на частицата, която се получава от две последователни изображения в 1D-вертикално (Z), в 2D (XY) и 3D (XYZ). Кимограмата представя промените на частицата, както в интензитета, така и в позицията ѝ. Времевите скали на графиката и кимограмата са еднакви.
Ж. Аналогично на (Е), но за частицата показана в (Б).
З. Клетки, третирани с Tubulin 610, конюгиран с кабазитаксел (cabazitaxel), показващи транспорта на VLP^{Wu}:M^{Ch} по микротубулите.
И. Вирусо-подобните частици от див тип (Wuhan) с белязан М белтък, третирани с рекомбинантно антитяло срещу SARS-CoV-2. Частиците агрегират и са неспособни да навлязат в клетката гостоприемник.

За да може да разясним процеса на интернализация на частиците в детайли, проследихме движението на всяка частица на всеки кадър от заснемането ѝ (tracking), след като се свърже към мембраната (Материали и методи т.7). По този начин получихме информация за скоростта на частицата, позицията ѝ в 3D пространството, както и за интензитета на флуоресцентно белязаните ѝ белтъци. За да може получените резултати да се интерпретират и измерят правилно, е необходимо да се намери начин, с който да се визуализират по разбираем и интуитивен начин. Поради тази причина, след като всяка частица бива проследена, тя се подлага на стандартизирана обработка с поредица от софтуерни скриптове на Python и Fiji. Това ни позволява да визуализираме и извлечем мулти-дименционалните данни за всяка частица. Тези скриптове се окомплектоваха в самостоятелен софтуер, който ние нарекохме SPARTACUSS (Single PARTicle Tracking Analysis in Cells Using Software Solutions). Основна роля за разработването и усъвършенстване на софтуера има колегата Румен Стаматов (ИМБ, БАН).

За визуализацията на цялата информация, получена от всяка една вирусо-подобна частица, посредством SPARTACUSS, първоначално се използва функцията Gaussian blur, за да се направят частиците по-различими и ясно изразени във всяка едно заснемане (Фиг. 3А). След това се изрязва пространството по координатите X и Y около частицата, като се запазва големината на целия Z стак. Следващата стъпка е използване на maximum intensity projection функцията по следния начин: maximum intensity по x – за да покажем позицията на частицата в z и y; maximum intensity по y – за да

визуализираме позицията на частицата в z и x; maximum intensity по z – за да покажем позицията на частицата в x и y. Повтаряме тези стъпки за всяка една времева точка и събираме получените изображения в един блок (кимографа) (Фиг. 3 Б,В). Последната стъпка е получаване на кимографи за 488 канала (зелен), 591 канала (червен) и сливането на двата канала в една обединена кимографа (Фиг. 3 Г). От получените кимографи SPARTACUSS извлича информация и прави графика за: скоростта в 3D (x,y,z) както и за промяната на интензитета на белязаните структурни белтъци на всяка една проследена (изследвана) частица (Фиг. 3 Г).



Фигура 3. Схематично представяне на работния процес за измерване и анализ на динамиката на интернализацията на вирусо-подобни частици,

използвайки SPARTACUSS.

А. Използване на функцията 3D Gaussian Blur, за да се направят частиците по-лесно разпознаваеми и по-лесно проследими.

Б. Схематично 3D представяне на клетка (сивата структура в черния квадрат), заснета в две последователни времеви точки. Единични вирусо-подобни частици са представени като жълти точки (следствие обединяване на флуоресцентния сигнал от mCherry и pHluorin). Избраният обем за изследване е представен като зелен паралелепипед около частицата и съответните проекции по всяка ос са направени (maximum intensity по x – за да покажем позицията на частицата в z и y; maximum intensity по y – за да визуализираме позицията на частицата в z и x; maximum intensity по z – за да покажем позицията на частицата в x и y) и обединени вертикално. Обединените вертикални проекции се събират хоризонтално (всяка времева точка), за да се генерира кимографата.

В. Схематична кимографа на една единствена частица, проследена във времето, заснета в два канала зелен (по-средата), червен (отдолу) и обединения (отгоре). Ако сигналът на зеления канал изчезне, частицата в обединената кимографа ще се промени от жълта в червена. За всеки канал, като кимографи, са представени различните проекции, получени от различните оси (ZY-най-отгоре, ZX- по средата, YX-най-отдолу).

Г. Измерване на скоростта на една единствена частица, използвайки методиката, описана по-горе. Всяка точка от графиката е скоростта на частицата във времето, получена от две последователни изображения в 1D-вертикално (Z), 2D (XY) и 3D (XYZ).

Д. Измерване на интензитета на единична частица за всяка времева точка в два канала.

Е. Кимографа на единична SARS-CoV-2 вирусо-подобна частица, получена от два канала (зелен-M-pHluorin; червен-M-mCherry), представени както е описано в (Б).

Използвайки SPARTACUSS, ние забелязахме, че след като се свържат, частиците първоначално се движат бавно (10-20 нм/сек), но след това скоростта им се увеличава. Това увеличение на скоростта често е съпътствано от движение на частиците надолу по Z равнината, което предполага интернализиране на частицата (Фиг. 2).

За да проверим дали това движение надолу е маркер за влизане на частиците в клетките, ние експресирахме mNeonGreen. Това е белтък, който свободно дифундира в целия обем на клетката и това ни позволява да го реконструираме в 3D. За да видим и мембранно-свързаните и интернализираните VLP^{Wu}:M^{Ch}, използвахме клетка, при която обемът е прозрачен (Фиг. 2 В). С цел разграничаване на двете популации направихме обема на клетката непрозрачен. Така, частиците, които са интернализирани, вече не могат да бъдат визуализирани (Фиг. 2 Д). Освен това, интернализираните вирусо-подобни частици,могат да бъдат наблюдавани и когато погледнем клетката с прозрачен обем отстрани (Фиг. 2 Г). След анализ на визуализацията на единична VLP^{Wu}:M^{Ch}, посредством SPATACUSS, се потвърди, че увеличаване на скоростта в 3D съвпада с проникване през клетъчната повърхност на частицата. Това е в унисон с по-рано получените резултати за клетките с белязан ACE2 рецептор, описани по-горе. Тези резултати ясно демонстрират способностите на SPARTACUSS да улови точния момент, в който дадена вирусо-подобна частица прониква в клетката и по-този начин да измери 3D динамиката ѝ в реално време.

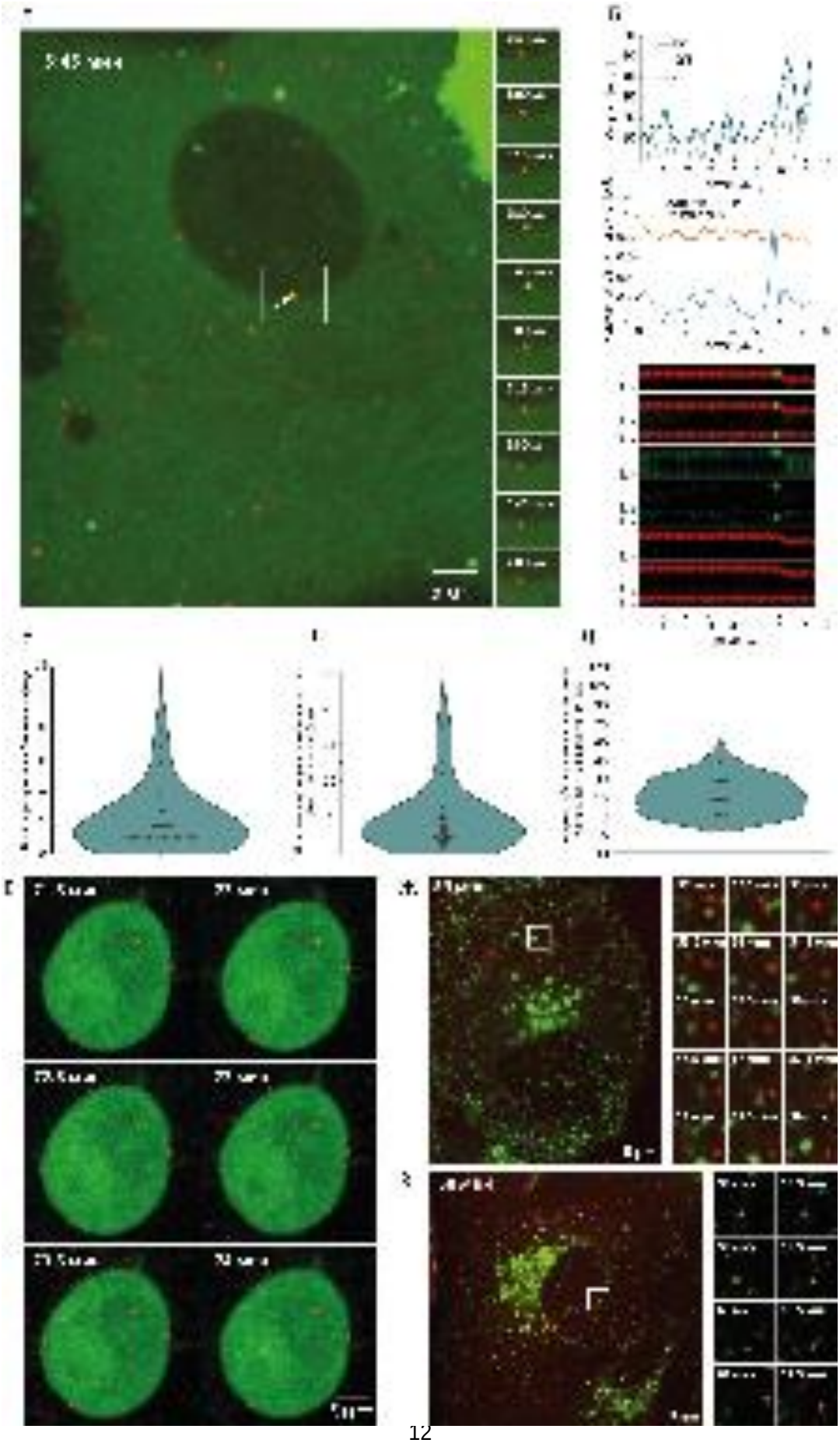
За да разберем дали активният транспорт по микротубулите е причината за повишаването на скоростта на интернализираните частици, инкубирахме клетки с VLP^{Wu}:M^{Ch}. След което третирахме тези клетки с Aberrior LIVE 610 микротубулно багрило (cabazitaxel, конюгиран с LIVE 610 багрило) за 10 минути и веднага преминахме към микроскопско заснемане. Нашите продължителни наблюдения разкриха, че много често вирусо-подобните частици, които са проникнали в клетката, колокализират с микротубулите (Фиг. 2 3), което подсказва, че бързото движение на частиците вероятно се дължи на движение по микротубулната мрежа.

Като следваща стъпка, искахме да оценим как анти-SARS-CoV-2 антитяло неутрализира SARS-CoV-2 вируса в реално време. За да постигнем това, инкубирахме клетки с VLP^{Wu}:M^{Ch}, като предварително частиците бяха пре-инкубирни с Anti-SARS-CoV-2 Spike S1 (CR3022 clone) антитяло. Тази инкубация, доведе до преципитирането на повечето вирусо-подобни частици, като по този начин се предотвратява влизането им в клетката чрез редукция на свободната им концентрация (Фиг. 2 И).

1.2. Динамин-зависимо навлизане на вирусо-подобните частици

Предполага се, че ендоцитозата играе роля при навлизането на вирусно-подобните частици в клетката [16,17]. За да определим дали изследваните от нас SARS-CoV-2 вирусо-подобни частици навлизат в клетката посредством този механизъм, както и да определим времето между свързването на частиците и формирането на везикули при процеса на едноцитоза, експресирахме Динамин, белязан с GFP в VeroE6 клетки, които са силно чувствителни към инфекция с вируса на SARS-CoV-2 [18]. Динаминът се свързва към покрити с клатрин инвагинирани везикули за около 10-15 секунди и е отговорен за сцизията (откъсването) на тези везикули при процеса на ендоцитоза [19–21]. Краткоживущите фокуси, които се формират по време на този процес, са стандартен маркер за формиране на ендозома [19,22–24]. Микроскопия за продължителен период от време на Динамин-1-GFP експресиращите клетки, третирани с VLP^{Wu}:M^{Ch}, ни позволи да визуализираме както движението на частиците, така и формирането на краткоживущи „мигащи“ фокуси на Динамин, които са индикативни за ендозомния ингрес (влизане). Това, което получихме беше, че 49% от частиците колокализират с фокуси на Динамина по време на или веднага след увеличаването на скоростта им (Фиг.

4 А,Б). Тази краткотрайна колокализация е силно доказателство в полза на аргумента, че ендоцитозата има роля в навлизането на вирусо-подобните частици в клетката.



Фигура 4. Динамика на формирането на Динаминови фокуси на местата на свързване на VLP^{Wu}:M^{Ch} в VeroE6 клетки.

А. Представително изображение на SARS-CoV-2 VLP^{Wu}:M^{Ch}, добавени към VeroE6 клетки и натрупването на Динамин. Монтажът показва последователни изображения от белия квадрат, като натрупването на Динамина се вижда на 5:45 мин (бялата стрелка).

Б. Горната графика представя скоростта на частицата, показана в (А); долната графика показва динамиката на флуоресцентния интензитет на двата канала; кимографата представя промените в интензитета, както и позицията на частицата.

В. Разпределението на броя Динаминови натрупвания към свързани към мембраната SARS-CoV-2 VLP^{Wu}:M^{Ch}, n=41.

Г. Разпределението на времевите интервали между свързването на частиците и първото натрупване на Динамин, n=37.

Д. Разпределението на времевите интервали между свързването на VLP^{Wu}:M^{Ch} и увеличаването на скоростта им. n=18.

Е. Клетки, третирани с Dynole 34-2, който инхибира везикуло-медиираната ендоцитоза. Наблюдава се невъзможността на частиците да влязат в клетката.

Ж. Клетки, експресиращи Rab-5 белязан с GFP. Наблюдава се липса на колокализация на Rab-5а позитивните везикули с SARS-CoV-2 VLP^{Wu}:M^{Ch}.

З. Клетки, третирани с LysoTracker. Наблюдава се колокализация на вирусо-подобните частици с кисели (ацидифирани) везикули (лизозоми или късни ендозоми).

Акумулацията на Динамин не винаги отразява успешна сцизия (срязване) на ендотичния везикул и често се наблюдават набор от абортивни цикли преди получаването на успешно скъсване [25]. Ако една вирусо-подобна частица колокализира за кратко с Динамин повече от веднъж, това би било индикативно за подобно абортивно събитие и благодарение на SPARTACUSS и анализа на единични вирусо-подобни частици, ние можем да измерим това. Както се вижда от Фиг. 4 В, 64% от частиците колокализират с Динаминови фокуси веднъж, 17% два пъти, а в 19% се наблюдават 3 или повече събития на колокализация. Тези резултати подсказват, че в 36% от частиците се наблюдава поне едно абортивно събитие на Динаминово свързване (Фиг. 4 В). В допълнение, формирането на Динаминови фокуси ни позволи да измерим времето между свързването на вирусо-подобните частици към мембраната и скъсването на ендозомните везикули, което е 5.24±6.8 мин. Освен това, SPARTACUSS ни позволи да измерим времето между формирането на Динаминови фокуси и увеличаването на скоростта на частиците. От получените резултати се вижда, че SARS-CoV-2 VLP^{Wu}:M^{Ch} увеличават скоростта си до 45 секунди след натрупването на Динамина, като при 30% от частиците увеличаването на скоростта се случва едновременно със събитие на Динаминова сцизия (Фиг. 4 Г, Д).

За да оценим допълнително ролята на ендоцитозата в интернализацията на вирусо-подобните частици, използвахме Dynol 34-2 - силен инхибитор на Динамин 1, който предотвратява рецептор-медиираната ендоцитоза [24]. След като третирахме клетките с инхибитора, частиците се закачаха за повърхността на клетките, но не се интернализираха (Фиг. 4 Е). Важно е да се спомене, че Dynol 34-2 промени

морфологията на клетките в значителна степен, като под негово влияние клетките се окръглиха, което вероятно подсказва за ефект върху клетъчния кортекс. Тази значителна промяна в клетъчната морфология вероятно повлиява мембранно-свързаните процеси, включително ендоцитозата.

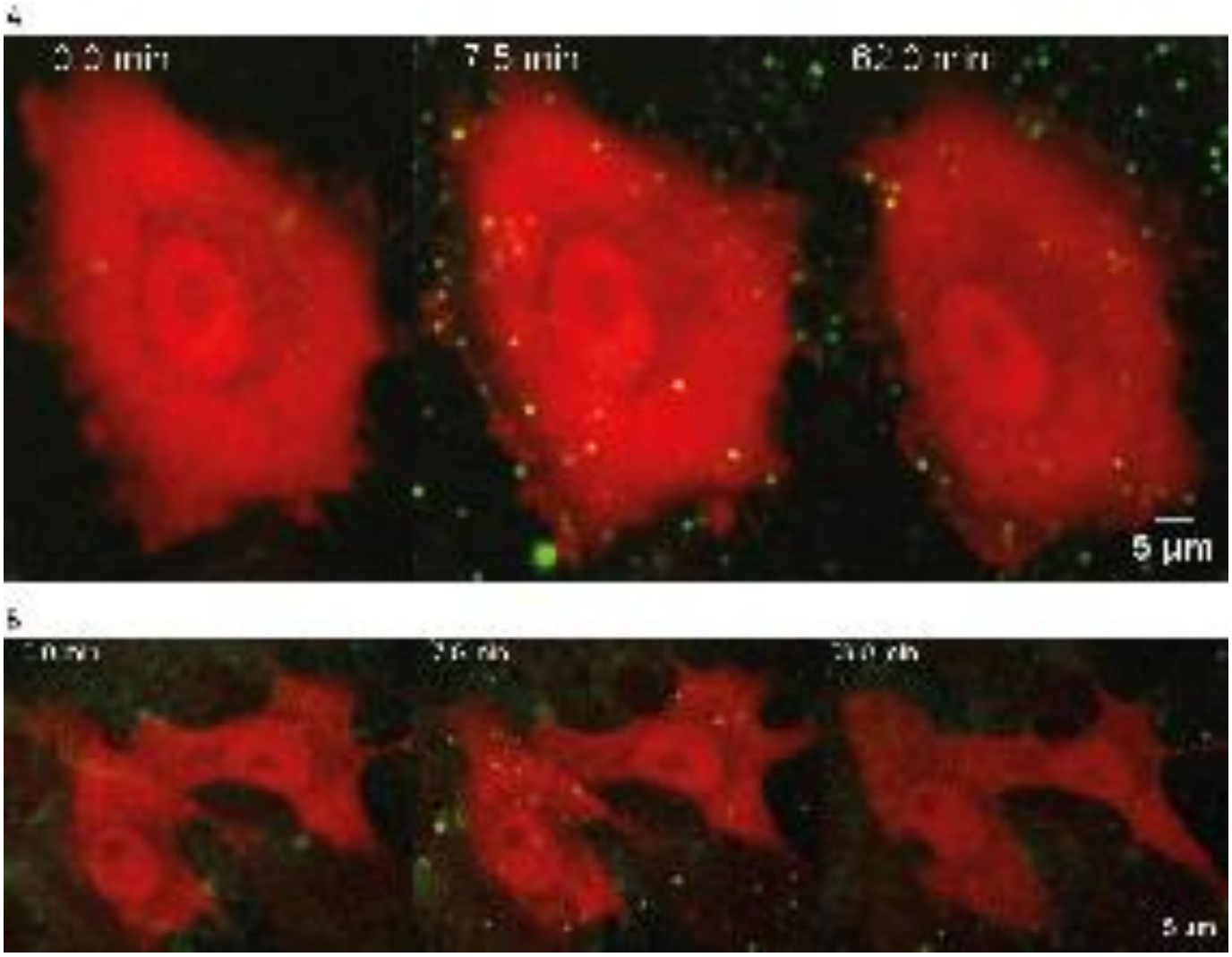
За да проверим в кои везикули се транспортират частиците от момента на интернализация, решихме да бележим ранните и киселите (късните) ендозоми. Като първа стъпка, проверихме дали частиците колокализират с ранни ендозоми. За тази цел, белязахме Rab-5a с GFP белтъка, който се открива в ранните ендозоми. За нас беше голяма изненада да не регистрираме колокализация между ранните Rab5a-съдържащи ендозоми и вурисо-подобните частици (Фиг. 4 Ж). Тъй като се знае, че при узряването на везикулите тяхното pH пада, като следваща стъпка, решихме да проверим дали частиците колокализират с киселите ендозоми [26]. За да визуализираме тези везикули при микроскопско наблюдение, използвахме LysoTracker. Третирахме клетките с SARS-CoV-2 VLP^{Wu}:M^{Ch} и след това използвахме багрилото. Това което наблюдавахме беше, че част от частиците колокализираха с киселите везикули (Фиг. 4 З).

Имайки предвид всички получени резултати до момента, бихме могли да обобщим, че от една страна Динамин-1-медиираната ендоцитозата има участие в интернализацията на поне част от частиците и в допълнение ги откриваме в киселите ендозоми, но не и в Rab-5a позитивните такива. От това би следвало да заключим, че вероятно се формира друг тип везикул около интернализиращите се SARS-CoV-2 VLP^{Wu}:M^{Ch}.

1.3. Динамика на ацидификацията на вирусо-подобните частици

Различни научни групи демонстрираха, че pH на средата е от значение за интернализацията на VSV химерни частици, друг тип вирусо-подобни частици, съдържащи SARS-CoV-2 S протеина. Те показаха, че по-киселата среда води до по-често фузия (fusion), като начин на интернализация на частиците [27–29]. За да оценим ролята на pH в интернализацията на SARS-CoV-2 вирусо-подобните частици, ние искахме да измерим с голяма точност динамиката на pH в тях по време на интернализацията им. За да постигнем това, част от M структурните белтъци бяха белязани със supereclitic pHluorin флуоресцентния белтък в C края си [5]. Този белтък излъчва ярка флуоресцентна светлина при pH≥8, но интензитетът му много бързо намалява при pH<7.5, като изчезва напълно при pH<5 [30]. Тъй като C-крайният домен на M бетъка е в сърцевината (вътрешната част) на вирусо-подобните частици, свързаният pHluorin служи като индикатор в реално време за pH във вътрешността на частиците. Вирусо-подобните частици, белязани с pHluorin, излъчват ярка зелена светлина, когато се намират в средата с (pH=8), но веднага след като се свържат към мембраната на

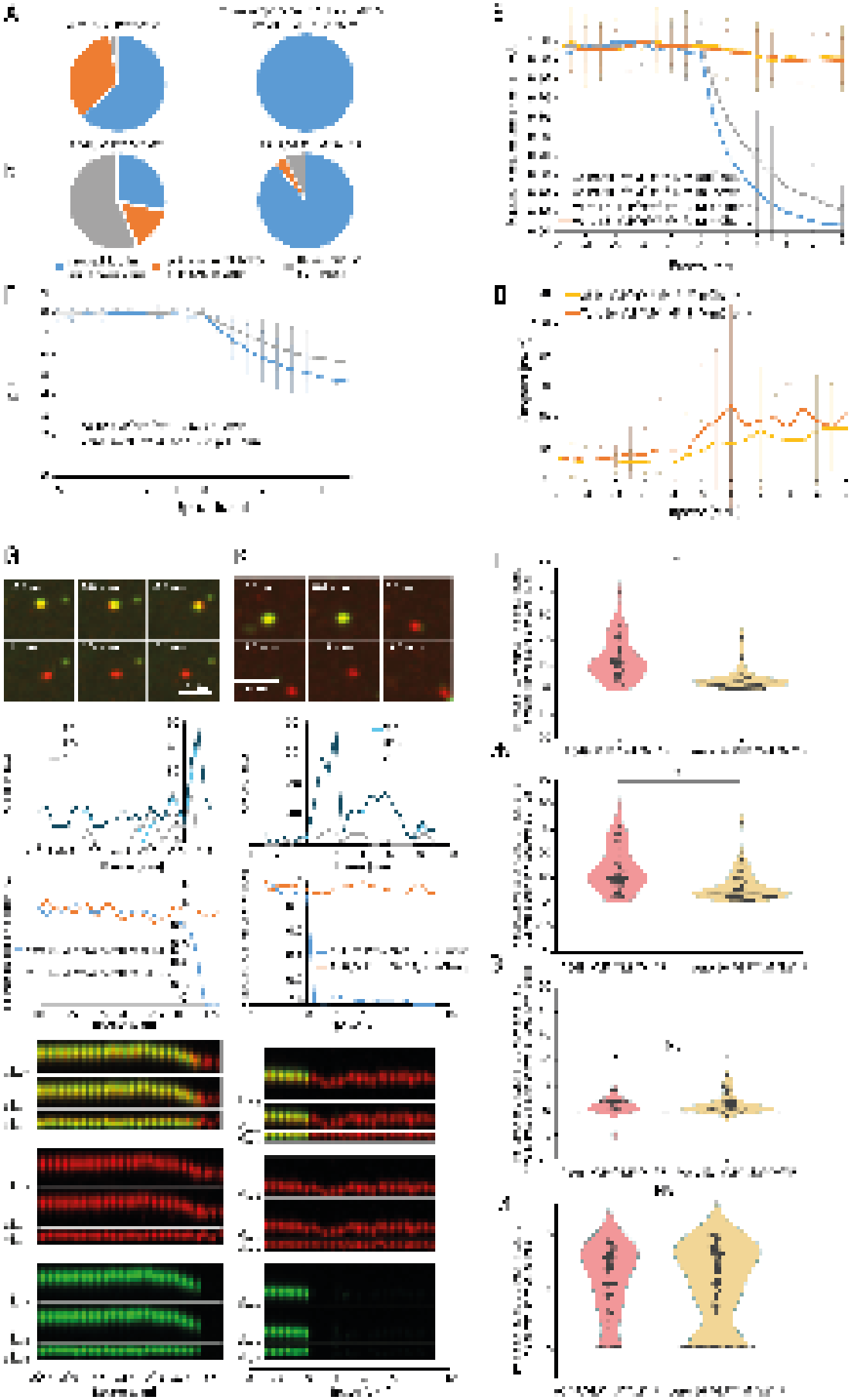
клетките, интензитетът им започва бързо да намаля, което предполага бързо намаляне на pH вътре в частиците (Фиг. 5).



Фигура 5. Динамика на вирусо-подобни частици белязани с pHluorin.
А. Динамика на вирусо-подобни частици, белязани с pHluorin в A549 клетки белязани със свободно дифундиращ mCherry.
Б. Динамика на вирусо-подобни частици, белязани с pHluorin в VeroE6 клетки, белязани със свободно дифундиращ mCherry.

За да отнесем динамиката на pH на частиците към момента на тяхната интернализация, използвахме вирусо-подобни частици, които съдържат както не белязани E, S, N и M белтъци, така и белязан M белтък по два начина: M-pHluorin - за да следим динамиката на pH на частиците и M-mCherry, за да следим динамиката на мембраните на частиците. В допълнение, тези частици съдържат и цис-действащ РНК елемент [31]. От сега нататък ще споменаваме тези частици като VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}$ (накратко от VLP^{Wuhan}:(E, S, N, M&M-mCherry&M-pHluorin). Двойното белязане ни позволява да проследяваме частиците и да анализираме тяхната динамика, дори когато pHluorin

сигналът изчезне напълно, поради снижаването на pH-то. Ние наблюдавахме, че при 63% от анализираните частици сигналът на pHluorin изчезва без да има промяна в интензитета на сигнала на mCherry, при 34% и двата флуоресцентни сигнала изчезат едновременно и при 3% нямаше промяна в флуоресцентния сигнал и в двата маркера по време на нашите наблюдения в VeroE6 клетки (Фиг 6A). Тези резултати показват, че при 2/3 от частиците изчезването на флуоресцентния сигнала на pHluorin е резултат от намаляването на pH без частиците да са нарушили цялостта си.



Фигура 6. Динамика на свързването, намаляването на pH и увеличаването на скоростта на SARS-CoV-2 VLP^{Wu}:M^{Ch}M^{pH}R в A549 и VeroE6 клетки.

А. Процентът частици, в които интензитетът на M-pHluorin намалява (син цвят), интензитетът на M-pHluorin и M-mCherry намалява едновременно (оранжев цвят) и нито един от интензитетите на двата маркера не намлява (сив цвят) в продължение на 100 минути заснемане след добавяне на VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}R$ към VeroE6 клетки, които или свърхекспресират ACE2 и TMPRSS2 или не.
Б. Същият експеримент като (А), но за A549 клетки.
В. Сравнение на намаляването на интензитета на M-pHluorin по време на интернализацията на VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}R$ в A549 или VeroE6 клетки. Усредненият интензитет на pHluorin е представен като функция на времето, където всяка една вирусо-подобна частица е приравнена към момента, когато интензитетът на pHluorin на тази частица започва да пада (0 мин). Усредненият интензитет на M-mCherry на същите частици е също представен. Светлите линиите под и над линията (Error Bars) показват стандартното отклонение. За A549 n = 55, а за VeroE6 n = 93.
Г. Сравнение на динамиката на намаляването на pH по време на интернализацията на VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}R$ в A549 или VeroE6 клетки. Намаляването на pH е изчислено на база на намаляването на измерения интензитет на M-pHluorin. Усредненото pH на частиците е представено като функция на времето, където всяка една вирусо-подобна частица е приравнена към момента, когато интензитета на pHluorin на тази частица започва да пада (0 мин). Светлите линиите под и над линията (Error Bars) показват стандартното отклонение. За A549 n = 55, а за VeroE6 n = 93.
Д. Усреднената скорост на VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}R$, в A549 и VeroE6 клетки, измерена на база сигнала от M-mCherry. Средната скорост на всяка една частица е изчислена след приравняване на стойностите за скоростта ѝ към началото на падането на pHluorin сигнала ѝ (0 мин). Светлите линиите под и над линията (Error Bars) показват стандартното отклонение. За A549 n = 55, а за VeroE6 n = 93.
Е. Разпределение на времевите интервали между свързването на VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}R$ и началото на падането на интензитета на pHluorin сигнала им в A549 и VeroE6 клетки. Използван е двустранен t-тест на Стюдент за статистически анализ при следните критерии: NS $p>0.01$; * $p<0.01$. За A549 n = 55, а за VeroE6 n = 93.
Ж. Разпределение на времевите интервали между свързването на VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}R$ и началото на увеличаването на скоростта им в A549 и VeroE6 клетки. Използван е двустранен t-тест на Стюдент за статистически анализ при следните критерии: NS $p>0.01$; * $p<0.01$. За A549 n = 55, а за VeroE6 n = 93.
З. Разпределение на времевите интервали между началото на падането на интензитета на pHluorin сигнала на VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}R$ и увеличаването на скоростта им в A549 и VeroE6 клетки. Използван е двустранен t-тест на Стюдент за статистически анализ при следните критерии: NS $p>0.01$; * $p<0.01$. За A549 n = 55, а за VeroE6 n = 93.
И. Разпределение на изчисленото pH на VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}R$, получено на база сигнала на pHluorin в момента когато скоростта на частиците започва да се увеличава в A549 и VeroE6 клетки. Използван е двустранен t-тест на Стюдент за статистически анализ при следните критерии: NS $p>0.01$; * $p<0.01$. За A549 n = 55, а за VeroE6 n = 93.
Й. Монтаж от представително микроскопско наблюдение (горе), съответсващите графики за скорост и интензитет на избраната частица (по-средата) и съответните кимографи (обединен, M-mCherry и M-pHluorin) във всички измерения (долу) за една единствена, избрана VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}R$ в процес на интернализация в една VeroE6 клетка. В този пример скоростта се увеличава в момента, когато сигнала на pHluorin на тази частица, започва да намаля.
К. Аналогично на (Й), но за една A549 клетка.

Като следваща стъпка, искахме да оценим ефекта на интернализацията на вирусо-подобните частици при свръхекспресиране на ACE2 рецептора, както и протеазата TMPRSS2. За да постигнем това, използвахме частици, които съдържат РНК (VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}$, R), която има цис-действащ T20 елемент, който е доказано, че има позитивен ефект върху самосглобяването на вирусо-подобните частици [31]. Добавянето на този РНКов елемент не повлия процента вирусо-подбни частици, при които падането на сигнала на pHluorin става без промяна на интензитета на сигнала на mCherry. За разлика от това, свързхекспресирането на ACE2 и TMPRSS2 доведе до значително повишаване на броя горе-описани частици (100%). Като следваща стъпка, проведохме същите експерименти в A549 клетки, които са стандартен клетъчен модел за белодробен епител при инфекция с вируса SARS-CoV-2. При липса на свръхекспресия на ACE2 рецептора и TMPRSS2 протеазата при 28% от вирусо-подобните частици се наблюдава намаляване на интензитета на сигнала на pHluorin без да се наблюдава променя в интензитета на mCherry. При 15% от вирусо-подобните частици се наблюдава едновременното изчезване и на двата сигнала на флуоресцентните маркери и при 57% не се наблюдават промени в интензитета и на двата сигнала за периода на експеримента (Фиг. 6Б). Тези резултати подсказват, че A549 клетките са по-малко чувствителни за интернализация на SARS-CoV-2 вирусо-подобни частици в сравнение с VeroE6 клетки. Свръхекспресията на ACE2 и TMPRSS2 значително повиши процента частици, при които интензитетът на сигнала на pHluorin намалява без да има промяна в този на mCherry (89% в сравнение с 28%). Като цяло, свързхекспресията на ACE2 и TMPRSS2 повишава броя на частици, при които има намаляване на pH, без частиците да са нарушили цялостта си и в двете клетъчни линии (Фиг. 6А и Б).

За да оценим скоростта, с която сигналът на pHluorin намалява, ние приравнихме всички проследени вирусо-подобни частици към момента, при който интензитетът на сигнала започва да намалява (Фиг. 6В). По този начин измерихме времето за полуизчезване на сигнала на pHluorin, който беше 1.4 и 1.6 мин за VeroE6 и A549 клетките съответно. След това, превърнахме стойностите на сигнала на pHluorin в pH такива и след анализ видяхме, че при VeroE6 клетки pH намалява от 8 до 6.3, а при A549 от 8 до 6.9 за период от 90 секунди (Фиг. 6В и Г), което подсказва за много бързата ацидификация на вирусо-подобните частици. Нашите резултати също демонстрираха, че в повечето случаи скоростта на частиците се увеличава след началото на намаляването на pH (Фиг. 6Д).

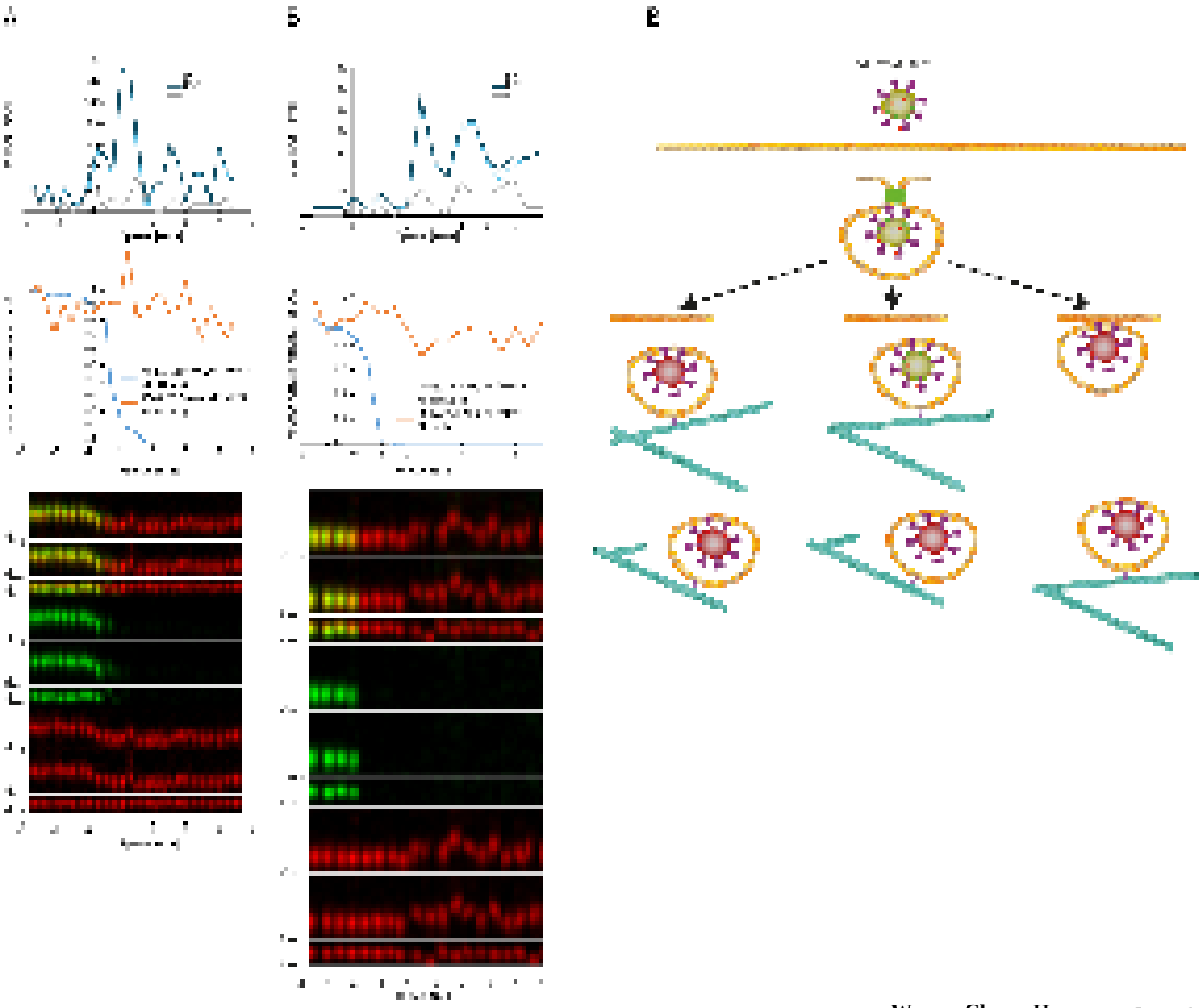
Двойното белязане (с M-mCherry и M-pHluorin) ни позволи да определим хронологичната последователност на трите етапа на интернализацията на вирусо-подобните частици на ниво единична частица. Трите етапа са както следва: свързане на частицата към мембраната на клетката гостоприемник, намаляване на pH на частицата

и увеличаването на скоростта ѝ. Следователно, ние измерихме интервала между всяка възможна двойка от гореспоменатите етапи (Фиг. 6Е, Ж, З, И, таблица 1).

Вариант на частицата/клетъчна линия	**Времето от свързване на частицата до началото на намаляването на сигнала на pHluorin или N-EGFP**	**Времто от началото на падането на сигнала на pHluorin или N-EGFP до увеличаването на скоростта на частицата**	**Времето от свързването на частицата до момента, в които скоростта ѝ се увеличава**
VLP-WT ММ в VeroE6	4.1 ± 3.6 min	2.4 ± 3.7 min	6.5 ± 5.4 min
VLP-WT ММ в A549	12.5 ± 8.4 min	1.4 ± 3.7 min	13.9 ± 9.2 min
VLP-WT NM в A549	13 ± 8.6 min	7.0 ± 10.0 min	20.1 ± 14.8 min
VLP-Omi NM в A549	14.2 ± 8.5 min	2.9 ± 6.9 min	17.1±10.1 min
VLP-del1 ММ в VeroE6	6.4 ± 5.4 min	2.8 ± 8.2 min	9.2 ± 8.9 min
VLP-del1 ММ в A549	16.7 ± 12.7 min	1.7 ± 1.6 min	18.4 ± 12.9 min
VLP-del1 ММ в A549	10.12 ± 8.72 min	3.61 ± 7.79 min	13.74 ± 11.57 min
VLP-OMI ММ в A549	13.01 ± 8.4 min	4.03 ± 7.44 min	17.04 ± 11.48 min

Таблица1. Измерените интервали между различните стъпки на интернализацията на вирусо-подобните частици.

При VeroE6 клетки, pH на частиците започва да пада 4.1 ± 3.6 мин след свързването на частиците към клетъчната мембрана, а 2.4 ± 3.7 мин след това скоростта им започва да се увеличава (Таблица 1). При A549 клетки pH започва да намалява 12.5 ± 8.4 мин след свързване, а скоростта се увеличава 1.4 ± 3.7 мин след това. Тези резултати показват, че в общия случай, промяната на pH започва по време на или точно преди увеличаването на скоростта на частиците (Фиг. 6Й, К). От друга страна, като разгледаме индивидуално измерените вирусо-подобни частици, ние може да намерим примери, при които скоростта започва да се увеличава след старта на намаляването на pH, двете събития да се случват едновременно или скоростта може да започне да се увеличава преди началото на намаляването на pH (Фиг. 7 и 8), което показва, че няма директна казуална връзка между тези две събития.

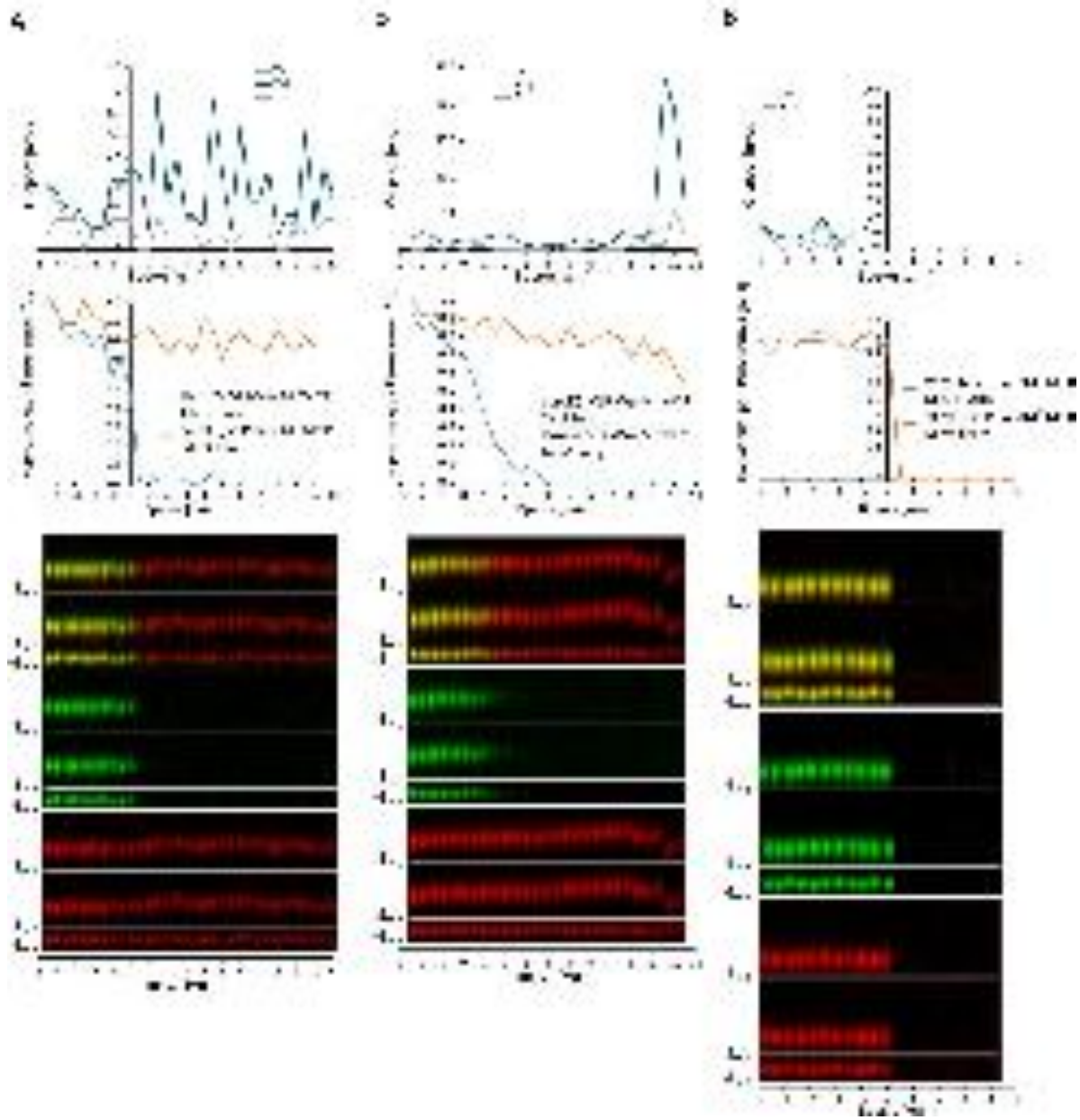


Фигура 7. Примери за влизания на единични VLP^{Wu}:M^{Ch}M^{pH}R в A549 клетки.

А. Представителни графики на скоростта (горе) и кимографи (обединени, M-Cherry и M-pHluorin) във всички измерения (долу) за една единствена вирусо-подбна частица, която е в процес на интернализация, където скоростта на частицата започва да се увеличава преди интензитета на pHluorin сигналът ѝ да започне да намалява.

Б. Същата структура като (А), но за частица, при която скоростта започва да се увеличава, след като интензитетът на pHluorin сигнала е започнал да намалява.

В. Схематично представяне на ацидификацията на вирусо-подобната частица и закачането ѝ към микротубулната мрежа (увеличавне на скоростта). pH намалява едновременно със страта на активно движение по микротубулите (ляв панел); pH на частиците нямалява под 5 след старта на активно движение по микротубулната мрежа (среден панел); pH на частиците намалява под 5 преди старта на активно движение по микротубулната мрежа (десен панел).



Фигура 8. Примери за влизания на единични VLP^{Wu}:M^{Ch}M^{pH}R в VeroE6 клетки.

А. Представителни графики на скоростта (горе) и кимографи (обединени, M-Cherry и M-pHluorin) във всички измерения (долу) за една единствена вирусо-подобна частица, която е в процес на интернализация, където скоростта на частицата започва да се увеличава преди интензитета на pHluorin сигнала ѝ да започне да намалява.

Б. Същата структура като (А), но за частица, при която скоростта започва да се увеличава, след като интензитетът на pHluorin сигнала е започнал да намалява.

В. Същата структура като (А), но за частица, при която и двата флуоресцентни маркера изчезват едновременно.

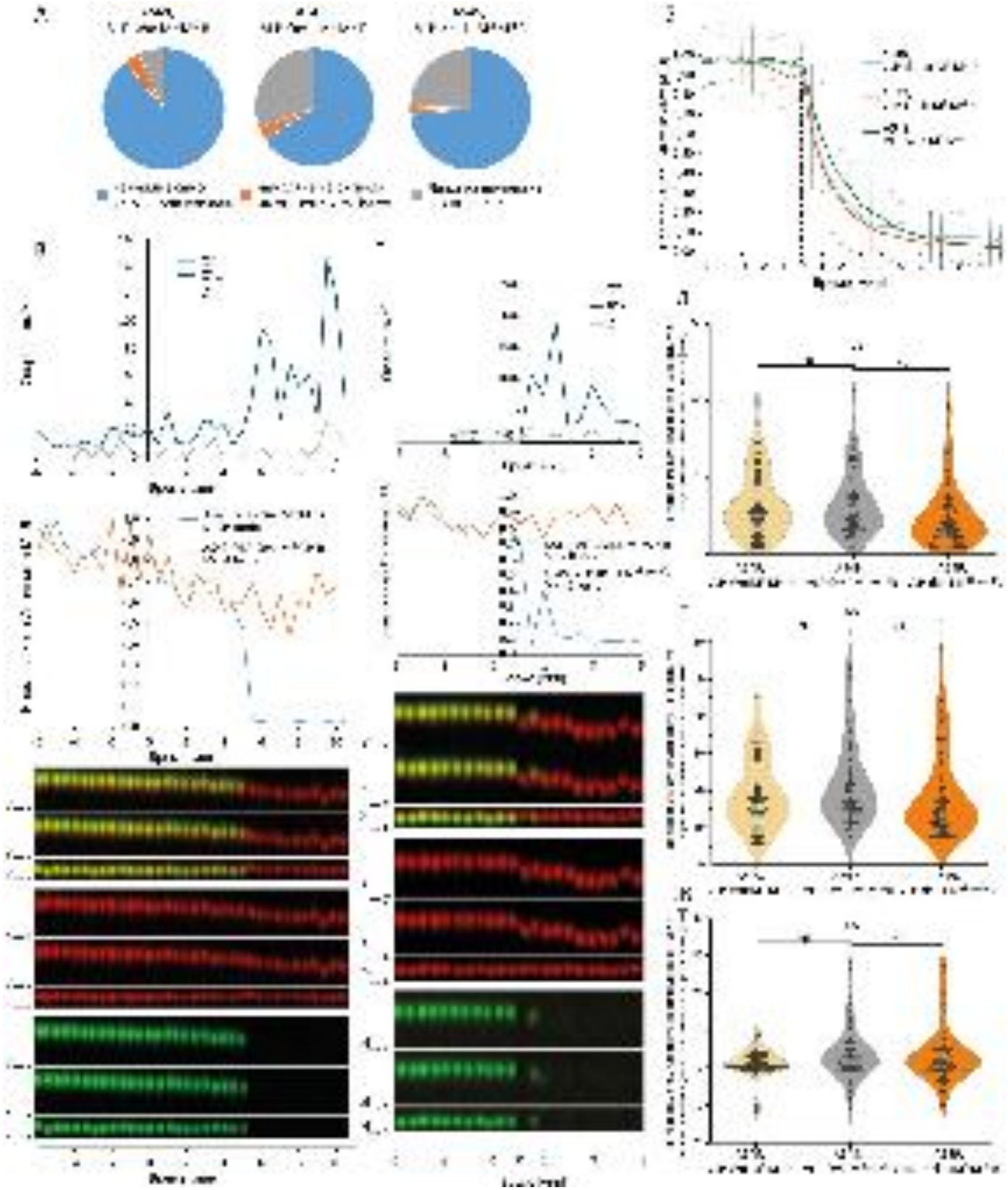
Това раздвояване на двете събития (началото на намаляването на pH и началото на увеличаването на скоростта- активно движение по микротубулната мрежа) допълнително се подтвърждава от значителната вариация на pH стойностите, при които скоростта на частиците започва да се увеличава (Фиг. 6И). Както показахме по-горе, увеличаването на скоростта е ясно разпознаваем маркер за активно движение на везикули, съдържащи вирусо-подобни частици по микротубулите в клетката. Имайки предвид всички резултати дотук, за по-голямата част от частиците, ацидификацията на частицата започва преди или по време на закачането на частиците към микротубулите в клетката (Фиг. 7В). Тъй като, процесът на ацидификация отнема по-малко от две минути, наблюдаваме случаи, при които движението по микротубулната мрежа се осъществява, след като pH е вече <5. Директното сравняване на кинетиките на интернализация на вирусо-подобните частици между двете клетъчни линии (Фиг. 6З) разкрива липсата на статистическа значимост в интервалите между началото на намаляването на pH на частиците и началото на увеличаване на тяхната скорост (старт на началото на движението на частиците по миротубулната мрежа). От друга страна, и двата интервала (между свързването и началото на падането на pH на частиците и свързването и началото на увеличаването на скоростта им) са 2 до 3 пъти по-къси в VeroE6 клетки в сравнение с A549 клетки (Фиг. 6 и таблица 1). Тази разлика в ефективността на интернализация може да допринася за по-голямата чувствителност на VeroE6 клетките спрямо A549 клетките към SARS-CoV-2 вирусна инфекция. По-внимателното разглеждане на интервалите между свързването на частиците към мембраната на клетката и падането на pH-то им и между свързването и увеличаване на скоростта им в A549 клетки, разкри малка популация от частици, при които тези интервали са много по-дълги (Фиг. 6Е, Ж). Тези по-дълги интервали, вероятно се дължат на абортивните цикли на Динамин-медиираната ендоцитоза, както беше описано по-горе.

В заключение, нашите открития подчертават ясно-изразената скорост и ефикастност на интернализацията на вирусо-подобните частици. Като тази интернализация е много по-значителна в VeroE6 клетки в сравнение с A549 клетки. Освен това, динаминичните профили на процесите свързани с интернализацията на вирусо-подобните частици, а именно: свързване към мембраната на клетката гостоприемник, ацидификацията и началото на микротубулния транспорт, показат, че дори ацидификацията и началото на микротубулния транспорт да са времево близки събития, не са взаимосвързани и взаимозависими един от друг.

1.4. Кинетика на вирусо-подобни частици, при които липсва мястото за разпознаване от протеазата Furin

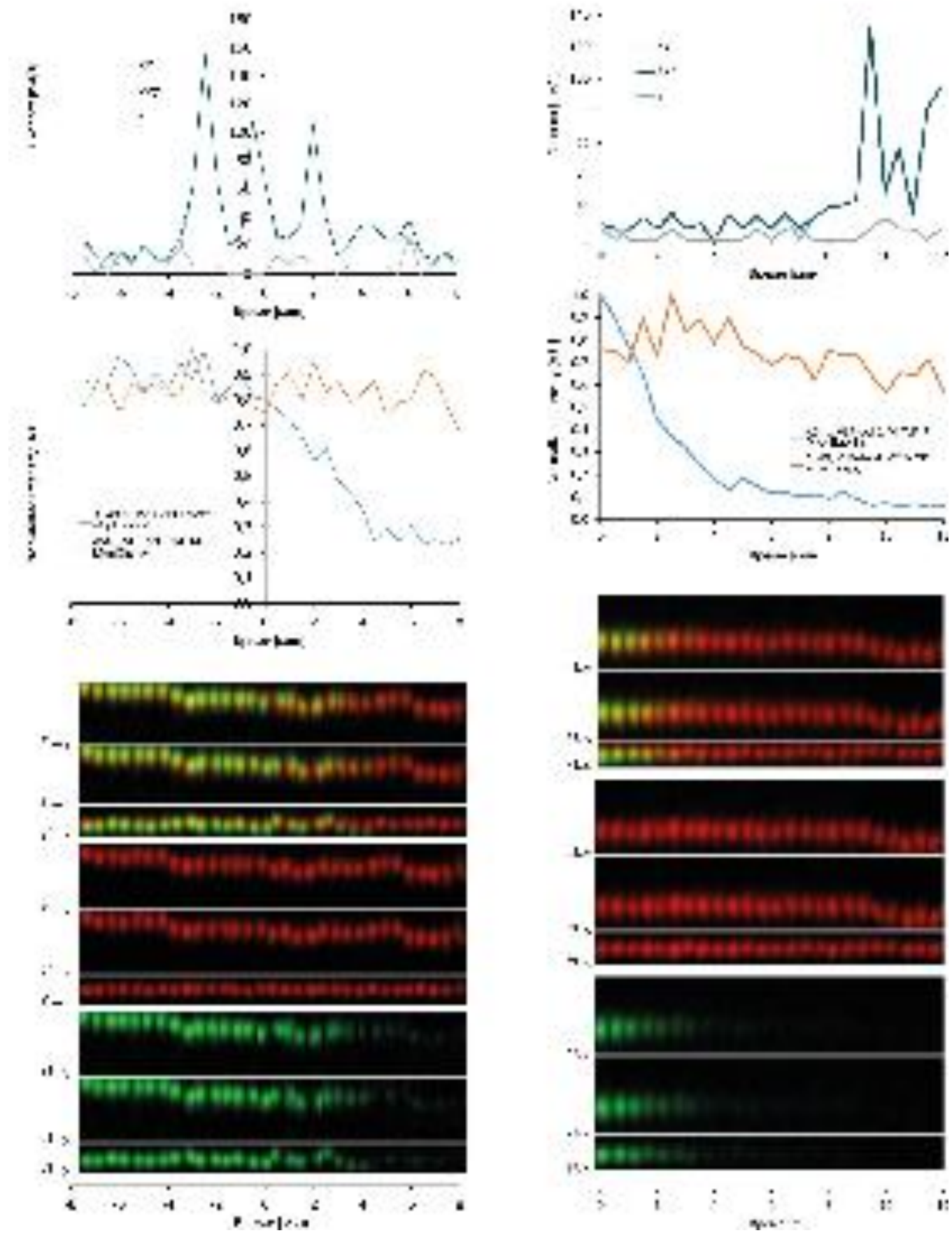
Една от основните разлики между SARS-CoV и SARS-CoV-2, е че при вторият вирус присъства специфична полипептидна последователност (PRRA) на границата

между S1 и S2 субединиците на S белтъка, която се разпознава от протеазата Furin [32]. Срязването от Furin, в допълнение с последващото срязване S2’ от TMPRSS2 или катепсините, води до разделянето на S белтъка на два суб-домена. Поради тази причина, като следваща стъпка, искахме да определим как липсата на Фурин специфично място за рязане (FCS) би се отразила на интернализацията на ниво единични SARS-CoV-2 вирусо-подобни частици. За да осъществим тази си цел, ние използваме частици, които съдържат M-mCherry, M-pHluorin и S белтък, при който липсва FCS (del-1) [33–37]. От този момент в текста тези частици ще бъдат адресирани като $VLP^{Wu(del-1)}$:$M^{Ch}M^{pH}$,R; накратко от $VLP^{Wuhan\ (del-1)}$:(N, E, S, M&M-mCherry & M-pHluorin, T20 RNA). Третирането на A549 клетки, които свръхекспресират ACE2 и TMPRSS2 с $VLP^{Wu(del-1)}$:$M^{Ch}M^{pH}$,R, разкри намаляване на процента частици, при които pHluorin сигнала пада без да има промяна в сигнала на mCherry - от 89% за VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}$, R на 73% за $VLP^{Wu(del-1)}$:$M^{Ch}M^{pH}$, R (Фиг. 9А). От друга страна, скоростта на намаляване pHluorin сигнала беше подобна между двата типа вирусо-подобни частици (Фиг. 9Б). Разпределението на времевите интервали между закачането на вирусо-подобната частица и старта на намаляването на нейното pH или увеличаването на скоростта ѝ, също бяха сравнимо подобни (Фиг. 9В-Ж, Таблица 1). В допълнение, както беше наблюдавано при дивия тип частици, и тук можеха да се наблюдават примери за частици, при които pH започва да намалява преди, по-време на или след увеличаването на скоростта на същите частици (Фиг.10).



Фигура 9. Сравнение между динамиката на закачането към мембраната, ацидификацията и увеличаването на скоростта на вирусо-подобни частици от типа VLP^{Wu}: M^{Ch}M^{pH}R, VLP^{Omi}: M^{Ch}M^{pH}R and VLP^{del-1}: M^{Ch}M^{pH}R по време на интернализация в A549 клетки.

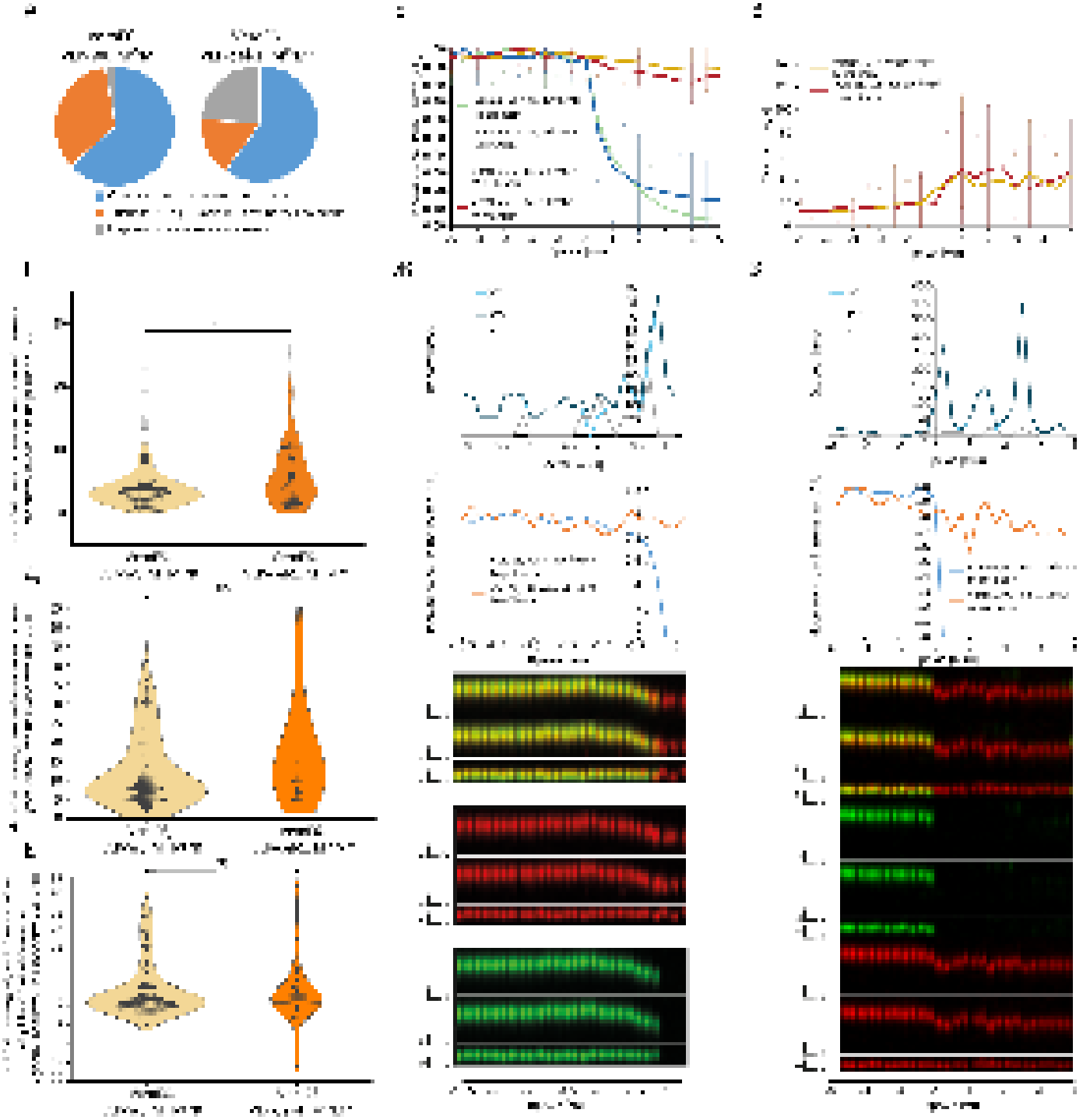
А. Процентът вирусо-подобни частици, при които само сигналът на M-pHluorin намалява (син цвят), сигналът на M-pHluorin и на M-mCherry намалява едновременно (оранжев цвят) или нито един сигнал не намалява (сив цвят).
Б. Сравняване на динамиката на намаляването на сигнала на pHluorin между: VLP^{Wu}: $M^{Ch}M^{pH}R$, VLP^{Omi}: $M^{Ch}M^{pH}R$ and VLP^{del-1}: $M^{Ch}M^{pH}R$ по време на интернализацията им в A549 клетки. Средната стойност на сигнала на pHluorin е представена, като всички проследени частици са приравнени към момента, когато започва намаляването на сигнала на M-pHluorin (0 мин). Усредненият интензитет на M-mCherry на същите частици също е представен. Светлите линиите под и над линията (Error Bars) показват стандартното отклонение. За VLP^{Wu}: $M^{Ch}M^{pH}R$ n=55, за VLP^{Omi}: $M^{Ch}M^{pH}R$ n=48 и за VLP^{del-1}: $M^{Ch}M^{pH}R$ n=62.
В. Представителни графики за скорост и интензитета на избраната частица (горе) и съответните кимографи (обединен, M-mCherry и M-pHluorin) във всички измерения (долу) за една единствена, избрана VLP^{Omi}: $M^{Ch}M^{pH}R$ вирусо-подобна частица в процес на интернализация в A549 клетка. При избрания пример скоростта на частицата се увеличава в момента, когато интензитета на M-pHluorin сигнала ѝ започва да намалява.
Г. Същата структура като (В) за вирусо-подобна частица от типа VLP^{del-1}: $M^{Ch}M^{pH}R$.
Д. Разпределение на времевите интервали между свързването на вирусо-подобните частици към мембраната на клетката и началото на падането на сигнала на M-pHluorin на всяка измерена вирусо-подобна частица от типа VLP^{Wu}: $M^{Ch}M^{pH}R$, VLP^{Omi}: $M^{Ch}M^{pH}R$ или VLP^{del-1}: $M^{Ch}M^{pH}R$, по време на интернализацията в A549 клетки. Използван е двустранен t-тест на Стюдент за статистически анализ при следните критерии: NS $p>0.01$; * $p<0.01$ За VLP^{Wu}: $M^{Ch}M^{pH}R$ n=55, за VLP^{Omi}: $M^{Ch}M^{pH}R$ n=48 и за VLP^{del-1}: $M^{Ch}M^{pH}R$ n=62.
Е. Разпределение на времевите интервали между свързването на вирусо-подобните частици към мембраната на клетката и увеличаването на скоростта им по време на интернализацията в A549 клетки. Частиците са от тип: VLP^{Wu}: $M^{Ch}M^{pH}R$, VLP^{Omi}: $M^{Ch}M^{pH}R$ или VLP^{del-1}: $M^{Ch}M^{pH}R$. Използван е двустранен t-тест на Стюдент за статистически анализ при следните критерии: NS $p>0.01$; * $p<0.01$ За VLP^{Wu}: $M^{Ch}M^{pH}R$ n=55, за VLP^{Omi}: $M^{Ch}M^{pH}R$ n=48 и за VLP^{del-1}: $M^{Ch}M^{pH}R$ n=62.
Ж. Разпределение на времевите интервали между началото на намаляването на сигнала на M-pHluorin на вирусо-подобните частици и увеличаването на скоростта им по време на интернализацията в A549 клетки. Частиците са от тип: VLP^{Wu}: $M^{Ch}M^{pH}R$, VLP^{Omi}: $M^{Ch}M^{pH}R$ или VLP^{del-1}: $M^{Ch}M^{pH}R$. Използван е двустранен t-тест на Стюдент за статистически анализ при следните критерии: NS $p>0.01$; * $p<0.01$ За VLP^{Wu}: $M^{Ch}M^{pH}R$ n=55, за VLP^{Omi}: $M^{Ch}M^{pH}R$ n=48 и за VLP^{del-1}: $M^{Ch}M^{pH}R$ n=62.



Фигура 10. Примери за интернализации в A549 клетки на единични вирусо-подобни частици от типа VLP^{del-1}:M^{Ch}M^{pH}R.

А. Представителни графики на скоростта (горе) и кимографи (обединени, M-Cherry и M-pHluorin) във всички измерения (долу) за една единствена вирусо-подобна частица, която е в процес на интернализация, където скоростта на частицата започва да се увеличава преди интензитета на pHluorin сигнала ѝ да започне да намалява.
Б. Същата структура като (А), но за частица, при която скоростта се увеличава след като интензитетът на сигнала на pHluorin е започнал да пада.

Подобни резултати получихме и за VeroE6 клетки (Фиг. 11 и 12).



Фигура 11. Динамика на свързването и увеличаването на скоростта на вирусо-подобни частици от типа VLP^{Wu}:M^{Ch}M^{pH} and VLP^{del-1}:M^{Ch}M^{pH} по време на интернализация в VeroE6 клетки.

A. Процентът вирусо-подобни частици, при които само сигналът на M-pHluorin намалява (син цвят), сигналът на M-pHluorin и на M-mCherry намалява едновременно (оранжев цвят) или нито един сигнал не намалява (сив цвят).

Б. Сравняване на динамиката на намаляването на сигнала на pHluorin между: VLP^{Wu}: $M^{Ch}M^{pH}R$ и VLP^{del-1}: $M^{Ch}M^{pH}R$, по време на интернализацията им в A549 клетки. Средната стойност на сигнала на pHluorin е представена като всички проследени частици са приравнени към момента, когато започва намаляването на сигнала на M-pHluorin (0 мин). Усреднения интензитет на M-mCherry на същите частици също е представен. Светлите линиите под и над линията (Error Bars) показват стандартното отклонение. За VeroE6-VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}R$ n=93, а за VeroE6-VLP^{del-1}:$M^{Ch}M^{pH}$ n=41.

В. Сравнение между динамиката на увеличаването на скоростта на частици от типа VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}$ and VLP^{del-1}:$M^{Ch}M^{pH}$ по време на интернализация в VeroE6 клетки. Средната скорост на частиците е представена, като всяка проследена частица е приравнена към момента, когато интензитета на сигнала на pHluorin започва да намалява (0 мин). Светлите линиите под и над линията (Error Bars) показват стандартното отклонение. За VeroE6-VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}R$ n=93, а за VeroE6-VLP^{del-1}:$M^{Ch}M^{pH}$ n=41.

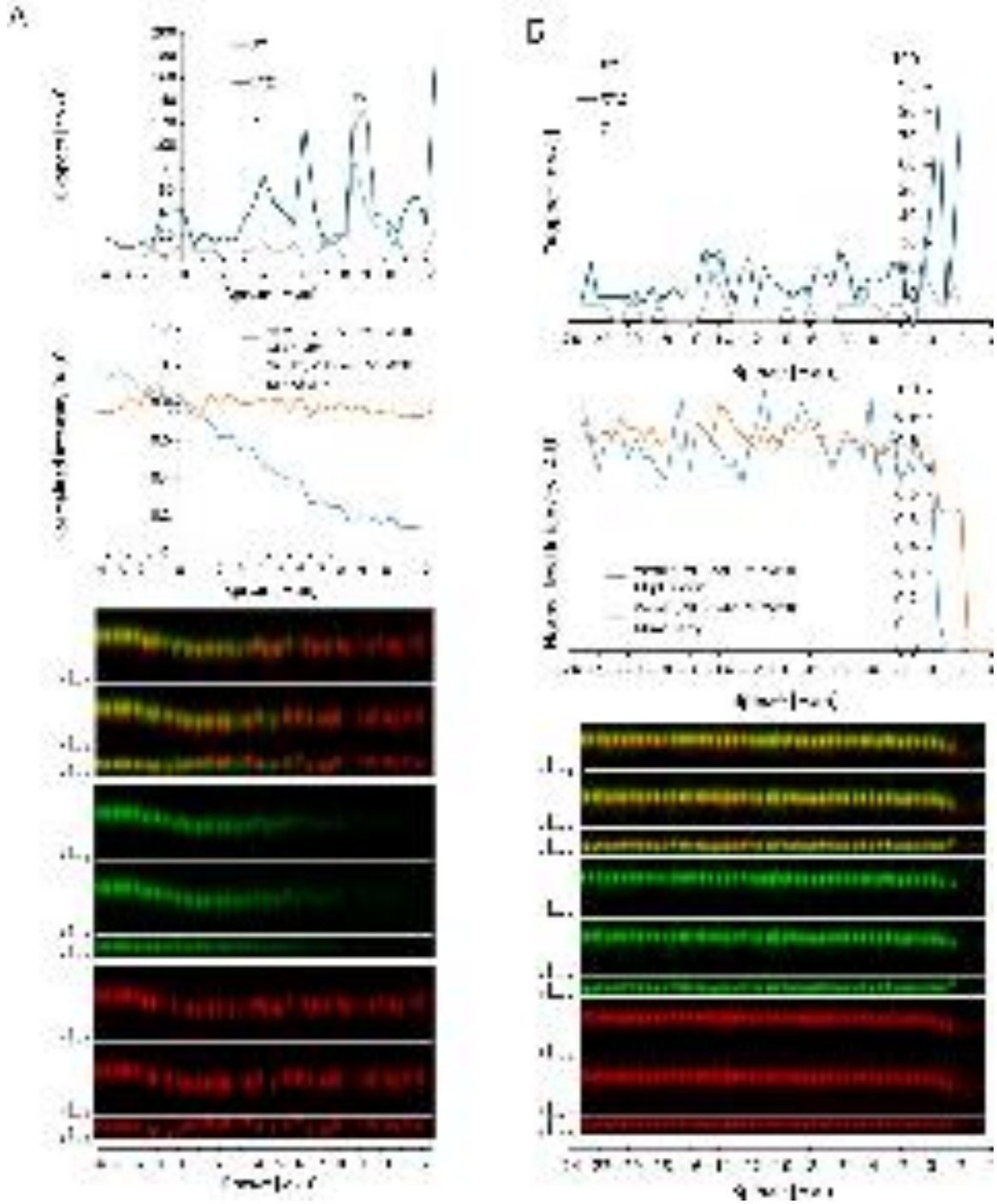
Г. Разпределение на времевите интервали между свързването на вирусо-подобните частици към мембраната на клетката и началото на падането на сигнала M-pHluorin на всяка измерена вирусо-подобна частица от типа VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}$ или VLP^{del-1}:$M^{Ch}M^{pH}$, по време на интернализацията в VeroE6 клетки. Използван е двустранен t-тест на Стюдент за статистически анализ при следните критерии: NS $p>0.01$; * $p<0.01$ За VeroE6-VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}R$ n=93, а за VeroE6-VLP^{del-1}:$M^{Ch}M^{pH}$ n=41.

Д. Разпределение на времевите интервали между свързването на вирусо-подобните частици към мембраната на клетката и увеличаването на скоростта им по време на интернализацията в VeroE6 клетки. Частиците са от тип: VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}$ или VLP^{del-1}:$M^{Ch}M^{pH}$. Използван е двустранен t-тест на Стюдент за статистически анализ при следните критерии: NS $p>0.01$; * $p<0.01$ За VeroE6-VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}R$ n=93, а за VeroE6-VLP^{del-1}:$M^{Ch}M^{pH}$ n=41.

Е. Разпределение на времевите интервали между началото на намаляването на сигнала на M-pHluorin на вирусо-подобните частици и увеличаването на скоростта им по време на интернализацията в VeroE6 клетки. Частиците са от тип: VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}$ или VLP^{del-1}:$M^{Ch}M^{pH}$. Използван е двустранен t-тест на Стюдент за статистически анализ при следните критерии: NS $p>0.01$; * $p<0.01$ За VeroE6-VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}R$ n=93, а за VeroE6-VLP^{del-1}:$M^{Ch}M^{pH}$ n=41.

Ж. Монтаж от представително микроскопско наблюдение (горе), съответсващите графики за скорост и интензитет на избраната частица (по-средата) и съответните кимографи (обединен, M-mCherry и M-pHluorin) във всички измерения (долу) за една единствена, избрана VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}$ вирусо-подобна частица в процес на интернализация в VeroE6 клетка. При избрания пример скоростта на частицата се увеличава в момента, когато интензитета на M-pHluorin сигнала ѝ започва да намалява.

З. Аналогично на (Ж), но за вирусо-подобна частица от типа VLP^{del-1}: $M^{Ch}M^{pH}R$.



Фигура 12. Примери за интернализация на VLP^{del-1}:M^{Ch}M^{pH} в VeroE6 клетки.

А. Представителни графики на скоростта (горе) и кимографи (обединени, M-Cherry и M-pHluorin) във всички измерения (долу) за една единствена вирусо-подбна частица, която е в процес на интернализация, където скоростта на частицата започва да се увеличава преди интензитета на pHluorin сигнала ѝ да започне да намалява.

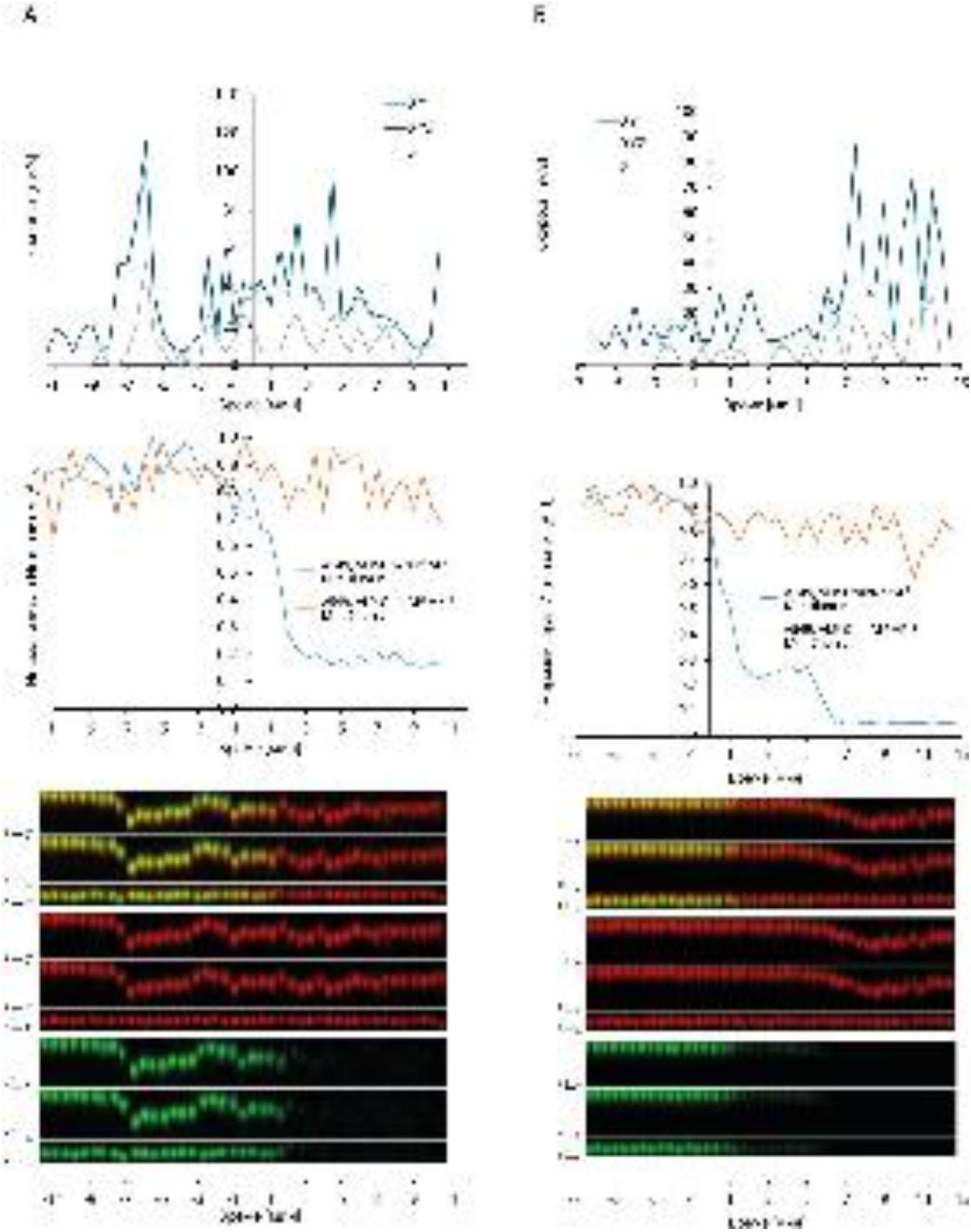
Б. Същата структура като (А), но за частица, при която и двата флуоресцентни маркера изчезват едновременно.

Нашите резултати показват, че FCS няма значителна роля при интернализацията на SARS-CoV-2 вирусо-подобни частици. Вече е доказано, че пасажирането на SARS-

CoV-2 във VeroE6 клетки води до мутации в граничната последователност на S1 и S2 субединиците, което предполага, че FCS не е есенциална за разпространяването на вируса [37,38]. Това е в съответствие с получените от нас резултати. Липсата на значителна разлика в динамиката на интернализацията на вирусо-подобни частици с и без FCS, която ние наблюдаваме, може да се дължи на неефективно срязване от протеазата Furin по време на етапа на узряване и самосглобяването на частиците, дори когато мястото за рязане на Фурин присъства в тях.

1.5. Кинетика на вирусо-подобни частици, съдържащи всички мутации, характерни за Омикрон варианта на SARS-CoV-2

Появата на варианта Омикрон на SARS-CoV-2 вируса през есента на 2021г. доведе до бързото и ефективното му разпространение сред човешката популация, като резултатът беше изместването на всички останали варианти и тоталната му доминация. Омикрон вариантът носи 50 амино-киселинни замени, 37,от които са в S белтъка, като 15 от тях засягат рецептор свързващия домен [39,40]. След като беше показано, че вирусът се разпространява 70 пъти по-бързо в човешки бронхи [39], решихме да измерим каква е кинетиката на интернализация на този вариант на вируса. За да постигнем тази цел, ние използвахме вирусо-подобни частици, съставени от небелязани N, E, S и M структурни белтъци, които носят всички замени на аминокиселини, характерни за Омикрон варианта. Освен това, частиците съдържаха белязан с mCherry и pHluorin M структурен белтък. От тук нататък тези частици ще бъдат адресирани като VLP^{Omi}:$M^{Ch}M^{pH}R$, накратко от $VLP^{Omicron}$:(N, E, S, M, M-mCherry & M-pHluorin, T20 RNA). Третирането на A549 клетки, които свръхекспресират ACE2 и TMPRSS2, разкри, че процентът частици, при които сигналът на pHluorin намалява без да се наблюдава намаляване на сигнала на mCherry е намалял - от 89% за VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}R$ до 65% за VLP^{Omi}:$M^{Ch}M^{pH}R$ (Фиг. 9А). От друга страна, скоростта на намаляване на сигнала на pHluorin беше почти идентичен при сравнението на двата типа частици. Освен това, тази скорост беше почти еднаква и със скоростта на намаляване на сигнала на pHluorin на частиците с делеция (Фиг. 9Д). Сравняване на разпределението на интервалите между различните събития, описани по-горе, също разкри липса на статистически значима разлика между тях (Фиг. 9Е,Ж,З). Дори след анализ на получените резултати на ниво единични вирусо-подобни частици, наблюдавахме, че се получават същите типове групи на частиците: когато скоростта се увеличава преди, по време на или след началото на падането на сигнала на pHluorin (Фиг. 13)



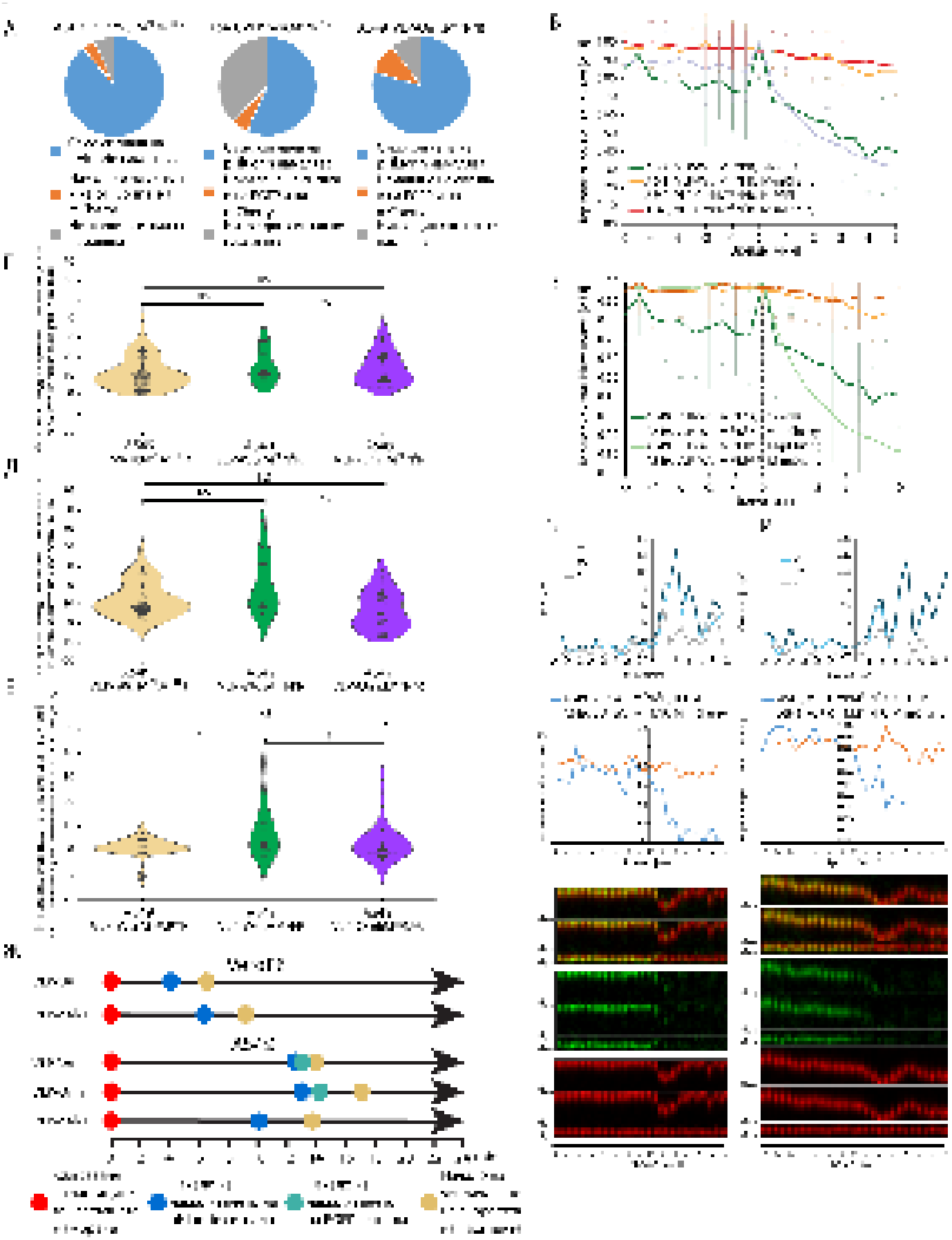
Фигура 13. Примери за интернализацията на единични VLP^{Omi}:$M^{Ch}M^{pH}R$ в A549 клетки.

А. Представителни графики на скоростта (горе) и кимографи (обединени, M-Cherry и M-pHluorin) във всички измерения (долу) за една единствена вирусо-подбна частица, която е в процес на интернализация, където скоростта на частицата започва да се увеличава преди интензитета на pHluorin сигнала ѝ да започне да намалява.
Б. Същата структура като (А), но за частица, при която скоростта ѝ започва да се увелича, след като интензитета на pHluorin сигнала на М-структурния ѝ белтък започва на намалява.

Всички получени резултати подсказват, че въпреки многото мутации в S структурния белтък и високата си разпространеност сред човешката популация, ние не наблюдавахме промени по отношение на параметрите на интернализацията на варианта Омикрон. Като заключение може да твърдим, че вероятно причината за тази висока разпространеност е по-ефективна репликация, диверсификация в клетъчния тропизъм или друг механизъм, а не по-ефективната интернализация.

1.6. Скорост на освобождаване на нуклеокапсида от вирусо-подобните частици

Освобождаването на нуклеокапсида от частиците се получава или след фузия на всяка частица с клетъчната мембрана или с мембраната на ендозомата, в която се намира, като това е ключова стъпка от процеса на интернализация. Поради тази причина, ние си поставихме за задача да определим динамиката на освобождаването на нуклеокапсида от вирусо-подобните частици по време на интернализацията. За да постигнем тази задача, използвахме частици, при които част от нуклеокапсид-формиращия структурен белтък N е белязан с EGFP, а част от M структурния белтък е белязан с mCherry. От тук нататък в текста тези частици ще са изписани като (VLP^{Wu}:$N^{eG}M^{Ch}R$), накратко от SARS-CoV-2:(E, S, N&N-eGFP, M&M-mCherry, T20 RNA). Това, което ни направи силно впечатление беше, че 90% от частиците излъчваха силен сигнал и по двата маркера веднага след извличането им от клетките, но по-малко от 1% запазваха интензитета на тези сигнали два дни след това. Това е в съгласие с получените резултати от други лаборатории, които показват, че белязането на N белтъка води до силно намаляване на стабилността на вирусо-подобните частици [31]. След оценка на типовете частици, ние определихме, че при 57% от тези двойно-белязани вирусо-подобни частици сигналът на EGFP силно намалява преди сигнала на mCherry, което би могло да отразява освобождаването на N белтъка (Фиг. 14А).



Фигура 14. Сравнение между динамиката на закачането към мембраната, ацидификацията и увеличаването на скоростта на вирусо-подобни частици

от типа VLP^{Omi}:M^{Ch}N^{E}R, VLP^{Wu}:M^{Ch}N^{E}R, и VLP^{Wu}:M^{Ch}M^{pH}R по време на интернализация в A549 клетки.

А. Процентът вирусо-подобни частици, при които само сигнала на N-EGFP (средната и крайната кръгова диаграма) или на M-pHluorin (лява кръгова диаграма) намалява (син цвят), сигнала на M-pHluorin/N-EGFP и на M-mCherry намалява едновременно (оранжев цвят) или нито един сигнал не намалява (сив цвят).

Б. Сравняване на динамиката на намаляването на сигнала на N-EGFP между: VLP^{Omi}:M^{Ch}N^{E} R и VLP^{Wu}:M^{Ch}N^{E}R по време на интернализацията им в A549 клетки. Средната стойност на интензитета на сигнала на EGFP е представена като всички проследени частици са приравнени към момента, когато започва намаляването на сигнала на N-EGFP (0 мин). Усреднения интензитет на M-mCherry на същите частици също е представен. Светлите линиите под и над линията (Error Bars) показват стандартното отклонение. За VLP^{Wu}:M^{Ch}N^{E}R n=17, а за VLP^{Omi}:M^{Ch}N^{E} n=34.

В. Сравняване на динамиката на намаляването на сигнала на N-EGFP и M-pHluorin между: VLP^{Wu}:M^{Ch}M^{pH}R и VLP^{Wu}:M^{Ch}N^{E}R по време на интернализацията им в A549 клетки. Средната стойност на интензитета на сигнала на EGFP или pHluorin е представена като всички проследени частици са приравнени към момента, когато започва намаляването на сигнала на N-EGFP или pHluorin (0 мин). Усреднения интензитет на M-mCherry на същите частици също е представен. Светлите линиите под и над линията (Error Bars) показват стандартното отклонение. За VLP^{Wu}:M^{Ch}M^{pH}R n=55, а за A549 VLP^{Wu}:M^{Ch}N^{E}R n=17.

Г. Разпределение на времевите интервали между свързването на вирусо-подобните частици към мембраната на клетката и началото на падането на сигнала на M-pHluorin или N-EGFP на всяка измерена вирусо-подобна частица от типа VLP^{Wu}:M^{Ch}M^{pH}R, VLP^{Wu}:M^{Ch}N^{E}R, или VLP^{Omi}:M^{Ch}N^{E}R, по време на интернализацията в A549 клетки. Използван е двустранен t-тест на Стюдент за статистически анализ при следните критерии: NS $p>0.01$; * $p<0.01$ За VLP^{Wu}:M^{Ch}N^{E}R n=17, for VLP^{Omi}:M^{Ch}N^{E}R n=34 and VLP^{Wu}:M^{Ch}M^{pH}R n=55.

Д. Разпределение на времевите интервали между свързването на вирусо-подобните частици към мембраната на клетката и увеличаването на скоростта им по време на интернализацията в A549 клетки. Частиците са от тип: VLP^{Wu}:M^{Ch}M^{pH}R, VLP^{Wu}:M^{Ch}N^{E}R или VLP^{Omi}:M^{Ch}N^{E}R. Използван е двустранен t-тест на Стюдент за статистически анализ при следните критерии: NS $p>0.01$; * $p<0.01$ За VLP^{Wu}:M^{Ch}N^{E}R n=17, за VLP^{Omi}:M^{Ch}N^{E}R n=34 и за VLP^{Wu}:M^{Ch}M^{pH}R n=55.

Е. Разпределение на времевите интервали между началото на намаляването на сигнала на M-pHluorin или N-EGFP на вирусо-подобните частици и увеличаването на скоростта им по време на интернализацията в A549 клетки. Частиците са от тип: VLP^{Wu}:M^{Ch}M^{pH}R, VLP^{Wu}:M^{Ch}N^{E}R или VLP^{Omi}:M^{Ch}N^{E}R. Използван е двустранен t-тест на Стюдент за статистически анализ при следните критерии: NS $p>0.01$; * $p<0.01$ За VLP^{Wu}:M^{Ch}N^{E}R n=17, за VLP^{Omi}:M^{Ch}N^{E}R n=34 и за VLP^{Wu}:M^{Ch}M^{pH}R n=55.

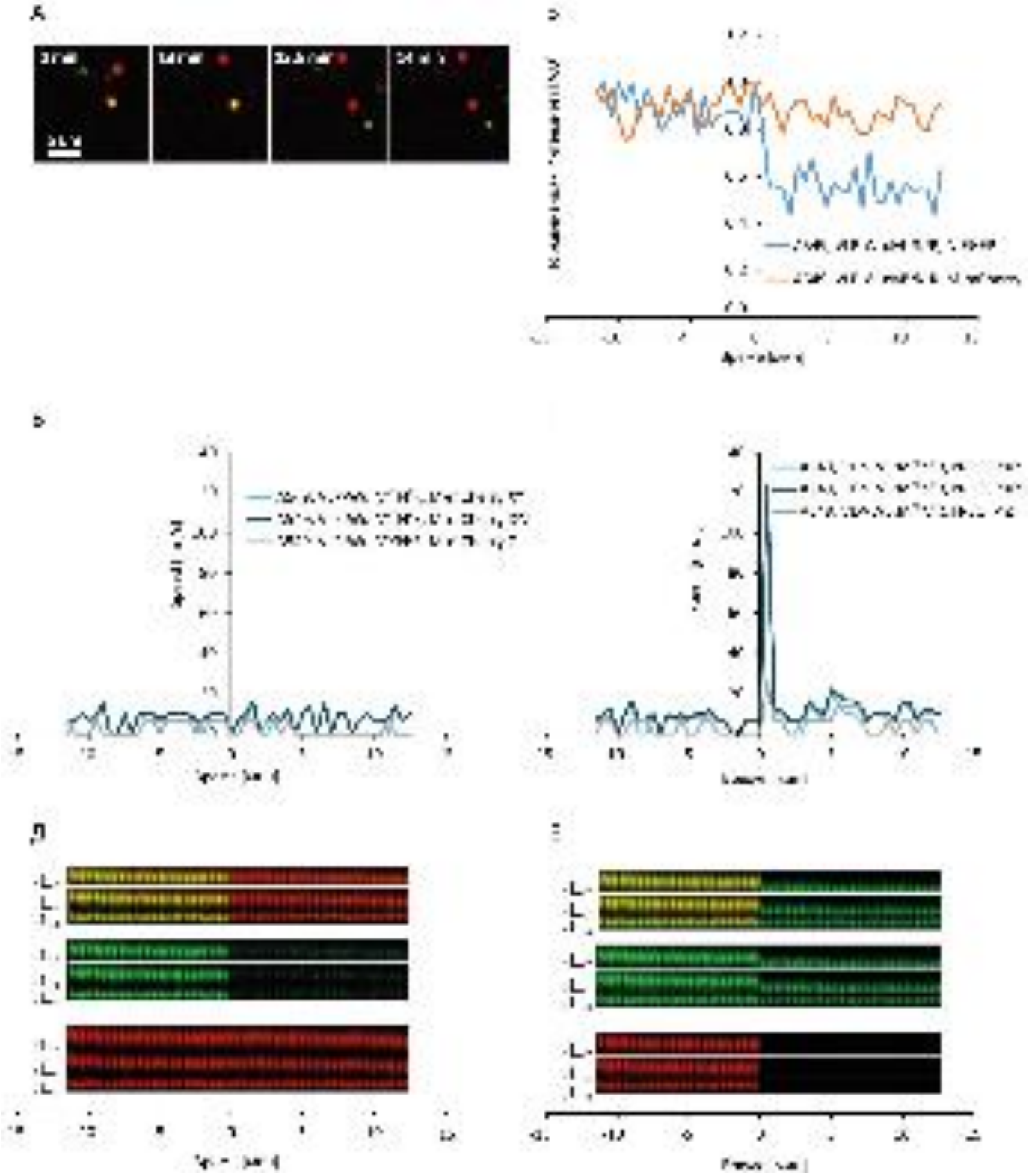
Ж. Схематично представяне на основните процеси във времето свързвани с интернализацията на див тип или мутантни вирусо-подобни частици Омикрон в VeroE6 или A549 клетки.

З. Представителни графики за скорост и интензитет на избраната частица (горе) и съответните кимографи (обединен, M-mCherry и N-EGFP) във всички измерения (долу) за една единствена, избрана VLP^{Wu}:M^{Ch}N^{E}R в процес на интернализация в A549 клетка. При избрания пример скоростта на частицата се увеличава в момента, когато интензитета на N-EGFP сигнала ѝ започва да намалява.

И. Същата структура като (З) за вирусо-подобна частица от типа VLP^{Omi}:M^{Ch}N^{E}R.

Скоростта на падането на N-EGFP сигнала в VLP^{Wu}:N^{eG}M^{Ch}R е по-бавна от скоростта на падане на M-pHluorin сигнала в VLP^{Wu}:M^{Ch}M^{pH}R (Фиг. 14В). По-бавната

скорост на падане на сигнала на EGFP предполага, че освобождаването не става в една бърза стъпка, а е по-скоро продължителен, бавен процес, който не може да бъде проследен след определен момент. Само в един единствен случай (от 18 вирусо-подобни частици) успяхме да проследим N-EGFP сигнала след бързото освобождаване на нуклеокапсида. Ние проследихме и двата флуоресцентни сигнала (M-mCherry и N-EGFP) на тази вирусо-подобна частица и забелязахме, че M-mCherry сигналът не се премества в Z равнината по време на разделянето на сигналите, докато N-EGFP сигналът го прави. Това предполага, че в този случай фузията се е получила или на клетъчната мембрана или по време на ингресията на частицата, преди стартирането на активното движение по микротубулната мрежа (Фиг. 15). Това, което забелязахме беше, че в общия случай няма статистически значима разлика между интервалите на разпределение от свързването на частиците към мембраната и началото на падането на сигнала на M-pHluorin или увеличаването на скоростта за VLP^{Wu}:$M^{Ch}M^{pH}R$ (Таблица 1) от една страна, и свързване на частицата към мембраната на клетката и началото на падането на интензитета на сигнала или увеличаването на скоростта на N-EGFP на VLP^{Wu}:$N^{eG}M^{Ch}R$ (Фиг. 14 Г, Д, Е) от друга. Тези резултати подсказват, че ацидификацията на частиците се случва едновременно с освобождаването на нуклеокапсида им.



Фигура 15. Проследяване на освобождаването на нуклеокапсида от вирусо-подобна частица след интернализацията ѝ.

А. Поредица от микроскопски изображения, проследяващи освобождаването на N-EGFP по време на интернализация на VLP^{Wu}:$M^{Ch}N^{E}R$ в A549 клетки. Може да се наблюдава разделянето на нуклеокапсида (N-EGFP) от мембраната на вирусо-подобната частица (M-mCherry).

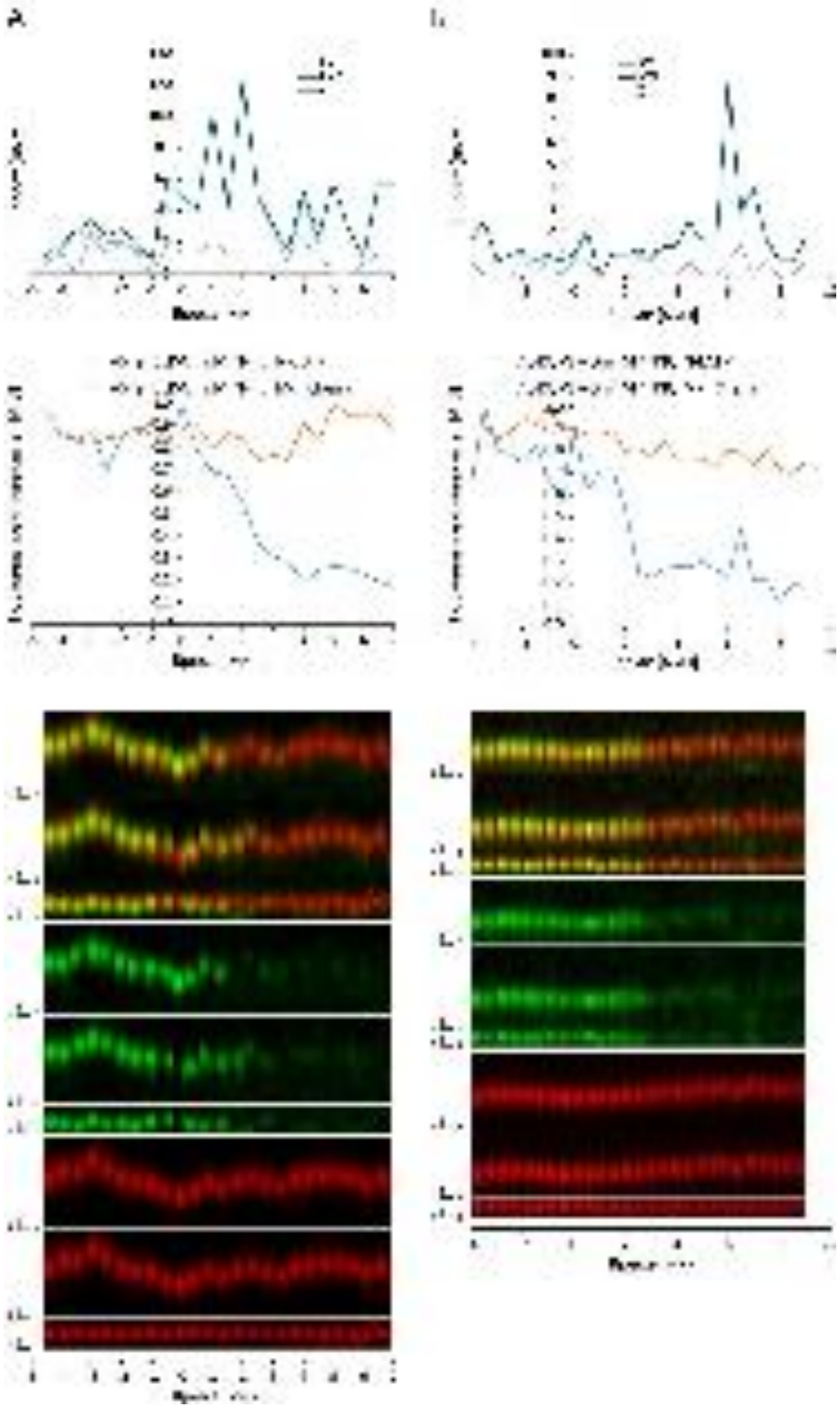
Б. Динамика на промените на N-EGFP и M-mCherry сигналите по време на освобождаването на нуклеокапсида от вирусо-подобната частица, показана в (А).

В. Скоростта на частицата от (А), измерена на база движението на M-mCherry сигнала.

Г. Скоростта на частицата от (А), измерана на база движението на N-EGFP сигнала. Забелязва се увеличаване на скоростта, което липсва при измерване направено на база M-mCherry.
Д. Кимографи, направени по всички оси на база проследяване по M-mCherry сигнала.
Е. Кимографи, направени по всички оси на база проследяване по N-EGFP сигнала. Забелязва по движение по Z-оста, което липсва при проследяване по M-mCherry сигнала.

След като получихме информация за освобождаването на нуклеокапсида при див тип частици, като следваща стъпка, искахме да проверим дали динамиката се различава при частици от Омикрон вариант. За целта използвахме VLP^{Omi}:$M^{Ch}N^{eE}R$, накратко от SARS-CoV-$2^{Omicron}$:(E, S, M&M-mCherry, N&N-eGFP, T20 RNA). Това което ни учуди, беше че процентът на двойно белязани частици се увеличи значително – от 1% за VLP^{Wu}:$M^{Ch}N^{eE}R$ до 2-3% за VLP^{Omi}:$M^{Ch}N^{eE}R$. И все пак трябва да отбележим, че този процент е много по-нисък от процента двойно белязани частици от типа VLP^{Omi}:$M^{Ch}M^{pH}R$- над 90%.

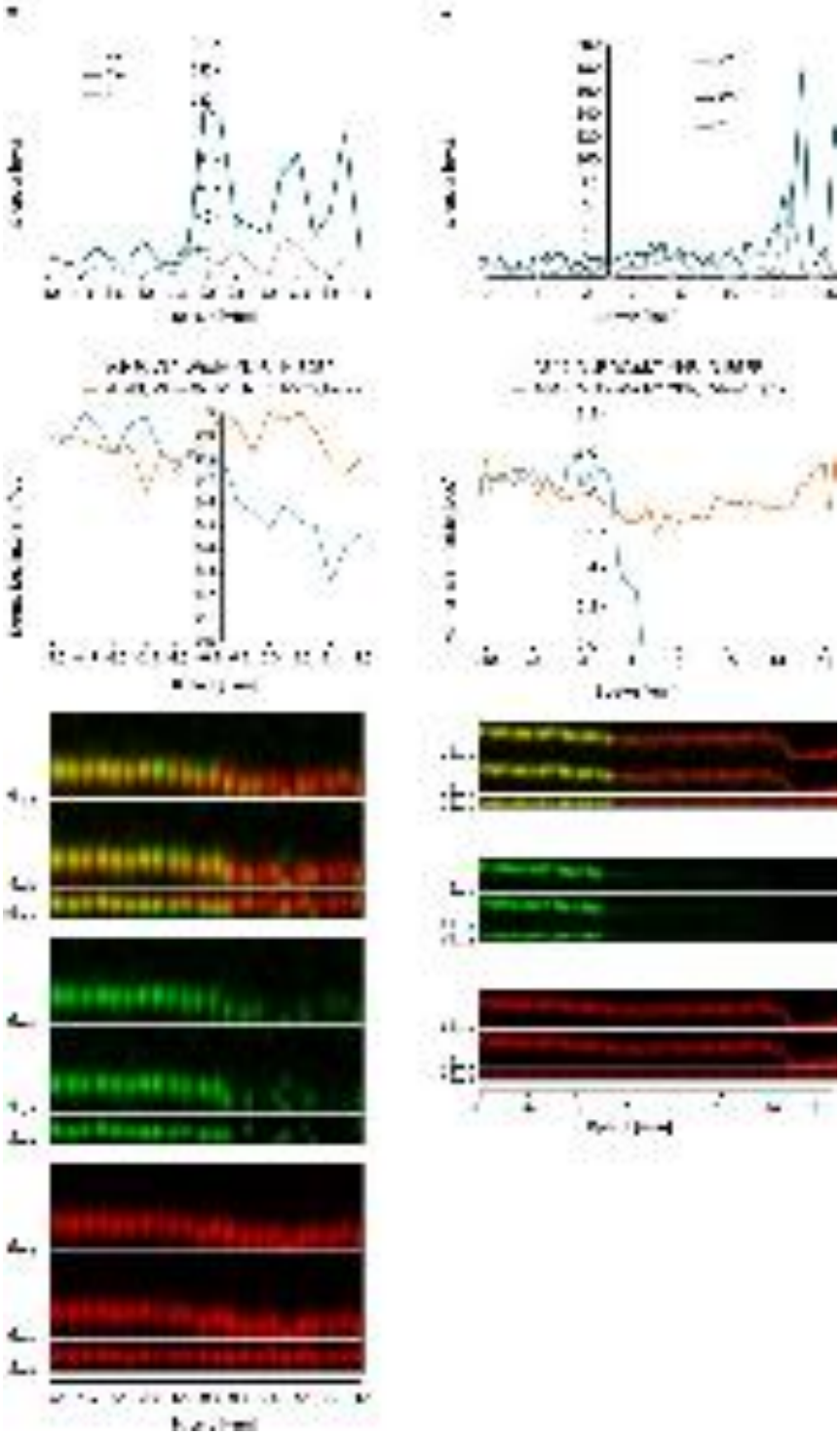
След анализ на VLP^{Omi}:$M^{Ch}N^{eE}R$, установихме, че при приблизително 80% от частиците N-EGFP сигналът изчезва преди да изчезне сигналът на mCherry, което подсказва за 23% по-ефективно освобождаване на нуклеокапсида в сравнение с VLP^{Wu}:$M^{Ch}N^{eE}R$ (Фиг. 14А). От друга страна, скоростта на освобождаването на нуклеокапсида е статистически еднаква, когато сравним див тип частици с Омикрон (Фиг. 14Б). Този резултат предполага, че и при двата типа частици освобождаването на нуклеокапсида става приблизително по едно и също време. В допълнение, не наблюдавахме разлика в интервала между свързването на частиците към мембраната на клетката и началото на падането на N-EGFP сигнала им, когато се сравняват див тип и Омикрон частици (Фиг. 14Г). Всички тези резултати демонстрират, че Омикрон мутациите нямат никакъв ефект върху стъпката на освобождаването на нуклеокапсида от вирусо-подобните частици. Нещо повече, при Омикрон вирусо-подобните частици, увеличаване на скоростта се случва непосредствено след освобождаването на нуклеокапсида им, както беше и при дивия тип частици (Фиг 14Д, Е и таблица 1). Този резултат индикира, че в общия случай сливането на мембраната на вирусо-подобната частица с мембраната на клетката се случва времево преди началото на микротубулния транспорт. От друга страна, на ниво единична частица, ние наблюдавахме примери, при които, увеличаването на скоростта се осъществява преди, по време на или след освобождаването на нуклеокапсида (Фиг. 143, И, 16 и 17), което отново потвърждава, че няма казуална връзка между тези две събития, както беше наблюдавано и при падането на pH.



Фигура 16. Примери за единични VLP^{Omi}:M^{Ch}N^{E}R интернализационни събития в A549 клетки.

А. Представителни графики на скоростта (горе) и кимографи (обединени, M-Cherry и N-EGFP) във всички измерения (долу) за една единствена вирусо-подбна частица, която е в процес на интернализация, където скоростта на частицата започва да се увеличава преди интензитета на N-EGFP сигнала ѝ да започне да намалява.

Б. Същата структура като (А), но за частица, при която скоростта ѝ започва да се увелича, след като интензитета на EGFP сигнала на N-структурния ѝ белтък започва на намалява.



Фигура 17. Примери за единични VLP^{Wu}:M^{Ch}N^{E}R интернализационни събития в A549 клетки.

А. Представителни графики на скоростта (горе) и кимографи (обединени, M-Cherry и N-EGFP) във всички измерения (долу) за една единствена вирусо-подбна частица, която е в процес на интернализация, където скоростта на частицата започва да се увеличава преди интензитета на N-EGFP сигнала ѝ да започне да намалява.

Б. Същата структура като (А), но за частица, при която скоростта ѝ започва да се увелича, след като интензитета на EGFP сигнала на N-структурния ѝ белтък започва на намалява.

В заключение, по време на работата върху този проект, успяхме да разработим специализирани софтуерни решения, за да реконструираме последователността на пет есенциални стъпки от вирусната интернализация на ниво единични вирусо-подобни частици. Тези пет стъпки са както следва: свързване на вирусо-подобната частица към мембраната на клетката, начало на намаляването на pH, начало на освобождаването на нуклеокапсида, колокализация между Динамин и вирусо-подобната частица и началото на активното микротубулно-зависимо движение на частиците (Фиг. 143, таблица 1). Сравняването между тези пет събития показа, че около 4 минути след свързването към мембраната на VeroE6 клетки и 12 минути след свързването към мембраната на A549 клетки, pH на частиците започва бързо да намалява, което пък, от своя страна, се случва едновременно със свързването на Динамина и освобождаването на нуклеокапсида, а веднага след това се инициира активният микротубулен транспорт на тези частици. Нашите резултати показват, че фузията на частиците (освобождаването на N-нуклеокапсида) се случва едновременно или веднага след формирането на ендозома. За наше учудване, вирусо-подобните частици не колокализираха с Rab-5a позитивните ранни ендозоми по време на интернализацията си. Два до три пъти по-бързата интернализация на вирусо-подобните частици в VeroE6 клетки в сравнение с A549 би могла да обясни по-голямата чувствителност на VeroE6 клетките към SARS-CoV-2 инфекция. Друг интересен резултат е, че нито Омикрон, нито del-1 мутациите имаха ефект върху стъпките на интернализация на SARS-CoV-2 вирусо-подобните частици.

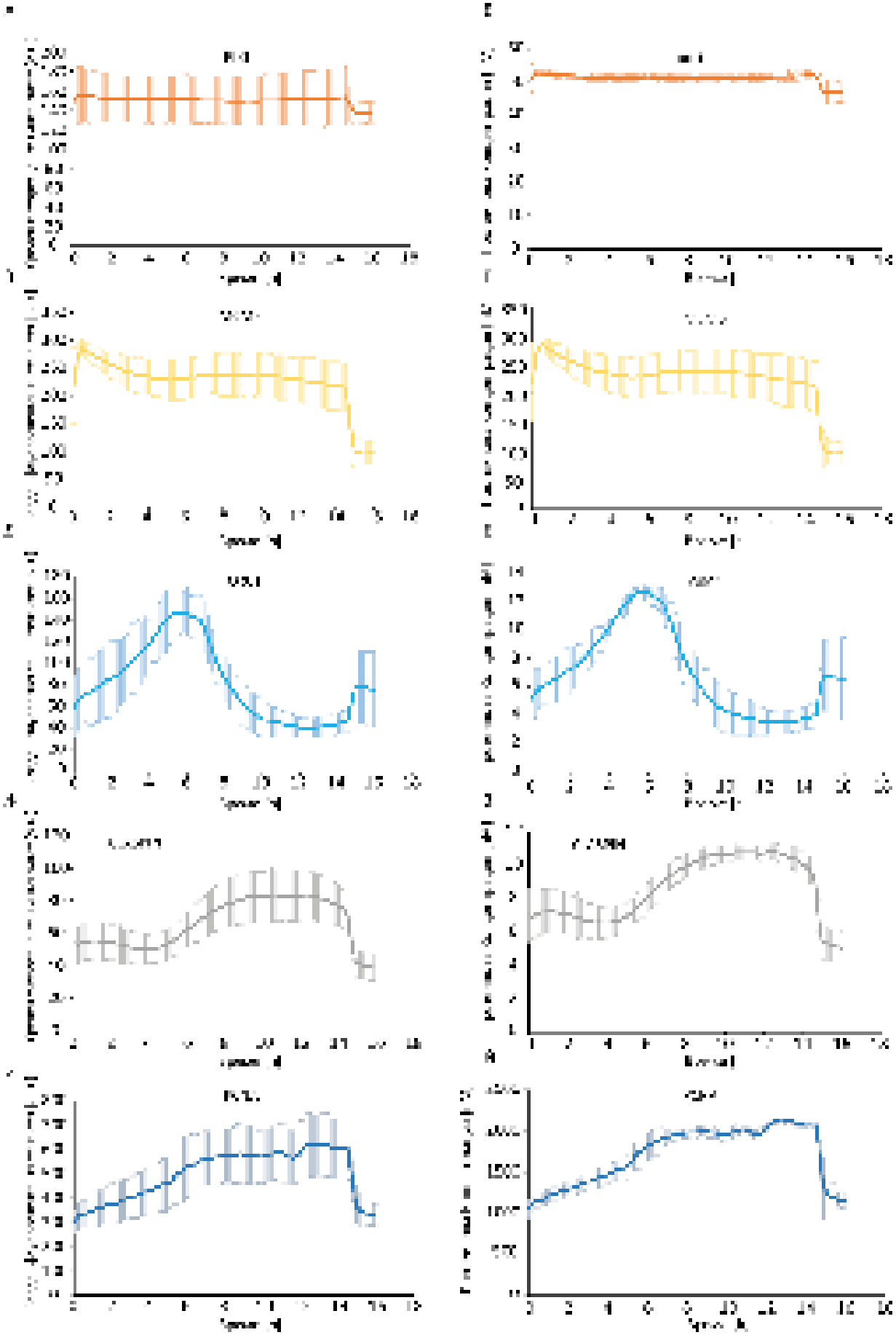
Тъй като темата на тази дисертация беше изследването на динамиката на различни биологични системи. За следваща цел си поставихме да изследваме динамичните промени в различни репликационно-свързани белтъци по време на целия клетъчен цикъл на ниво единични еукариотни клетки.

2. Изследване на динамиката на нивата на репликационно-свързани белтъци по време на клетъчния цикъл

2.1. Създаване на двойно белязани клетъчни линии с цел изучава на нивата на белтъците по време на клетъчния цикъл

Надеждното базирано на флуоресценция измерване, на динамичните промени в нивата на белтъците по време на клетъчния цикъл изисква Rif-1, Orc-1, Mcm-6, Claspin и PCNA белтъците да бъдат експресирани при физиологични или близки до физиологичните си нива. Това се постига, като белтъците се експресират под техните ендогенни регулаторни елементи, като по този начин сме сигурни, че динамиката им ще е същата, като тази на небелязаните такива. За да сме сигурни, че изследваните бълтъци притежават гореспоменатите характеристики, ние създадохме двойно белязани HeLa Kyoto клетъчни линии, използвайки BAC (bacterial artificial chromosome) технологията [41]. Тези вектори съдържат всички ендогенни регулаторни елементи, включително интрони и екзони, което подсигурява правилния сплайсинг вариант на изследваните белтъци. За целта на този проект, изследвахме пет така получени клетъчни линии, които експресират свързан към EGFP - ORC1, RIF1, Claspin, MCM6 или PCNA, заедно с PCNA, белязан с mCherry.

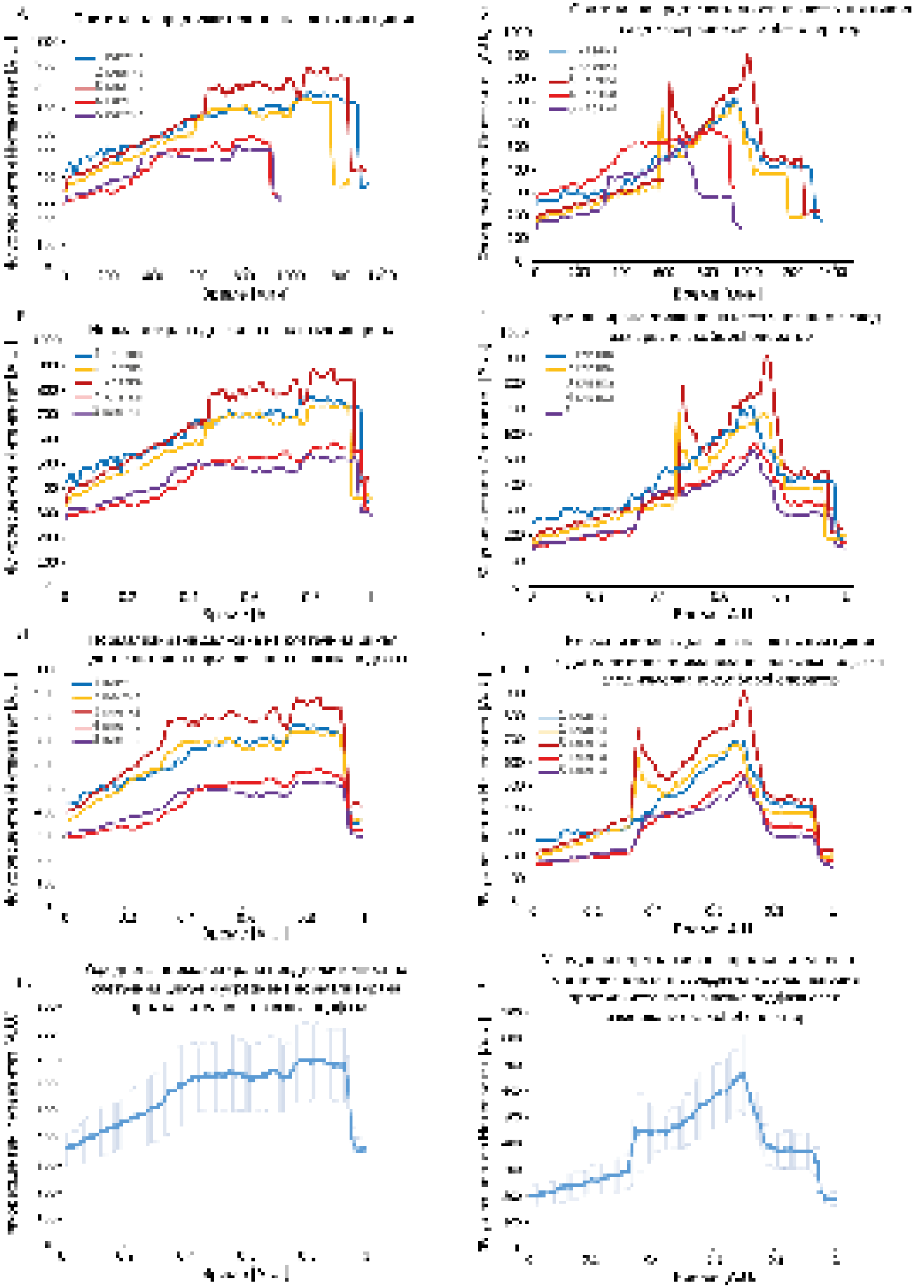
Измерихме средния интензитет на ядрото за всички флуоресцентно белязани белтъци по време на целия клетъчен цикъл (Фиг. 18А, В, Д, Ж, И). Решихме да измерваме средния интензитет, а не тоталния, защото средният отразява по-добре разликите в белтъчната концентрация. Това, от своя страна, има основна роля за определяне на скоростта на реакциите, в които изследваните белтъци участват. Използвайки измерванията за концентрацията на белтъците на база мас-спектроскопия на HeLa Kyoto клетъчна линия, направени от друга лаборатория [42], ние измерихме концентрационните профили по време на клетъчния цикъл на изследваните белтъци (Фиг. 18Б, Г, Е, З, Й). Тук е важно да споменем, че избраните протеини функционират в ядрото и избирайки да мерим средния интензитет, неутрализираме ефекта от промените в размера на ядрото, които са характерни по време на клетъчния цикъл.



Фигура 18. Промени в средния флуоресцентен интензитет и белтъчната

концентрация на RIF1 (А ,Б), MCM6 (В, Г), ORC1 (Д, Е), CLASPIN (Ж, З) и PCNA (И, Й) по време на клетъчния цикъл. Резултатите са представени като средна стойност ± стандартното отклонение.

Средната дължина на клетъчния цикъл, измерена като периода от началото на G1 фазата до края на M фазата при наблюдение чрез флуоресцентна спининг-диск конфокална микроскопия на HeLa Kyoto клетки, беше 15 h 58 min ± 1 h 56 min. Детайлното разглеждане на подфазите на клетъчния цикъл, получено след анализ на всички измерени клетки разкри, че средната дължина на G1фазата е с продължителност от 5 ч. 25 мин ± 1 ч 13 мин, на S фазата е 7 ч ± 49 мин, на G2 фазата е 2 ч 38 мин ± 45 мин, а средната продължителност на M фазата е 55 ± 34 мин. Това, което ни направи впечатление беше, че от клетка до клетка има голяма разлика както в продължителността на целия клетъчен цикъл, така и на всяка индивидуална фаза. Като следствие е невъзможно директното сравняване на получените данни от флуоресценцията на всяка клетка. За да преодолеем този проблем, направихме нормализация както за продължителността на клетъчния цикъл, така и за продължителността на всяка една подфаза (Фиг. 19). Детайлни обяснения за тези нормализации са описано в раздел Материали и Методи точка 9. В резултат от така направените нормализации успяхме да сравним флуоресценцията както между индивидуалните клетки от една клетъчна линия, така и между клетъчните линии по време на целия клетъчен цикъл. Освен това, те ни позволиха да сравним експресионните профили на изследваните белтъци в контекста на клетъчния цикъл.

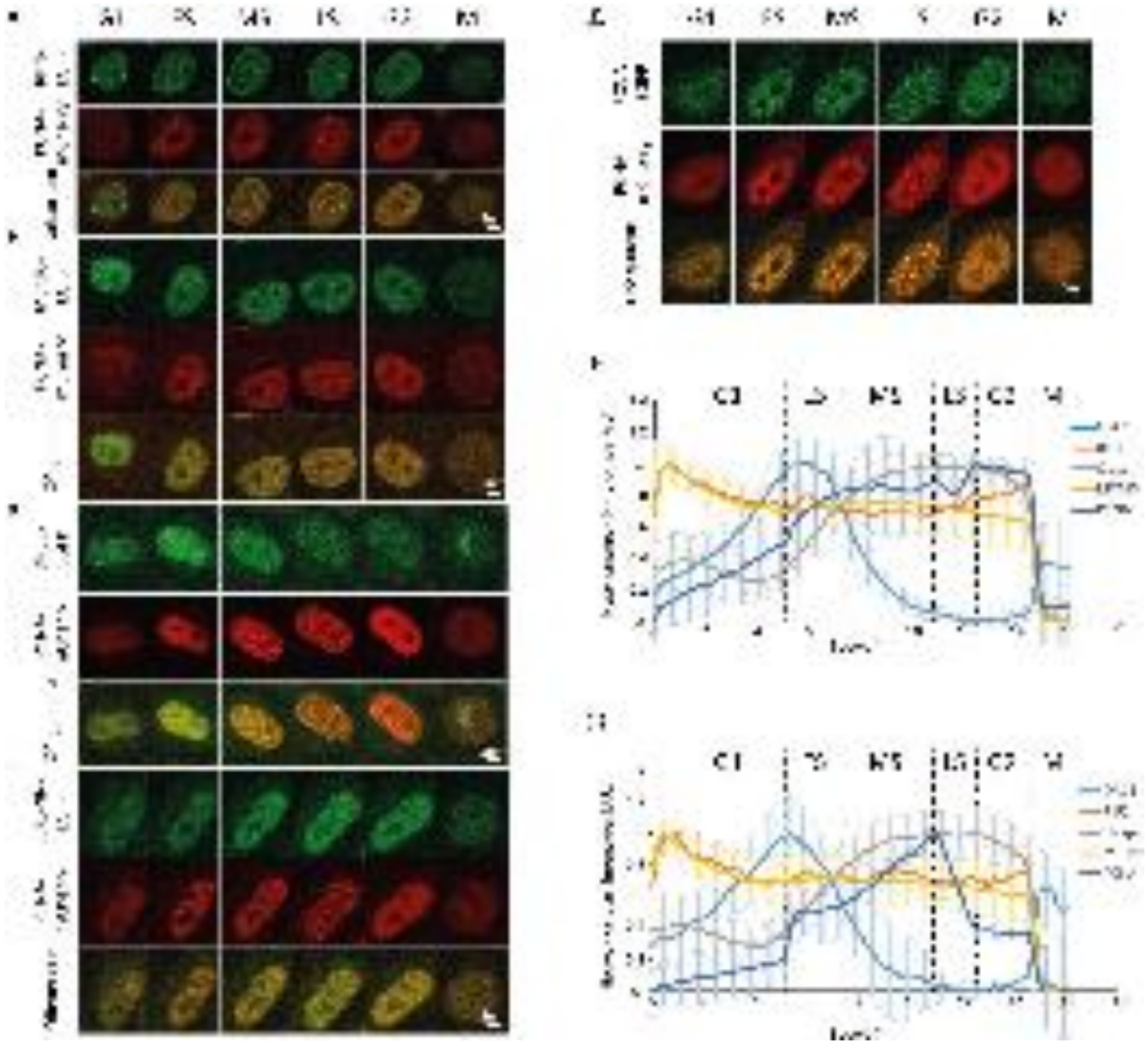


Фигура 19. Нормализация на клетъчния цикъл и на всяка подфаза на

клетъчния цикъл.
А.Измереният флуоресцентен интензитет на 5 различни mCherry HeLa Kyoto клетки с различна продължителност на клетъчния цикъл.
Б. Клетките от (А) измери със Sobel оператор.
В. Клетките от (А) с нормализирана продължителност на клетъчния цикъл от 0 до 1.
Г. Клетките от (Б) с нормализирана продължителност на клетъчния цикъл от 0 до 1.
Д. Клетките от (А) с нормализирана продължителност на клетъчния цикъл, както и нормализирана продължителност на всяка една подфаза.
Е. Клетките от (Б) с нормализирана продължителност на клетъчния цикъл, както и нормализирана продължителност на всяка една подфаза.
Ж. Усреднената стойност на клетките от (А) след нормализация както на целия клетъчен цикъл, така и на всяка една подфаза (n=10 клетки). Данните са представени като средната стойност ±стандартното отклонения.
З. Усреднената стойност на клетките от (Б) след нормализация както на целия клетъчен цикъл, така и на всяка една подфаза (n=10 клетки). Данните са представени като средната стойност ±стандартното отклонения.

2.2. Измерване на флуоресценцията на PCNA посредством Sobel оператора за изпозлването ѝ като индикатор за ранна, средна и късна S-фаза

Както е показано от много лаборатории, PCNA репликационният белтък се натрупва в репликационни фокуси по време на клетъчния цикъл [7–9,43]. Тези фокуси са много на брой, но малки по размери и дисперсни в началото на S фазата. С прогресията на S фазата фокусите стават все по-малко и по-големи по размер, докато не изчезнат напълно в края на тази фаза от клетъчния цикъл. Именно този фенотип използвахме при определяне на клетъчната фаза при микроскопско наблюдение за продължителен период от време. Като първа стъпка, трябваше да се убедим, че използваният от нас миши PCNA-mCherry отговаря на човешкия такъв и следва горе описания фенотип. За тази цел използвахме клетъчна линия, при която стабилно се експресираха както mPCNA-mCherry, така и hPCNA-EGFP. Получените резултати показаха идентичност на поведението на двата ортолога при продължително микроскопско наблюдение (Фиг. 20Д) и следователно можехме да считаме резултатите си за адекватни и годни при съставянето на заключения. Като следваща стъпка, измерихме усреднения интензитет на PCNA и видяхме, че първоначално белтъкът се натрупва постепенно от началото на G1 подфаза до около 2 часа след появяването на първите репликационни фокуси, след което следва по-слабо изразено натрупване до достигане на плато в G2 фаза (Фиг. 20Д, Е, Ж).



Фигура 20. Промени в нивата и разпространението на репликационно-асоциираните белтъци по време на клетъчния цикъл.

А. Представителни снимки от микроскопското наблюдение на HeLa Kyoto клетки, които ко-експресират RIF1-EGFP и миши PCNA-mCherry.

Б. Представителни снимки от микроскопското наблюдение на HeLa Kyoto клетки, които ко-експресират MCM6-EGFP и миши PCNA-mCherry.

В. Представителни снимки от микроскопското наблюдение на HeLa Kyoto клетки, които ко-експресират ORC1-EGFP и миши PCNA-mCherry.

Г. Представителни снимки от микроскопското наблюдение на HeLa Kyoto клетки, които ко-експресират CLASPIN-EGFP и миши PCNA-mCherry.

Д. Представителни снимки от микроскопското наблюдение на HeLa Kyoto клетки, които ко-експресират човешки PCNA-EGFP и миши PCNA-mCherry.

Е. Нормализирани усреднени профили на интензитета на изследваните блетъци по време на клетъчен цикъл със средна продължителност от 15 ч 58 мин. ES-ранна S фаза, MS-средна S фаза, LS-късна S фаза Резултатите са илюстрирани като средния интензитет±стандартното отклонение.

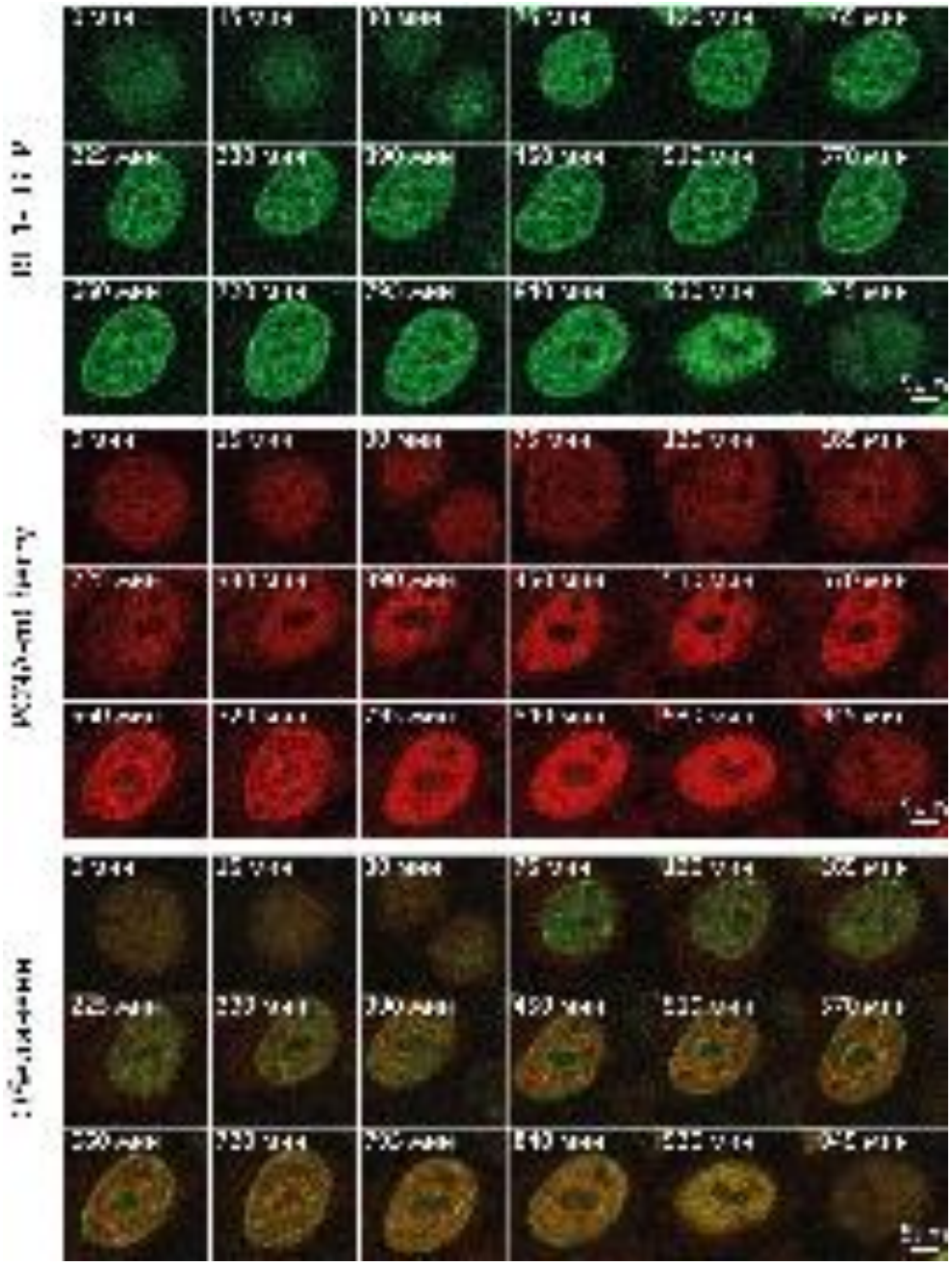
Ж. Профилите от (З) но след прилагане на Sobel оператор. Резултатите са показани като средния интензитет±стандартното отклонение.

Промените само в експресията на PCNA белтъка сами по себе си са недостатъчни, за да се дискриминира между ранна, средна и късна S фаза. Поради тази причина и имайки предвид ясно изразения фенотип на белтъка по време на прогресията на S фазата, ние си поставихме за цел да разработим метод, който ще ни позволи да околичествим тази промяна, като по този начин да ни позволи да различим времево, по безпристрастен начин ранна, средна и късна S фаза. За постигането на тази цел използвахме Sobel оператора. Това е градиентно базиран филтър, който усилва интензитета на границата между структурите в изображението. Измерването на интензитета, след като приложихме този оператор, ни позволи да различим ядро, в което има много на брой и дисперсни, малки фокуси, от такова, което има малко на брой, но големи фокуси. Като резултат, ние успяхме да различим началото и края на S фазата. Началото бележи рязкото изкачване на кривата, получена след осредняването на получения интензитет, измерен след използването на Sobel оператора. Това се дължи на формирането на множеството малки фокуси, наблюдавани при микроскопията на тази клетъчна линия. Краят на S фазата, от друга страна, се забелязва след края на рязкото падане на кривата и промяната ѝ в плато, което вероятно отразява разпадането на множеството големи репликационни фокуси. След внимателно разглеждане на кривата ние установихме, че тя отразява подфазите на S фазата, а именно: ранна S фаза - от началото на рязкото увеличаване до края на първото плато (формирането на множество дисперси малки фокуси), средна S - от края на първото плато до максимума на кривата (намаляване на бройката фокуси, но увеличаването на размера им) и късна S фаза- от максимума до началото на второто плато (постепенното изчезване на всички фокуси). Използвайки Sobel оператора, ние можем надеждно, безпристрастно и количествено да определяме подфазите на S фазата на клетъчния цикъл.

2.3. RIF1

След като разраотихме метод за определяне на фазите на клетъчния цикъл, преминахме към проследяване поведението на множество репликационно-асоциирани белтъци в хода на един цикъл. Започнахме с RIF1, основен регулатор на репликационната програма от дрожди до човек. Този белтък се асоциира с хроматина в началото на G1 и се натрупва в късно стартиращите начала на репликацията. Множество проучвания показват, че RIF1 чрез взаимодействието си с PP1 потиска стратирането на началата на репликацията, като противодейства на DDK-медиираната хеликазна активация [44–47]. След като знаехме, че RIF1 има така ясно изразена функция, която зависи от клетъчния цикъл, ние искахме да охарактеризираме както експресията, така и локализацията му по време на целия клетъчен цикъл. Микроскопията за

продължителен период от време на RIF1-EGFP/mCherry-PCNA разкри минимални флуктуации в средния флуоресцентен интензитет и концентрацията на белтъка (Фиг.18А, Б). Нормализирането на усреднения флуоресцентен интензитет между 0 и 1, стандартна процедура за извличането дори на минимални динамични промени в нивата на белтъка, разкри първоначално увеличаване в нивата на RIF1 по време на G1 фазата от клетъчния цикъл. За да сме по-точни, нивото на белтъка достига своя максимум за клетъчния цикъл 30 минути след започването на G1 фазата, след което следва постепенно намаляване на нивата му, което достига плато със започването на S фазата (Фиг. 20А, Е,Ж и Фиг. 21). Ние забелязахме, че от старта на G1 фазата, RIF1 се локализира на периферията на ядрото и около ядърцата, което отговаря на функцията му за инхибиране на късните начала на репликацията [44–47]. След прилагането на Sobel оператора не видяхме разлика с получения нормализиран флуоресцентен интензитет, което предполага липса на промени в разпространението на белтъка между фазите на клетъчния цикъл (Фиг. 20Ж). Наистина, след внимателния анализ на микроскопските изображения, ние забелязахме, че фенотипа на разпределиние на RIF1 се запазва от началото на G1 до края на G2 фазите, дори след като репликацията е приключила. Взети заедно, всички тези резултати показват, че нивата на RIF1 белтъка достигат своя максимум в раните етапи на G1 фазата и значително намалят до достигането на S фазата, докато локализацията му остава не роменена от G1 до M фазите на клетъчния цикъл.

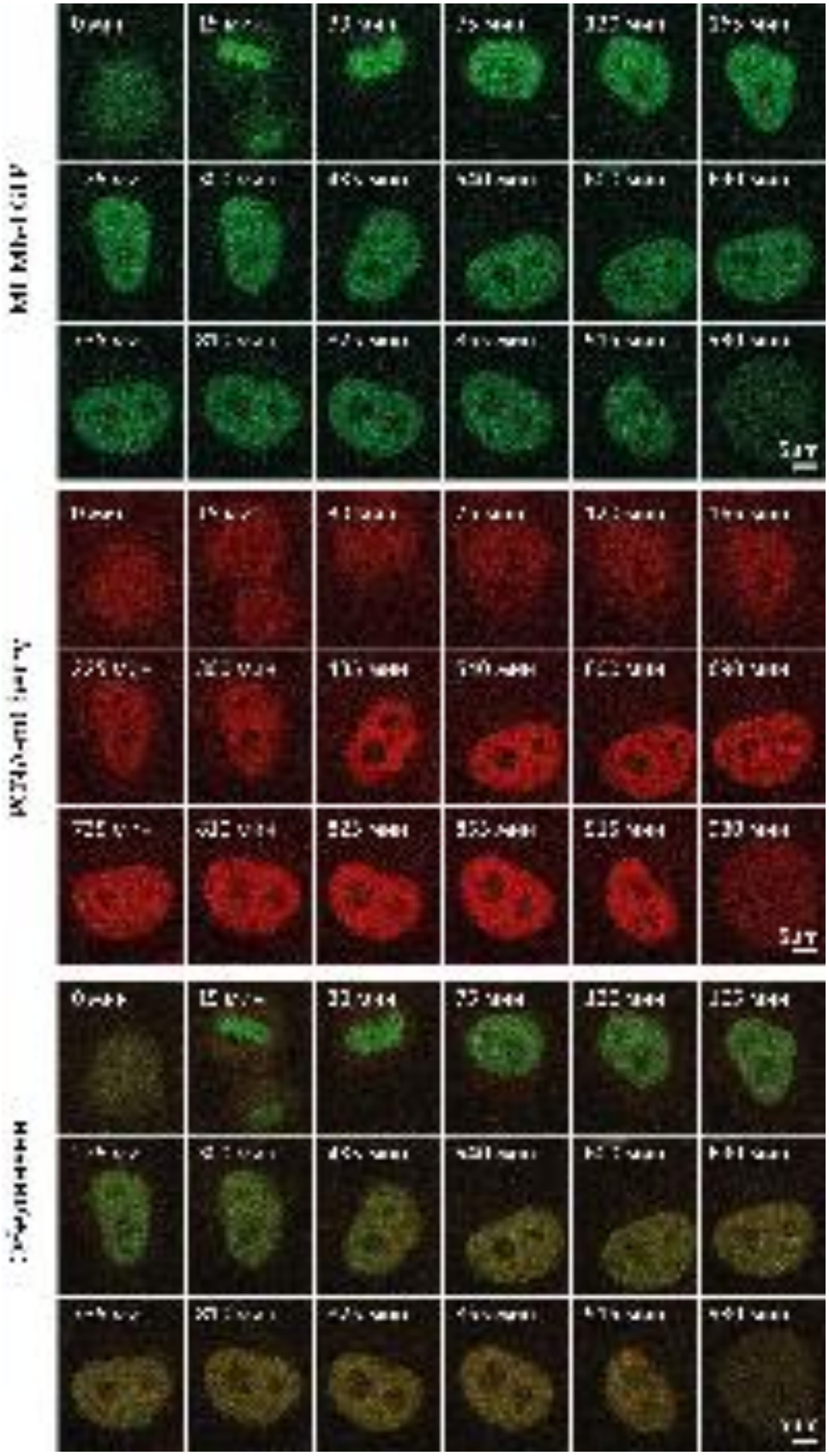


Фигура 21. Представилтени изображения от микроскопията за продължителен период от време на RIF1-EGFP/mCherry-PCNA HeLa Kyoto клетъчната линия.

2.4. MCM6

Тъй като е доказано, че има ясна функционална връзка между RIF1 и MCM6 белтъците в репликационата програма [44], ние искахме да измерим и определим нивата и разпределението на MCM6 белтъка в клетъчния цикъл и след това да сравним получените резултати с тези, които вече имахме за RIF1. MCM6 субединицата е част от MCM2-7 комплекса, който е част от репликативната хеликаза при висши еукариотни организми. MCM2-7 комплексът се натоварва върху вече закачен към

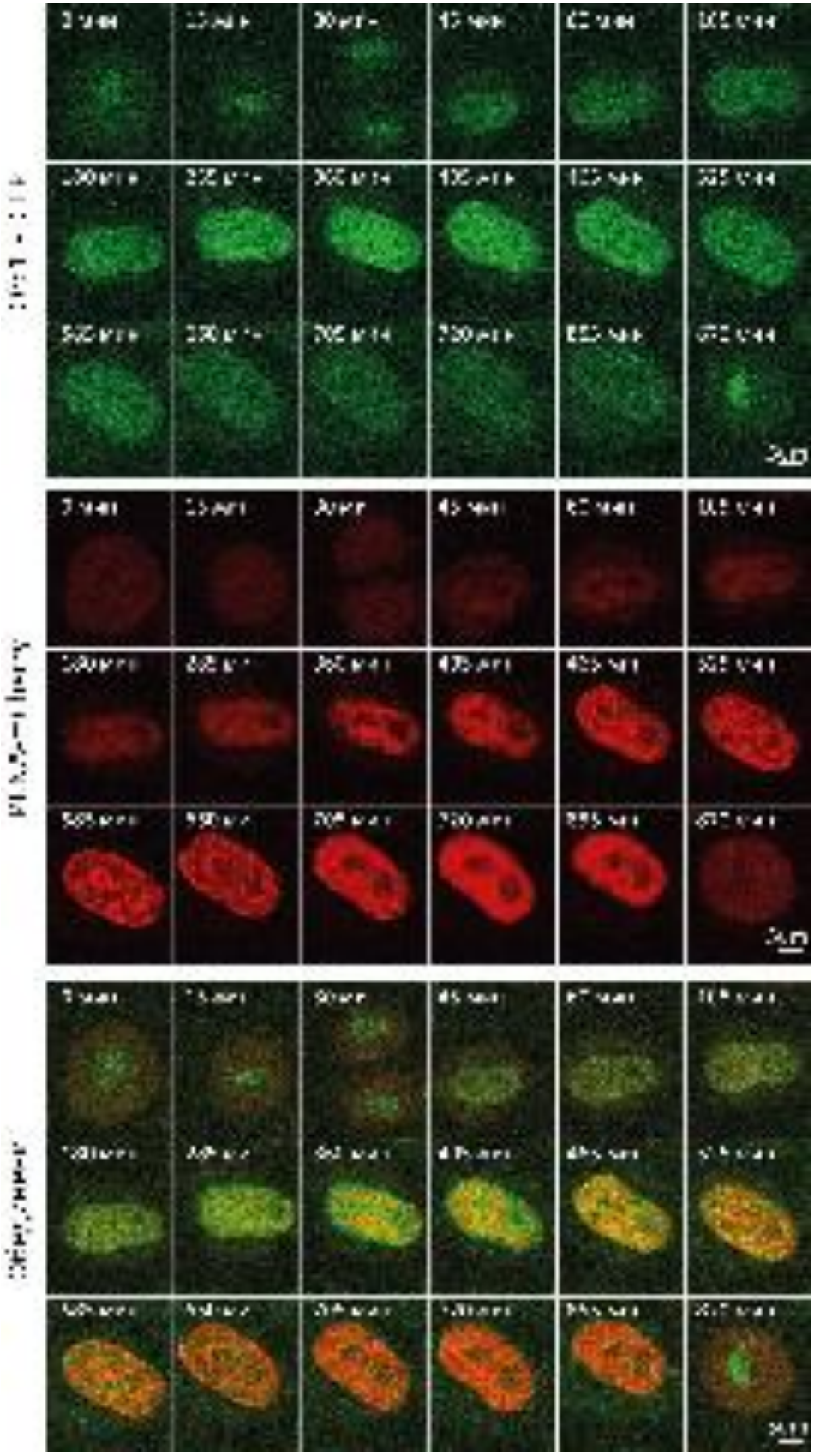
последователност за начало на репликация ORC комплекс, като така се формира част от пре-репликационния комплекс [48,49]. За разлика от RIF1 средният интензитет на флуоресценцията и концентрацията на MCM6 флуктуираха по време на клетъчния цикъл (Фиг. 18В, Г). След нормализация динамиката на нивата на MCM6 много приличаха на тези на RIF1 през всички фази на клетъчния цикъл. Наблюдава се пик на нивото на MCM6 през G1 около 30-тата минута, след което нивото постепенно намалява до достигане на плато през S и G2 (Фиг. 20Б, Е). Нещо, което ни направи впечатление беше, че през G1 фазата, около 100 минути преди началото на S фазата, можеха да се проследят структури на белтъка при микроскопското наблюдение до около 300 минута. За съжаление, тези фокуси бяха с много слаб интензитет и това ги правеше трудно разпознаваеми (Фиг. 22). Трябва обаче да отбележим, че с напредването на G1 фазата тези фокуси ставаха все по-ясно различими от преди това. Вероятното обяснение за това е, че с прогресията на G1 свободният MCM6, който не е част от структури, се разгражда и чрез падането на нивото му се вижда по-ясно този, участващ в структури. Тези структурите се виждаха най-ясно в началото на S фазата, като те се забелязваха около ядърцата на клетките. За разлика от структурите при RIF1, които се виждаха дори в G2 фаза, тези на MCM6 изчезвахва постепенно с прогресията на клетката през S фазата. Това е в съответствие с консенсуса, че закаченият MCM6, който не участва в активна репликация, се премахва от хроматина при преминаването на репликационна вилка с цел превенция на ре-репликация.



Фигура 22. Представилтени изображения от микроскопията за продължителен период от време на MCM6-EGFP/mCherry-PCNA HeLa Kyoto клетъчната линия.

2.5. ORC1

Като следваща стъпка, проследихме промените в нивата и концентрациите на друг лицензиращ фактор - ORC1. Този белтък е най-големият от шестте, които изграждат комплекса, разпознаващ началата на репликация - origin recognition complex (ORC). Комплексът е отговорен за разпознаването на ДНК последователности по стохастичен начин при хора, от който в S фаза, ще стартира ДНК репликация. ORC, заедно с CDC6 и CDT1 натоварват MCM2-7 хексамера на ДНК и това води до асемблирането на пре-репликационния комплекс [50,51]. Чрез имуноблотен анализ на количеството белтък от цяла клетъчна популация, беше показано че ORC1 се убиквитинилира и разгражда в ранна S фаза, след което се синтезира отново в G2 [52]. Нашите микроскопски наблюдения, разкриха, че нивата на ORC1 флуктуират в големи граници по време на клетъчния цикъл (Фиг. 20Д, Е). Нивата на белтъка се увеличават с прогресията на G1 фазата, след което достигат плато, което е с продължителност от около 2 часа, със започването на S фазата. В средата на S фазата белтъкът достига максимума си, а в началото на G2 достига своя минимум (Фиг. 20Г и Фиг. 23). Наблюдаваното намаляване в нивата на белтъка обяснихме с разграждането му след като функцията му е изпълнена. Микроскопията на двойно белязаната линия ни позволи, използвайки PCNA-mCherry, да определим точния момент, в който белтъкът започва да се разгражда - краят на ранна S фаза, началото на средна такава. Това, което ни изненада, беше че белтъкът имаше специфичен фенотип на натрупване в цялото ядро, които преминаваше в преференциално, натрупващ се в периферията на ядрото в G2 фаза. Това, което видяхме е, че имаше увеличаване на количеството ORC1 към края на G2 фаза, което е наблюдавано и от други лаборатории [50–55].

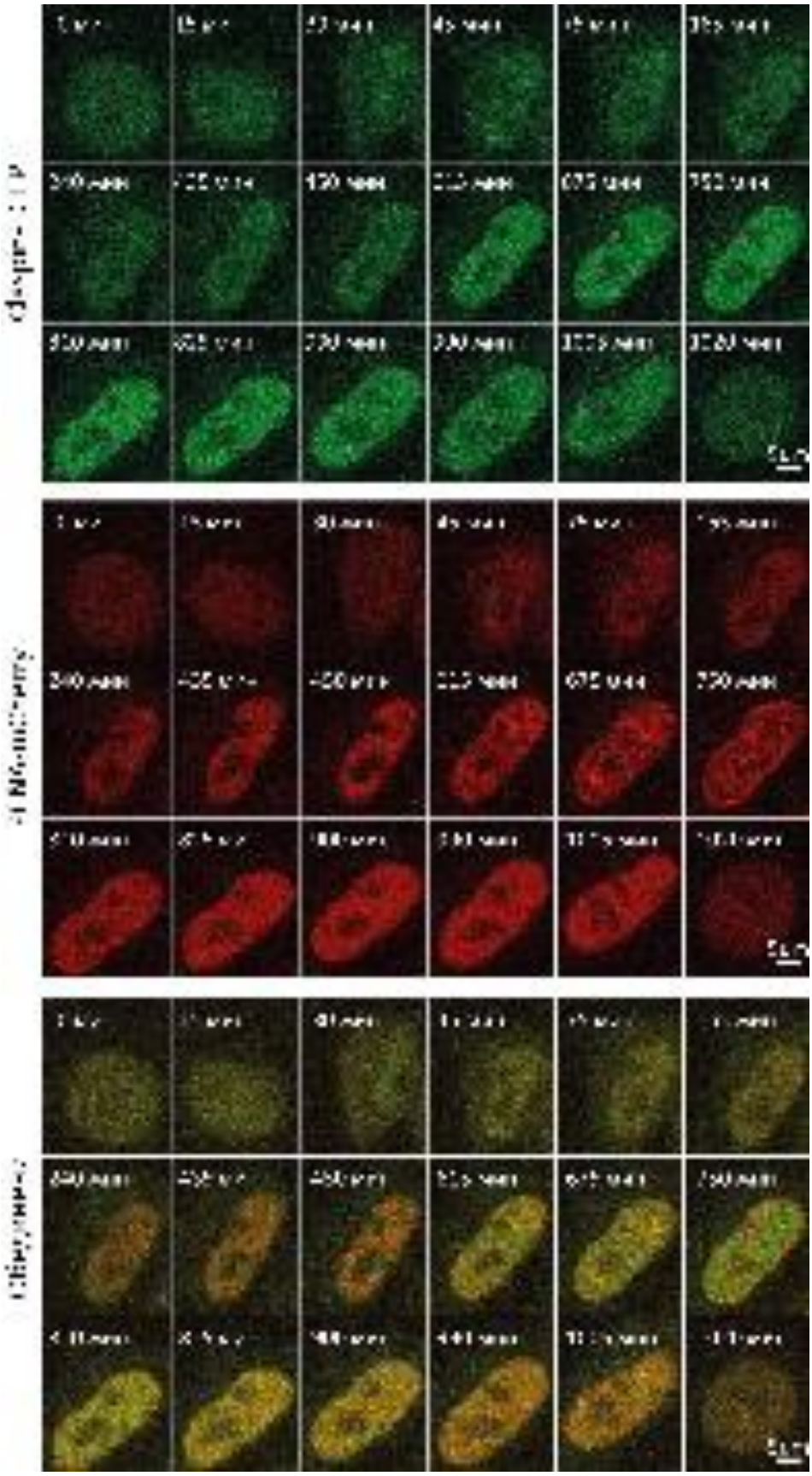


Фигура 23. Представилтени изображения от микроскопията за продължителен период от време на ORC1-EGFP/mCherry-PCNA HeLa Kyoto клетъчната линия.

2.6. CLASPIN

Claspin е адапторен белтък, нужен за ATR-медиираното фосфорилиране на Chk1 в отговор на репликационен стрес [56]. Освен това, CLASPIN е нужен, за да се поддържа постоянна скорост на репликационната вилка по време на нормална репликация, като дори има публикации, твърдящи участието на белтъка в стартирането на репликационна вилка от място за начало на репликация (Origin Firing) [57]. Имайки предвид важността на белтъка в множество процеси с голямо значение за оцеляването на клетката, нивата му се регулират много прецизно по време на клетъчния цикъл. При нормални условия нивата му са ниски по време на митоза и G1 фази и много увеличени по време репликация и G2 [58]. Използвайки нашият подход ние установихме, че нивата на CLASPIN са ниски по време на G1 фазата, след което започват да се увеличават с началото на S фазата, като достигат плато в средата на S. Това плато персистира до навлизането в митоза (Фиг. 20E, Фиг 24).

Важно е да отебележим, че намаляването на средния интензитет на флуоресценцията по време на митозата, може да е резултат от разреждането на белтъчната концентрация вследствие на разрушаването на ядрената мембрана, етап от митозата на всяка клетка. Тогава, същото количество белтък, ще се намира в цялата клетка, а не само в ядрото ѝ, което ще доведе до значително намаляване на концентрацията на съответния белтък. Както се вижда от Фиг. 20, такова намаляване на нивата се наблюдава за всички изследвани белтъци с изключение на ORC1. Всъщност нивата на ORC1 се увеличават в M фазата, като вероятно обяснение за това е свързването на белтъка към митотичните хромозоми, които са много по-кондензирани от интерфазните такива.



Фигура 24. Представилтени изображения от микроскопията за продължителен период от време на CLASPIN-EGFP/mCherry-PCNA HeLa Kyoto клетъчната линия.

В заключение, резултатите получени от този проект, разкриха разнообразие от динамични профили по отношение нивата на белтъците, както и тяхното разпределение в ядрото. За разлика от всички останали изследвани белтъци, нивата на RIF1 белтъка бяха сравнително еднакви по време на клетъчния цикъл с изключение на M/G1 и G2/M преходите. Промените на нивата на белтъка в тези преходи се дължат на формирането или разпадането на ядрената мембрана. В допълнение, RIF1 беше локализиран върху късно репликиращи се региони през всички фази от клетъчния цикъл с изключение на M. За разлика от него, MCM6 имаше същия профил на кривата, отразяваща измерения среден интензитет на флуоресценцията, но концентрацията на белтъка беше 2 до 3 пъти по ниска от тази на RIF1. Първоначално се наблюдаваше бързо качване на концентрацията на MCM6 белтъка по време на формиране на ядрото в G1, след което следваше постепенно намаляване на концентрацията на MCM6 до достигане на S фазата. В същото време можеше да се различи ясна структура на белтъка, около час преди започването на S фазата, подчертаваща фунцията му за свързване към хроматина с цел формиране на пре-репликационния комплекс. Контра-интуитивно, нивата на ORC1 белтъка, нужен за натоварването на MCM6, се покачваха бавно по време на G1 фазата, след което следваше рязко увеличение до края на S фазата. В допълнение, можеше да се наблюдава набогатяване на хроматина с този белтък по време на M фазата. Това набогатяване, първоначално, наблюдавано из цялото ядро, се ограничава само до местата близки до ядрената мембрана, в много малки количества. Накрая, показахме, че нивата на CLASPIN се увеличават от ранна S фаза, достигат плато в късна S фаза и рязко намаляват в прехода G2/M. По времето на този процес не се виждат структури в ядрото, формирани от белтъка. Подходът, използван при изпълнението на този проект, предоставя практическата основа за детайлното моделиране на реакциите, в които всеки един от тези белтъци участва.

3. Разработване на бази от данни с цел визуализация на получените резултати

По време на работата по двата проекта се генира огромно количество (над 40 TB) информация, която трябваше да се обработва и съхранява. За да може всички получени резултати да бъдат преглеждани от учени от цял свят, създадохме база от данни, която е със свободен достъп, в която се съдържат всички получени резултати за интернализацията на вирусо-подобните частици. Базата от данни може да бъде намера на адрес https://covidynamics.imb.bas.bg/. Тя съдържа: описание на експерименталните условия, флуоресцентните маркери на клетките и вирусо-подобните частици, както и видео с и без наличното проследяване на индувидуалните частици. Тази база от данни представлява удобен и нагледен инструмент за бързо визуализиране на получените резултати.

По време на работата ми по тази база от данни, натрупах опит, който беше от голямо значение за разработването на друга такава. Това доведе до успешна публикация на тема „DNArepairK: An interactive database for exploring the impact of anticancer drugs onto the dynamics of DNA repair proteins“. В тази база от данни могат да бъдат намерени различни белтъци от поправката на ДНК и да бъде визуализирана, бързо и лесно, динамиката на натрупването и премахването на различни белтъци, участващи в поправката на ДНК от местата на ДНК увреждания. Базата от данни също представлява лесен инструмент при сравняване на различните белтъци и може да служи като атлас за нуждаещите се учени.

V. Дискусия

1. Разработване на софтуер за проследяване на вирусо-подобни частици

При извършването на миркоскопия на живи обекти, основен проблем представлява последващата обработка на получените изображения и от голямо значение е извличането на данните, които изображенията съдържат. От една страна, проблем е фактът, че обектите не са статични и се движат по X-, по Y-, както и по Z-осите. Освен това, те променят размерите си, както и интензитетът на флуоресцентните маркери, които съдържат. Поради тази причина беше от основно значение да се разработи алгоритъм или методология, която да позволи проследяването и последващото извличане на информацията от вирусо-подобните частици.

Разработването на SPARTACUSS ни позволи, от една страна, да проследяваме частиците в трите оси (X,Y и Z), но също така да ги следим и във времето. Нещо повече, SPARTACUSS извлича скоростта във всеки един момент на всяка една проследена вирусо-подобна частици и освен това представя цифрова стойност на интензитета ѝ във всеки един момент от проследяването. Това ни позволи да детектираме и най-малките промени в гореописаните параметри в интервал от 15 до 30 секунди. Нещо повече, тези софтуерни решения не са лимитирани до текущата работа. SPARTACUSS е оптимизиран до състояние на два клика, за да се извлече нужната информация, тоест всички обекти, които могат да бъдат проследени посредством методологията, ще дадат резултати в рамките и размерностите ѝ. Ние смятаме, че софтуерните решения могат да бъдат използвани за проследяване на различни обекти в различни сфери на науката като например: 1) траектории на космически обекти в космически карти в сферата на космологията; 2)траектории на биологични обекти с цел проследяване на миграционни пътища в областта на екологията; 3) проследяване на тракеториите на движение на единични индивиди при сложни поведенчески прояви, при пасаж от риби или ято от птици, пазещи се от хищник, в поведенческата биология и други.

Основна заслуга за разработката на методологията има моя колега Румен Стаматов, но всички колеги от лабораторията участваха в оптимизацията и тестването ѝ. Аз като основен потребител имах заслуга за тестването и дебъгинга (отстраняването на грешки) на почти всяка една стъпка от методологията. Получените знания при този процес бяха от огромна полза при разработването на базите от данни https://covidynamics.imb.bas.bg/ и „DNArepairK: An interactive database for exploring the impact of anticancer drugs onto the dynamics of DNA repair proteins.

2. Бази от данни

Създадените бази от данни https://covidynamics.imb.bas.bg/ и „DNArepairK: An interactive database for exploring the impact of anticancer drugs onto the dynamics of DNA repair proteins са инструмент, позволяващ бързото сравняване на различни резултати. Ако друга научна група реши да изследва различни параметри, свързани с навлизането на вирусо-подобни частици в клетки или кинетика на натрупване и премахване на белтъци от местата на ДНК увреждане, те могат да сравнят получените резултати с наличните такива в базите от данни и това да им позволи да придобият по обстойна картина върху процесите.

В допълнение, хора, които не се занимват с наука също имат достъп до базите от данни и това би им позволило да надникнат в света на молекулярната биология, тъй като обясненията и в двете са така поднесени, че да са достъпни за всички. Това увеличава интереса на всички хора към науката и добавя допълнителна стойност към вече наличните научни резултати.

3. Динамика на процесите асоциирани с навлизането на SARS-CoV-2 вирусо-подобни частици в клетки гостоприемници.

В нстоящия дисертационен труд се разглеждат пет ключови събития от навлизането на SARS-CoV-2 вирусо-подобни частици в различни клетки, като целта е да се представи времевата линия на тези събития. За да се постигне това, се измерват кинетичните характеристики на ниво единична частица на тези събития, като те са както следва: 1) свързване на вирусо-подобните частици, 2) начало на намаляването на pH на тези частици, 3) начало на освобождаване на нуклеокапсида, 4) колокализация между Динамин-1 и вирусо-подобната частица и 5) начало на движението по микротубулната мрежа на клетката гостоприемник.

Сравняването на различните получени времеви интервали на тези събития показват, че 4 минути при VeroE6 клетки и 12 минути при A549 клетки, след като частицата се закачи към мембраната на клетката гостоприемник, стойностите на pH-то ѝ започват много бързо да намаляват. Падането на pH-то съвпада по време със свързването на Динамин-1 и освобождававането на нуклеокапсида, а тези събитията са последвани от активен транспорт по микротубулната мрежа. Както стана ясно от представените резултатите, при разглеждане на единични вирусо-подбни частици, тези събития не са взаимосвързани, но средните им времена показват, че те следват тази времева линия.

Нашите резултати подсказват, че фузията на вирусо-подобните частици (освобождаването на N-белязания нуклеокапсид) се случва едновременo с или веднага след формирането на ендозомата. Това, което ни изненада беше, че вирусо-подобните частици не колокализират с Rab5a позитивни ранни ендозоми по време на

интернализацията им. Това подсказва, че вероятно вирусо-подобните частици използват друг тип ранни ендозоми, за да навлязат в клетката. Нужни са още допълнителни изследвания, за да се отговори на този въпрос.

Друго наблюдение, което ни направи впечатление е, че интервалите от закачането на частицата до началото на намаляването на pH ѝ или от закачането до началото на увеличаването на скоростта ѝ са два до три пъти по-къси при VeroE6 клетки в сравнение с A549 клетки. Множество различни групи показват, че VeroE6 клетки са по-чувствителни към заразяване от SARS-CoV-2 [59–63]. Въпреки, че различните групи изтъкват различна причина за тази чувствителност като произход на клетъчната линия, присъствие на място за рязане от протеазата фурин или метаболитния статус на клетъчната линия, вероятна причина са и получените резултати от нас. По-бързите, получени от нас, параметри, вероятно биха означавали по-голям брой навлязли вириони и съответно по-бързо, проявяваща се зараза в клетките. Друга вероятна причина е, че липсва интерферонна сигнализация в VeroE6 клетките [32,64–66], която да противодейства на заразяването с SARS-CoV-2.

В допълнение, ние също оценихме ефектът от свръхекспресията на ACE2 и TMPRSS2, основни фактори при навлизането на вируса в клетката гостоприемник, върху ефективността на интернализацията на вирусо-подобни частици. Това, което ни направи впечатление беше, че дори процентът навлезли частици да се увеличи значително, свръхекспресията не повлиява кинетичните маркери, които изследвахме - скоростта на намаляване на pH и увеличаване на скоростта на вирусо-подобните частици. Вероятно обяснение за това е, че по-големият брой рецептори означава по-голям брой частици, свързани към мембраната на клетката гостоприемник и това би обяснило по-големия брой навлязли частици, но последващите стъпки от интернализацията (намаляването на pH и увеличаването на скоростта на частиците) са със същата кинетика, поради факта, че свръхекспресираните белтъци не влияят на тези процеси. Важно е да се отбележи, че освен TMPRSS2 и ACE2, множество други фактори като напр. хепарин-сулфат протеогликани, синдикани и др., също повлияват ефикасността на интернализация и броя навлезли вируси [67,68], но ефектът им върху динамиката на интернализацията не е ясен и затова не са взети под внимание при изработката на този дисертационен труд.

Друг резултат, който не беше очакван е, че и del-1 мутация на S белтъка и Омикрон варианта на вируса не повлияват стъпките на интернализация на SARS-CoV-2 вирусо-подобните частици. Добре известно е, че пасажирането на VeroE6 клетки води до мутации в региона S1/S2 на S блетъка, което предполага, че мястото за рязане от Furin протеазата не е нужно за разпространяването на вируса, което е в съответствие с получените от нас резултати [37,69]. Липсата на статистически значима разлика в динамиката на интернализация на вирусо-подобни частици, при които липсва или присъства мястото за рязане на Furin протеазата, което е наблюдавано от нас, може да

се дължи и на неефективно рязане от протеазата по време на узряване на частиците. Това също е потенциално обяснение за липсата на разлика между двата типа частици. Резултатите, които получаваме с Omicron варианта на вирусо-подобните частици, подсказват, че доминантното разпространение на този вариант сред човешката популация не се дължи на кинетичните параметри при навлизането на вируса в клетките, а вероятно се дължи на други фактори като напр. по-стабилна или ефективна репликация или други.

4. Динамика на белтъци участващи в процеса на репликация

Разработването на методология, която позволява прецизното и недвусмислено определяне, както на фазите от клетъчния цикъл, така и на подфазите от S фазата е в полезрението на учените от цял свят в продължение на много години [70–72]. Въпреки множеството постигнати резултати, все още липсва ясен и лесен за използване метод. Предложената тук методология позволява именно това. Използвайки стойностите на интензитета на PCNA белтъка, измерени след прилагането на Sobel филтър, позволява точното и стълбовидно определяне на G1, ранна S, средна S, късна S, G2 и M фазите от клетъчния цикъл. Това графично определяне позволява, да се сравнят както нивата, така и експресионните профили на всички познати белтъци. Прилагането на системен подход за изследване на всички белтъци, участващи в различни процеси, като репликация, поправка на ДНК молекулата, синтез и разграждане на белтъци и други, би дал една пълна картина на поведението на тези белтъци по време на клетъчния цикъл. Това би помогнало за изясване на механизмите на взаймодействие между тях при изпълнението на функциите си.

Получените резултати за RIF1 индикират, че той е с повишена експресия в началото на G1 фаза, след което нивата му остават постоянни. Това вероятно корелира с функцита му, от една страна, да служи за реверсиране на процеса на лицензиране на началата за репликация [44], и от друга страна, да служи за сензор за двойно-верижни скъсвания. Първоначалната висока експресия е свързана с процеса на лицензиране в G1 фаза от клетъчния цикъл, а нивата му остават постоянни, след това заради функцията му като сензор и като фактор от репликационната вилка [44,73–75]. В допълнение, е важно да се отбележи, че RIF1 белтъкът формира ясно различими структури, които са свързани с гореописаните му функции (Фиг. 20,21) MCM6 също е с подобен профил, като отново се наблюдава повишена експресия в началото на G1, но за разлика от RIF1 нивата му намаляват по-значително с прогресията на клетъчния цикъл. Това отново вероятно корелира с ролята на белтъка, както в лицензирането на началата на репликация в G1 фаза, така и в активирането им [76–78]. Това би обяснило по-високите нива на белтъка в този етап от клетъчния цикъл. Последващото разграждане вероятно се дължи на факта, че част от MCM молекулите се премахват от хроматина и биват разградени, както и от факта, че клетката се старае да предотврати повторна

репликацията в рамките на един клетъчен цикъл и част от този контрол, вероятно се упражнява и върху MCM6 белтъка [79–81]. Отново е важно да се отбележи, че MCM6 белтъкът формира ясни структури в края на G1 фаза и началото на S фазата, като тези структури биват заменени от PCNA. Ние смятаме, че това са местата, на които ще се осъществи процеса на репликация, индикирани от фокусите на PCNA.

Експресионният профил, получен за ORC1 белтъка, вероятно също би могъл да се обясни с функцията на белтъка в процеса на ДНК репликация. Като ключов белтък от ORC комплекса [50,51,53], той участва в процеса на лиценензиране на началата на репликация. Трябва да се спомене, че наблюдавахме натрупване на белтъка върху хромозомите веднага след като клетката навлезе в митоза, което вероятно означава, че лицензирането започва още на този етап. Веднага след като клетката навлезе в G1 фаза започва натрупването на белтъка, като той достига пиковата си стойност в началото на S фазата. По време на това натрупване се наблюдава специфичното разпределение на белтъка в слабо-различими структури, които вероятно са хроматин асоциирани. Това поведение директно корелира с познанията на различни научни групи за продължителността на лицензирането на ДНК. След като клетката навлезе в S фазата, започва бързото разграждане на Orc1 белтъка, като вероятно обяснение е, че се цели блокирането на лицензирането на допълнителни начала на репликация и последваща репликация от тях. По този начин се упражнява допълнителен контрол върху това кои последователности от ДНК ще се реплицират и кога ще се осъществи това.

Експресионният профил на белтъка Claspin също вероятно директно корелира с функцията му [57,82–84]. Claspin служи за платформа, която участва пряко в активирането на S фазния контролен пункт и освен това е фактор от репликационната вилка, движещ се заедно с нея. Това обяснява и повишената му експрсия, когато клетката навлезе в S фаза, както и постоянните му високи нива по протежението на тази фаза. Веднага след като S фазата приключи, белтъкът подлежи на бързо разграждане.За разлика от другите наблюдавани белтъци, Claspin белтъкът не се натрупваше в специфични структури, като разпределението му беше униформено в целия обем на ядрото.

Важно е да се отбележи, че при всички изследваните белтъци, с изключение на Orc1, се вижда рязко намаляване на нивата им, когато клетката навлезе в M фаза на клетъчния цикъл. Това би могла да се обясни с факта, че вероятно наистина тогава започва процеса на лицензиране на началата на репликация и затова наблюдаваме подобен фенотип само при Orc1 блетъка, намиращ се основно върху кондензирания хроматин по време на тази фаза. Също така, не трябва да забравяме, че при навлизането на клетката в митоза, ядрената мембрана се разпуква и всички наблюдавани белтъци се разреждат в целия обем на клетката. Това би могло да обясни защо нивата им рязко намаляват в тази фаза, но служи и като маркер за значимостта на натрупването на Orc1 върху хормозомите.

В заключение, ние вярваме, че получените детайлни резултати от стъпките на интернализация на SARS-CoV-2 вирусо-подобните частици могат да послужат при оценяването на нови противовирусни терапии, освен че допринасят за изясняването на молекулярните механизми от жизнения цикъл на вируса. Освен това, работата с част от белтъците, участващи в репликационния процес по време на клетъчния цикъл разкри множество различни динамични профили по отношение на нива на белтъците и тяхното разпределение в клетката. Ние смятаме, че използвайки разработената методология, описана в настоящия дисертационен труд , за оценка на нивата и разпределението на различни белтъци, може да се осигури практическата основа за разработването на различни модели, обясняващи поведението на изследваните белтъци в процесите, в които те участват.

VI. Изводи и Приноси

Изводи

1. Показахме, че SARS-CoV-2 вирусо-подобните частици увеличават скоростта си след навлизане в клетката гостоприемник, дължащо се на транспорт по микротубулната мрежа на клетката.
2. Установихме, че кинетиката на Динамин-свързаното формиране на ендозомите с включени вирусо-подобни частици е съпоставима с кинетиката на увеличаване на скоростта на частиците.
3. Процесът на намаляването на pH и освобождаването на нуклеокапсида на SARS-CoV-2 вирусо-подобните частици започва от една до две минути преди увеличаването на скоростта им, но няма директна причинно-следствена връзка между тези процеси.
4. Третирането с анти SARS-CoV-2 S антитяло води до агрегиране на вирусо-подобните частици и предотвратява навлизането им в клетките.
5. SARS-CoV-2 вирусо-подобните частици не колокализират с ранни RAb5a позитивни ендозоми, но колокализират с кисели (късни) ендозоми/лизозоми.
6. Omicron вариантът, както и вариантът, съдържащ del-1 делеция в S белтъка на SARS-CoV-2 не повлияват динамиката на навлизане на SARS-COV-2 вирусо-подобните частици.
7. Процесите на увеличаването на скоростта, намаляването на pH, както и освобождаването на нуклеокапсида, са два до три пъти по-бързи при VeroE6 клетки в сравнение с A549 клетки, което може да е обяснение за по-голямата чувствителност на VeroE6 клетките при заразяване с вируса.
8. Измерената динамика на нивата и разпределението на RIF1, ORC1, MCM6, CLASPIN, PCNA показва фината регулация на експресията и локализацията им по време на клетъчния цикъл.

Приноси

1. Разработихме детайлна методология, която позволява визуализирането и точното измерване на промените в скоростта и интензитета на белязани SARS-CoV-2 вирусо-подобни частици.
2. Разработихме методология, която позволява измерването на нивата на даден белтък, както и разпределението му по време на клетъчния цикъл, използвайки флуоресцентна микроскопия.
3. Разработихме детайлен протокол, който позволява дискретното и безпристрастно определяне както на G1, G2 и M фаза, така и ранна S, средна S и късна S подфаза

на клетъчния цикъл, използвайки интензитета флуоресцентно белязан PCNA белтък, измерен след прилагане на Sobel оператор.

4. Създадени бяха уеб базирани бази данни COVIDynamics и DNArepairK Database, които да подпомогнат изследването и визуализацията на интернализацията на SARS-CoV-2 вирусо-подобни частици, както и динамиката на белтъци, свързани с поправката на ДНК.
5. Измерени бяха 5 ключови процеса асоциирани с навлизането на вирусо-подобни частици в две различни клетъчни линии. Тези процеси са както следва: свързване на вирусо-подобната частица към мембраната на клетката, начало на намаляването на pH, начало на освобождаването на нуклеокапсида, колокализация между Динамин и вирусо-подобната частица и началото на активното микротубулно-зависимо движение на частиците.

Научни публикации по темата

1. Aleksandar Atemin, Anelia Ivanova, Wiley Peppel, Rumen Stamatov, Rodrigo Gallegos, Haley Durden, Sonya Uzunova, Michael D. Vershinin, Saveez Saffarian and Stoyno S. Stoynov. "**Kinetic landscape of single virus-like particles highlights the efficacy of SARS-Cov-2 internalization".** Viruses. Impact Factor: **3.8 (2023)**
2. Aleksandar Sergeev Atemin, Aneliya Ivanova, Petar-Bogomil Kanev, Sonya Uzunova, Marina Nedelcheva-Veleva, Stoyno Stoynov. **"Dynamics of replication-associated protein levels through the cell cycle"**. IJMS. Impact Factor: **4.9 (2023)**
3. Babukov, Y., Aleksandrov, R., Ivanova, A., Atemin, A., & Stoynov, S. **"DNArepairK: An interactive database for exploring the impact of anticancer drugs onto the dynamics of DNA repair proteins"** *Biomedicines*, *9*(9), 1238. Impact Factor: **4.757 (2021)**

Други научни публикации

1. Radoslav Aleksandrov, Anton Dotchev, Ina Poser, Dragomir Krastev, Georgi Georgiev, Greta Panova, Yordan Babukov, Georgi Danovski, Teodora Dyankova, Lars Hubatsch, Aneliya Ivanova, Aleksandar Atemin, Marina N. Nedelcheva-Veleva, Susanne Hasse, Mihail Sarov, Frank Buchholz, Anthony A. Hyman, Stephan W. Grill, Stoyno S. Stoynov. **"Protein Dynamics in Complex DNA Lesions".** (2018). *Molecular cell*. *69*(6). 1046-1061. Impact Factor: **14.548 (2018).**
2. Kanev, P. B., Atemin, A., Stoynov, S., & Aleksandrov, R. (2023, September). **"PARP1 roles in DNA repair and DNA replication: The basi(c)s of PARP inhibitor efficacy and resistance".** In *Seminars in Oncology*. WB Saunders. Impact Factor: **3.0 (2023).**
3. Ivanova, A., Atemin, A., Uzunova, S., Danovski, G., Aleksandrov, R., Stoynov, S., & Nedelcheva-Veleva, M. (2021). "**The effect of Dia2 protein deficiency on the cell cycle, cell size, and recruitment of Ctf4 protein in Saccharomyces cerevisiae"**. *Molecules*, *27*(1), 97. Impact Factor: 4.927 **(2021).**

Участие в научни конференции

1. 2024 A.Atemin et al."Dynamics of replication-associated protein levels through the cell cycle", EMBO Conference, Сингапур

2. 2023 A.Atemin et al. „Kinetics of SARS-CoV-2 entry into cells“, IPols, Атланта, Америка
3. 2022 A.Atemin et al. “Kinetics of SARS-CoV-2 entry into cells”, Юбилейна конференция „100 от раждането на акад. Румен Цанев“ София, България
4. 2020 A.Atemin et al. “Dia2 at the crossroad between DNA replication and cell’s size homeostasis.”, IPols, Хюстън Тексас, Америка (онлайн
5. 2019 A.Atemin et al. “The fine-tuned balance between expression and degradation regulates the cell fate”, ECHG, Гьотеборг, Швеция
6. 2019 A.Atemin et al. “Analysis of the key replication protein Claspin and its yeast analogue Ctf4”, Докторанстки симпозиум, БАН, София, България
7. 2019 A.Atemin et al. “Dynamic Changes in the Replication Complex During Normal and Perturbed Replication”,Годишна среща на Humbolt Kolleg Варна, България
8. 2018 A.Atemin et al. “Ctf4 in the context of replication”, FEBS 2018, Прага, Чехия
9. 2017 A.Atemin et al. “Dynamic Changes in the Replication Complex During Normal and Perturbed Replication”, ICGEB, Триест, Италия
10. 2017 A.Atemin et al. “Dia2-mediated control of Ctf4 in the context of replication complex integrity”, FEBS 2017, Йерусалим, Израел
11. 2016 A.Atemin et al. “Ctf4 dynamics”, Интердисциплинарен форум, БАН, София, България

Референции

1. Poser, I. *et al.* BAC TransgeneOmics: a high-throughput method for exploration of protein function in mammals. *Nat. Methods* **5**, 409–415 (2008).
2. Song, B. D., Yarar, D. & Schmid, S. L. An assembly-incompetent mutant establishes a requirement for dynamin self-assembly in clathrin-mediated endocytosis in vivo. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2243–2252 (2004).
3. Swann, H. *et al.* Minimal system for assembly of SARS-CoV-2 virus like particles. *Sci. Rep.* **10**, 1–5 (2020).
4. Gourdelier, M. *et al.* Optimized production and fluorescent labeling of SARS-CoV-2 virus-like particles. *Sci. Rep.* **12**, 1–15 (2022).
5. Sankaranarayanan, S., De Angelis, D., Rothman, J. E. & Ryan, T. A. The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophys. J.* **79**, 2199–2208 (2000).
6. Kurki, P., Vanderlaan, M., Dolbeare, F., Gray, J. & Tan, E. M. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp. Cell Res.* **166**, 209–219 (1986).
7. Somanathan, S., Suchyna, T. M., Siegel, A. J. & Berezney, R. Targeting of PCNA to sites of DNA replication in the mammalian cell nucleus*. *J. Cell. Biochem.* **81**, 56–67 (2001).
8. Schonenberger, F., Deutzmann, A., Ferrando-May, E. & Merhof, D. Discrimination of cell cycle

phases in PCNA-immunolabeled cells. *BMC Bioinformatics* **16**, 180 (2015).

9. Sasaki, K., Kurose, A. & Ishida, Y. Flow cytometric analysis of the expression of PCNA during the cell cycle in hela cells and effects of the inhibition of DNA synthesis on it. *Cytometry* **14**, 876–882 (1993).

10. Danovski, G. *et al.* CellTool: An Open-Source Software Combining Bio-Image Analysis and Mathematical Modeling for the Study of DNA Repair Dynamics. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, (2023).

11. Schindelin, J. *et al.* Fiji - an Open platform for biological image analysis. *Nat. Methods* **9**, (2009).

12. Tan, E., Chin, C. S. H., Lim, Z. F. S. & Ng, S. K. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 1–9 (2021).

13. Sharma, A. *et al.* Structural stability of SARS-CoV-2 virus like particles degrades with temperature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **534**, 343–346 (2021).

14. Xu, R., Shi, M., Li, J., Song, P. & Li, N. Construction of SARS-CoV-2 Virus-Like Particles by Mammalian Expression System. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 1–6 (2020).

15. Zhang, Y. *et al.* Single particle tracking reveals SARS-CoV-2 regulating and utilizing dynamic filopodia for viral invasion. *Sci. Bull.* **68**, 2210–2224 (2023).

16. Huang, R. *et al.* Betanodavirus-like particles enter host cells via clathrin-mediated endocytosis in a cholesterol-, pH- and cytoskeleton-dependent manner. *Vet. Res.* **48**, 1–17 (2017).

17. Zepeda-Cervantes, J., Ramírez-Jarquín, J. O. & Vaca, L. Interaction Between Virus-Like Particles (VLPs) and Pattern Recognition Receptors (PRRs) From Dendritic Cells (DCs): Toward Better Engineering of VLPs. *Front. Immunol.* **11**, 1–22 (2020).

18. Ogando, N. S. *et al.* SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: Replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. *J. Gen. Virol.* **101**, 925–940 (2020).

19. Prichard, K. L., O'Brien, N. S., Murcia, S. R., Baker, J. R. & McCluskey, A. Role of Clathrin and Dynamin in Clathrin Mediated Endocytosis/Synaptic Vesicle Recycling and Implications in Neurological Diseases. *Front. Cell. Neurosci.* **15**, (2022).

20. Cocucci, E., Gaudin, R. & Kirchhausen, T. Dynamin recruitment and membrane scission at the neck of a clathrin-coated pit. *Mol. Biol. Cell* **25**, 3595–3609 (2014).

21. Antonny, B. *et al.* Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *EMBO J.* **35**, 2270–2284 (2016).

22. Cheng, X. *et al.* Dynamin-dependent vesicle twist at the final stage of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* **23**, 859–869 (2021).

23. Hill, E., Van Der Kaay, J., Downes, C. P. & Smythe, E. The role of dynamin and its binding partners in coated pit invagination and scission. *J. Cell Biol.* **152**, 309–323 (2001).

24. Štimac, I. *et al.* Dynamin inhibitors prevent the establishment of the cytomegalovirus assembly compartment in the early phase of infection. *Life* **11**, (2021).

25. Loerke, D. *et al.* Cargo and dynamin regulate clathrin-coated pit maturation. *PLoS Biol.* **7**, 0628–0639 (2009).

26. Wang, C. *et al.* Investigation of endosome and lysosome biology by ultra pH-sensitive nanoprobes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **113**, 87–96 (2017).

27. Yang, Y., Mengran Yu, Zhang, S., Ma, G. & Su, Z. Adsorption of virus-like particles on ion exchange surface: Conformational changes at different pH detected by dual polarization interferometry. *J. Chromatogr. A* **1408**, 161–168 (2015).

28. Ausar, S. F., Foubert, T. R., Hudson, M. H., Vedvick, T. S. & Middaugh, C. R. conformational stability and disassembly of norwalk virus-like particles: Effect of ph and temperature. *J. Biol. Chem.* **281**, 19478–19488 (2006).

29. Maassen, S. J., van der Schoot, P. & Cornelissen, J. J. L. M. Experimental and Theoretical Determination of the pH inside the Confinement of a Virus-Like Particle. *Small* **14**, 1–7 (2018).

30. Martineau, M. *et al.* Semisynthetic fluorescent pH sensors for imaging exocytosis and endocytosis. *Nat. Commun.* **8**, 1–10 (2017).

31. Syed, A. M. *et al.* Rapid assessment of SARS-CoV-2–evolved variants using virus-like particles. *Science (80-.).* **374**, 1626–1632 (2021).

32. Rossi, G. A., Sacco, O., Mancino, E., Cristiani, L. & Midulla, F. Differences and similarities between SARS-CoV and SARS-CoV-2: spike receptor-binding domain recognition and host cell infection with support of cellular serine proteases. *Infection* **48**, 665–669 (2020).

33. Lau, S. Y. *et al.* Attenuated SARS-CoV-2 variants with deletions at the S1/S2 junction. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 837–842 (2020).

34. Sasaki, M. *et al.* SARS-CoV-2 variants with mutations at the S1/ S2 cleavage site are generated in vitro during propagation in TMPRSS2-deficient cells. *PLoS Pathog.* **17**, 1–17 (2021).

35. Harvey, W. T. *et al.* SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 409–424 (2021).

36. Peacock, T. P. *et al.* The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. *Nat. Microbiol.* **6**, 899–909 (2021).

37. Lubinski, B. & Whittaker, G. R. The SARS-CoV-2 furin cleavage site: natural selection or smoking gun? *The Lancet Microbe* **4**, e570 (2023).

38. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H. & Pöhlmann, S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol. Cell* **78**, 779-784.e5 (2020).

39. Hui, K. P. Y. *et al.* SARS-CoV-2 Omicron variant replication in human bronchus and lung ex vivo. *Nature* **603**, 715–720 (2022).

40. Syed, A. M. *et al.* Omicron mutations enhance infectivity and reduce antibody neutralization of SARS-CoV-2 virus-like particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **119**, 1–7 (2022).

41. Poser, I. *et al.* BAC TransgeneOmics: a high-throughput method for exploration of protein function in mammals. *Nat Methods* **5**, 409–415 (2008).

42. Raghuraman, B. K. *et al.* Median-Based Absolute Quantification of Proteins Using Fully Unlabeled Generic Internal Standard (FUGIS). *J. Proteome Res.* **21**, 132–141 (2022).

43. Essers, J. *et al.* Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol* **25**, 9350–9359 (2005).

44. Hiraga, S. I. *et al.* Rif1 controls DNA replication by directing Protein Phosphatase 1 to reverse Cdc7-mediated phosphorylation of the MCM complex. *Genes Dev.* **28**, 372–383 (2014).

45. Hiraga, S. *et al.* Human RIF1 and protein phosphatase 1 stimulate DNA replication origin licensing but suppress origin activation. *EMBO Rep.* e201641983 (2017) doi:10.15252/embr.201641983.

46. Foti, R. *et al.* Nuclear Architecture Organized by Rif1 Underpins the Replication-Timing Program. *Mol. Cell* **61**, 260–273 (2016).

47. Malzl, D. *et al.* RIF1 regulates early replication timing in murine B cells. *Nat. Commun.* **14**, 1–18 (2023).

48. Symeonidou, I. E. *et al.* Multi-step loading of human minichromosome maintenance proteins in live human cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 35852–35867 (2013).

49. Deegan, T. D., Mukherjee, P. P., Fujisawa, R., Polo Rivera, C. & Labib, K. CMG helicase disassembly is controlled by replication fork DNA, replisome components and a ubiquitin threshold. *Elife* **9**, (2020).

50. Tatsumi, Y., Ohta, S., Kimura, H., Tsurimoto, T. & Obuse, C. The ORC1 cycle in human cells: I. Cell cycle-regulated oscillation of human ORC1. *J. Biol. Chem.* **278**, 41528–41534 (2003).

51. Ohta, S., Tatsumi, Y., Fujita, M., Tsurimoto, T. & Obuse, C. The ORC1 cycle in human cells: II. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **278**, 41535–41540 (2003).

52. Kara, N., Hossain, M., Prasanth, S. G. & Stillman, B. Orc1 binding to mitotic chromosomes precedes spatial patterning during G1 phase and assembly of the origin recognition complex in human cells. *J. Biol. Chem.* **290**, 12355–12369 (2015).

53. DePamphilis, M. L. The 'ORC cycle': A novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication. *Gene* **310**, 1–15 (2003).

54. Méndez, J. & Stillman, B. Chromatin Association of Human Origin Recognition Complex, Cdc6, and Minichromosome Maintenance Proteins during the Cell Cycle: Assembly of Prereplication Complexes in Late Mitosis. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8602–8612 (2000).

55. Kreitz, S., Ritzi, M., Baack, M. & Knippers, R. The Human Origin Recognition Complex Protein 1 Dissociates from Chromatin during S Phase in HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 6337–6342 (2001).

56. Peschiaroli, A. *et al.* SCFbetaTrCP-mediated degradation of Claspin regulates recovery from the DNA replication checkpoint response. *Mol Cell* **23**, 319–329 (2006).

57. Hsiao, H.-W., Yang, C.-C. & Masai, H. Roles of Claspin in regulation of DNA replication, replication stress responses and oncogenesis in human cells. *Genome Instab. Dis.* **2**, 263–280 (2021).

58. Bennett, L. N. & Clarke, P. R. Regulation of Claspin degradation by the ubiquitin-proteosome pathway during the cell cycle and in response to ATR-dependent checkpoint activation. *FEBS Lett.* **580**, 4176–4181 (2006).

59. Hou, Y. J. *et al.* SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell* **182**, 429-446.e14 (2020).

60. Essaidi-Laziosi, M. *et al.* Estimating clinical SARS-CoV-2 infectiousness in Vero E6 and primary airway epithelial cells. *The Lancet Microbe* **2**, e571 (2021).

61. Melis, R., Braca, A., Pagnozzi, D. & Anedda, R. The metabolic footprint of Vero E6 cells highlights the key metabolic routes associated with SARS-CoV-2 infection and response to drug combinations. *Sci. Rep.* **14**, 1–12 (2024).

62. Aiewsakun, P. *et al.* Systematic Exploration of SARS-CoV-2 Adaptation to Vero E6, Vero E6/TMPRSS2, and Calu-3 Cells. *Genome Biol. Evol.* **15**, 1–21 (2023).

63. Ogando, N. S. *et al.* SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. *J. Gen. Virol.* **101**, 925–940 (2020).

64. Emeny, J. M. & Morgan, M. J. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J. Gen. Virol.* **43**, 247–252 (1979).

65. Wang, L. *et al.* Susceptibility to SARS-CoV-2 of cell lines and substrates commonly used to diagnose and isolate influenza and other viruses. *Emerg. Infect. Dis.* **27**, 1380–1392 (2021).

66. Cagno, V. SARS-CoV-2 cellular tropism. *The Lancet Microbe* **1**, e2–e3 (2020).

67. Letoha, A., Hudák, A. & Letoha, T. Exploring the Syndecan-Mediated Cellular Internalization of the SARS-CoV-2 Omicron Variant. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, (2023).

68. Hudák, A., Letoha, A., Szilák, L. & Letoha, T. Contribution of syndecans to the cellular entry of SARS-CoV-2. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–27 (2021).

69. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H. & Pöhlmann, S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol. Cell* **78**, 779-784.e5 (2020).

70. Nicolini, C., Kendall, F. & Giaretti, W. Objective identification of cell cycle phases and subphases by automated image analysis. *Biophys. J.* **19**, 163–176 (1977).

71. Zerjatke, T. *et al.* Quantitative Cell Cycle Analysis Based on an Endogenous All-in-One Reporter for Cell Tracking and Classification. *Cell Rep.* **19**, 1953–1966 (2017).

72. Guo, X. & Chen, L. From G1 to M: a comparative study of methods for identifying cell cycle phases. *Brief. Bioinform.* **25**, 1–10 (2024).

73. Noordermeer, S. M. *et al.* The shieldin complex mediates 53BP1-dependent DNA repair. *Nature* **560**, 117–121 (2018).

74. Ochs, F. *et al.* Stabilization of chromatin topology safeguards genome integrity. *Nature* **574**, 571–574 (2019).

75. Gnan, S. *et al.* Nuclear organisation and replication timing are coupled through RIF1–PP1 interaction. *Nat. Commun.* **12**, 1–10 (2021).

76. Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N. & Oda, M. Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annu Rev Biochem* **79**, 89–130 (2010).

77. Cheng, L. *et al.* Expression Profile and Prognostic Values of Mini-Chromosome Maintenance Families (MCMs) in Breast Cancer. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **26**, e923673 (2020).

78. Symeonidou, I. E. *et al.* Multi-step loading of human minichromosome maintenance proteins in live human cells. *J Biol Chem* **288**, 35852–35867 (2013).

79. Liu, Z. *et al.* MCM family in HCC: MCM6 indicates adverse tumor features and poor outcomes and promotes S/G2 cell cycle progression. *BMC Cancer* **18**, 200 (2018).

80. Blow, J. J. & Dutta, A. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 476–486 (2005).

81. Komata, M., Bando, M., Araki, H. & Shirahige, K. The Direct Binding of Mrc1, a Checkpoint Mediator, to Mcm6, a Replication Helicase, Is Essential for the Replication Checkpoint against Methyl Methanesulfonate-Induced Stress. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5008–5019 (2009).

82. Baretić, D. *et al.* Cryo-EM Structure of the Fork Protection Complex Bound to CMG at a Replication Fork. *Mol. Cell* **78**, 926-940.e13 (2020).

83. Lou, H. *et al.* Mrc1 and DNA Polymerase ε Function Together in Linking DNA Replication and the S Phase Checkpoint. *Mol. Cell* **32**, 106–117 (2008).

84. Kumagai, A. & Dunphy, W. G. Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in Xenopus egg extracts. *Mol. Cell* **6**, 839–849 (2000).