

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Албена Йорданова - Софийски университет „Св. Климент Охридски“,
Медицински факултет, Катедра „Химия и биохимия, физиология и патофизиология“, член на научно жури, назначено със заповед № 1035/01.12.2024 г. на Директора
на Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ - БАН,
доц. Анастас Господинов, дб

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“
в Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика,
Професионално направление: 4.3. Биологически науки, Научна специалност: „Молекулярна биология“

Автор: Теодора Красиминова Дянкова-Дановска – редовен докторант в Лаборатория по геномна стабилност, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ - БАН

Тема на дисертационния труд: Кинетика на натрупване и премахване на белтъци от репликационната вилка при нейното спиране и рестарт

Научен ръководител: доц. д-р Стойно Стойнов, Лаборатория по геномна стабилност, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ - БАН

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Представените материали за рецензиране на дисертационния труд на Теодора Дянкова-Дановска е в пълно съответствие със Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за прилагането на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за прилагане на закона за развитието на академичния състав в Института по Молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ и включва следните документи:

- правилник за прилагане на закона за развитието на академичния състав в Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ при БАН;
- автобиография в pdf и doc-формат, включваща и пълен списък на публикациите и участията на научни форуми;
- дисертационен труд в pdf и doc-формат;
- автореферат в pdf и doc-формат;

- списък на публикациите и трите научни статии по темата на дисертационния труд, както и разделителни протоколи за приносите на докторантката в проведените научни изследвания и анализ на резултатите;
- списък на цитиранията (145 цитата) на публикациите по темата на дисертационния труд (към 27.03.2024 г.);
- диплома за придобита магистърска степен по специалност Биотехнология, магистърска програма Генно и клетъчно инженерство;
- протоколи от положените задължителни изпити на докторантката;
- заповед 363/30.06.2016 година на директора на ИМБ проф. Ива Угринова за зачисляване на Теодора Дянкова в редовна форма на обучение за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ по специалност „Молекулярна биология“, както и заповед 482/21.06.2019 г. на директора на ИМБ проф. Ива Угринова за отчисляване на докторантката с право на защита;
- заповед № 1035/01.12.2024 г. на директора на ИМБ-БАН доц. Атанас Господинов за назначаване на научно жури за защита на дисертационния труд за придобиване на образователната и научна степен „доктор“;
- сертификати за участия на международни научни конференции и докторантски симпозиуми и др.

Дисертационният труд е представен и обсъден на разширен семинар на Лабораторията по геномна стабилност при Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ – БАН на 19.07.2024 г.

2. Актуалност на тематиката

В представения ми за рецензия дисертационен труд на Теодора Дянкова-Дановска – редовна докторантка в Лаборатория по геномна стабилност, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ - БАН (отчислена през 2019 година с право на защита), е проведено мащабно изследване на наблюдаваните динамични процеси при натрупване и премахване на ключови белтъци, участващи в репликацията при спиране и рестарт на репликационната вилка, чрез прилагането на съвременни високоинформативни молекулярно-биологични методи.

В настоящия дисертационен труд с осъществени експерименти, проведени с 3 двойни *HeLa Kyoto* клетъчни линии, които експресират белтъците RPA-EGFP, POLD2-EGFP, PAXIP-EGFP и PCNA-mCherry и е представен подход за изследването на динамиката на репликационните компоненти в условия на репликационен стрес и последващото възстановяване на вилките при времева резолюция от 30 секунди. Визуализирано е премахването на

клампата *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), която действа като процесиращ фактор за ДНК полимераза δ в еукариотни клетки и е от съществено значение за нормалното протичане на репликацията, както и натрупването на *Replication protein A* (RPA) - главен протеин, който се свързва с едноверижни участъци на ДНК (ssDNA) в еукариотните клетки, при индуцирано с хидроксиурея изчерпване на нуклеотидния резерв, като е извършено прецизно изследване на кинетиките на двата процеса. Установено е и е визуализирано възстановяването на PCNA и премахването на RPA по време на рестарта на репликационните вилки в рамките на едни и същи репликационни фокуси. Влиянието на протеините *ATM-related* (ATR) - фундаментална киназа, която регулира стартирането на началата на репликация, стабилността на репликационната вилка и прогресията на клетъчния цикъл; *Poly(ADP-ribose) polymerase 1* (PARP1), който бързо открива увреждане в структурата на ДНК и насочва към възстановяващи механизми; *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM) – основната протеин киназа, която е отговорна за фосфорилирането на H2AX при местата на увреждане на ДНК, играе роля в активирането на контролните точки на клетъчния цикъл, възстановяването на двойноверижни скъсвания и регулацията на „пазителя на генома“ p53 в отговор на увреждане на ДНК и *Meiotic recombination 11* (MRE11) - протеин, участващ в хомоложната рекомбинация, поддържане дължината на теломерите и възстановяване на двойно верижни скъсвания в ДНК върху динамиката на вилките по време на тяхното спиране и рестарт е изследвано и анализирано детайлно в представения дисертационен труд.

Въпреки установените до сега механизми при протичане на процесите на fork reversal, деградацията и рестарта на вилките, централната роля на BRCA1 и BRCA2 при специфичен тип увреждане на ДНК *homologous recombination repair* (HRR) срещу нуклеотидната деградация на репликационни вилки, както и ролята на PARP1 в регулацията на рестарта на вилките все още няма категорични резултати по отношение на репликомната динамика по време на целия процес на спиране на репликационната вилка, нейното обръщане и рестарт на ниво единична клетка. Ето защо проведените в дисертационния труд експерименти, получените резултати и тяхната задълбочена интерпретация са от огромно значение за изясняване на детайлните механизми за участието и кинетиките на натрупване и премахване на белтъци от репликационната вилка при стабилизиране на спряла репликационна вилка и при нейния рестарт.

3. Познаване на проблема

След като се запознах с дисертационния труд, авторефератът и научните публикации на Теодора Дянкова-Дановска, мога да заявя, че докторантката е запозната отлично с анализирания научен проблем, оценява творчески научните изследвания на цитираните

автори и може точно и компетентно да ги интерпретира. Ясно и точно е формулирана и целта, която Теодора Дянкова-Дановска си е поставила: да се изследват кинетиките на натрупване и премахване на ключови белтъци участващи в репликацията при спиране и рестарт на вилката. За реализиране на поставената цел са предвидени са реализиране и са осъществени 5 основни задачи, които включват изследване на:

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

4. Методика на изследването

За провеждане на експериментите са използвани *HeLa Kyoto* клетъчни линии, получени чрез трансфекция с BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*), които стабилно коекспресират анализирани белтъци: RPA-EGFP, POLD2-EGFP, PAXIP-EGFP и PCNA-mCherry. Избраните методи на изследване в дисертационният труд: *клетъчно култивиране и третиране; провеждане и анализ на микроскопски Time-lapse експерименти с помощта на компютърната програма CellTool в присъствие и отсъствие на различни инхибитори (хидроксиурея, HU; HU и AZD6738 - инхибитор на ATR киназата; HU и KU55933 - ATM инхибитор; както и комбинацията от HU, AZD6738 и KU55933); провеждане и анализ на експерименти с микрооблъчване на живи клетки, Western blot анализ и др.* са напълно адекватни, реалистични и високоинформативни за постигане на поставените цели и задачи в дисертационния труд.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е оформен отлично и представя в детайли извършените от докторантката изследвания. Дисертацията обхваща 107 страници, съдържа 41 фигури и 2

таблицы. Библиографската справка включва 234 литературни източници от реномирани и индексирани научни издания, като голям брой от тях са от последните години.

Изключително подробният и актуален *Литературен обзор* към дисертационния труд включва съвременни представи за детерминиране на *origin*-местата за начало на репликационния процес, механизмите на асемблиране на репликационната вилка, уникалните процеси на синтез на ДНК-фрагментите във водещата и в изоставащата верига, както и удивителните процеси, наблюдавани при терминацията на репликацията. Особено внимание е отделено на факторите, които предизвикват репликационен стрес, както и ролята на контролните пунктове на клетъчния цикъл, които са отговорни за геномната стабилност и при ДНК повреди спират прогресията на клетъчния цикъл и осигуряват възможност за поправка на ДНК преди следващия етап на клетъчния цикъл. Единствената ми забележка към този раздел на дисертационния труд е, че би могло да се включат повече фигури за по-информативното и детайлно онагледяване и представяне на разглежданите механизми и процеси. В *Литературния обзор* са цитирани и анализирани многобройни научни изследвания по темата на дисертацията, което прави отлично впечатление. Целта на дисертационния труд е формулирана ясно, а поставените за изпълнение задачи (описани по-горе) обобщават насоките за извършване и анализ на предвидените експерименти.

Получените от Теодора Дянкова-Дановска *Резултати* са описани подробно и онагледени отлично с подходящи фигури на 40 страници, с последващ раздел *Дискусия*. Получени са резултати в 6 основни направления, като от базисно значение за разкриване на изследваните механизми в дисертационния труд, е разработването на високоинформативна компютърната платформа *CellTool* за бърз, лесен и точен анализ на микроскопските изображения.

- Описан е приносът на докторантката при разработването на дизайна на графичния интерфейс, протоколите за анализ на изображения, написването на документацията и тестването на *CellTool*. Чрез тази компютърна програма в реално време са наблюдавани единични живи клетки и е проследена динамиката на PCNA и RPA1 по време на спирането и последващото рестартиране на репликационната вилка с хидроксиурея в присъствие и отсъствие на различни инхибитори.
- Получените резултати дават с точност времената и скоростите на натрупване и премахване на изследваните белтъци, като е установено, че инхибирането на ATR драстично увеличава количеството и скоростта на натрупване на RPA1 при спрени репликационни вилки. В допълнение е показано, че ATR предотвратява пост-репликационното наличие на едноверижна ДНК след рестарт и последваща митотична катастрофа. Инхибирането само на ATM – белтък, който участва в

регулацията на клетъчния отговор при възникване на увреждания в ДНК, не оказва ефект върху динамиката и количествата на PCNA и RPA при спиране и рестарт на репликационните вилки.

➤ При спиране на репликационната вилка с хидроксиурея и инхибиране на двете кинази ATR и ATM с инхибиторите AZD6738 и KU55933, се наблюдава премахване на PCNA и малко по-бързото натрупване на едноверижна ДНК, отколкото при експериментите само с AZD6738. Съвместното инхибиране на ATM и ATR предотвратява премахването на RPA при рестартиране на репликационните вилки.

➤ При третиране на изследваните клетки с mirin (инхибитор на MRN комплекса, в който участва и нуклеазата MRE11) и инхибитор на ATR не се наблюдава разлика в динамиката на RPA и PCNA при спиране и рестарт на вилката.

➤ За установяване на ролята на PARP1 по време на спиране и рестарт на репликационните вилки е използван талазопариб (BMN673), като инхибирането на PARP1/2 забавя натрупването на RPA в условия на нуклеотиден глад, индуциран посредством HU в отсъствието на ATR активност.

➤ Изследвана е кинетиката на натрупване и премахване на белтъците RPA и PCNA при спиране и рестарт на репликационната вилка. Установено е, че динамиката на PCNA и RPA са константни при трите изследвани клетъчни линии във всички експериментални условия, но се наблюдават разлики при натрупването и премахването на RPA.

➤ При спиране на репликационната вилка с хидроксиурея, флуоресцентно белязания белтък POLD2 (*DNA Polymerase Delta 2, Accessory Subunit*) се премахва заедно с PCNA. При премахване на HU, POLD2 се възстановява на рестартираната вилка заедно с PCNA. В присъствие на ATR инхибитор AZD6738 след спиране на репликационната вилка и след третиране с хидроксиурея намаляват фокусите на PCNA и е натрупват фокуси на POLD2.

➤ Изследвана е кинетиката на натрупване и премахване на PAXIP (ядрен белтък участващ в отговора на увреждания на ДНК и регулацията на генната експресия) на местата на комплексни ДНК увреждания, индуцирани с UV лазер в присъствие и отсъствие на ATM инхибитора KU55933, като е наблюдавано натрупване на PAXIP и PCNA при уврежданията. В присъствие на ATM инхибитора не се натрупва PAXIP, докато нивата на PCNA остават същите, което показва, че инхибирането на ATM е причината за липсата на PAXIP на местата на комплексни ДНК увреждания.

- Чрез Western blot е измерено, че нивата на RPA-EGFP са 1:3, спрямо ендogenousните нива на RPA, докато нивата на mPCNA-mCherry са приблизително 1:4.2, спрямо ендogenousните нива на PCNA.

На база проведените комплексни експерименти и анализ на получените резултати са обобщени 6 изводи и са формулирани 2 научни и научно-приложни приноса.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Резултатите от проведените изследвания в дисертационния труд са публикувани в периода 2018-2024 година в 3 научни статии с импакт фактор (*International Journal of Molecular Sciences* - Q1, IF=4.9/2024; *International Journal of Molecular Sciences* - Q1, IF=5.6/2023; *Molecular Cell* - Q1, IF = 14.714/2018) и така са преизпълнени законовите изисквания за придобиване на научната и образователна степен „доктор“. В последната публикувана научна статия (12.2024 година) дисертката е първи автор, което доказва водещата роля, подчертания интерес и ангажираност на Теодора Дянкова-Дановска към изследваната проблематика. Получените резултати са докладвани на 10 Международни и Национални научни форуми. Забелязани са над 140 цитата на научните публикации, в които участва докторантката.

В заключение, представеният дисертационен труд категорично доказва, че докторантката Теодора Красимилова Дянкова-Дановска притежава сериозни и задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност Молекулярна биология, като демонстрира изключителни качества и умения за самостоятелно провеждане, анализ и презентиране на резултати от научни изследвания.

7. Автореферат

Представеният автореферат на дисертационния труд на Теодора Красимилова Дянкова-Дановска е оформен старателно и в съответствие със законовите изисквания. Той отговаря напълно на съдържанието на дисертацията и дава изчерпателна информация за проведените експерименти, получените резултати, обсъждане и анализ на проведените изследвания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният за обсъждане и защита дисертационен труд е резултат от прецизно осъществено изследване, резултатите от което са със съществена теоретична и приложна значимост. Въз основа на всичко гореизложено уверено мога да заявя, че рецензираният дисертационен труд на тема „*Кинетика на натрупване и премахване на белтъци от репликационната вилка при нейното спиране и рестарт*“ представлява оригинална научна разработка. Той отговаря на всички условия на Закона за развитие на академичния състав в Република България,

Правилника за неговото приложение и Правилника на Института по Молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ - БАН.

Всичко гореизложено ми дава основание убедено да изкажа своята положителна оценка за проведените изследвания в дисертационния труд, постигнатите резултати и приносите с научен и научно-приложен характер, като предлагам на почитаемото научно жури да присъди напълно заслужено образователната и научна степен „Доктор“ на Теодора Красимилова Дянкова-Дановска в Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, Професионално направление: 4.3. Биологически науки, Научна специалност „Молекулярна биология“.

17.12.2024 г.

Автор на рецензията:

(проф. д-р Албена Йорданова)