

Становище

за дисертационния труд на Теодора Красимилова Дянкова-Дановска

„Кинетика на натрупване и премахване на белтъци от репликационната вилка при нейното спиране и рестарт“

представен за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ по научна специалност „Молекулярна биология“.

Изготвил становището: доц. д-р Анастас Господинов

1. Обща част

Теодора Дянкова-Дановска разработва докторската си дисертация в Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ на Българската академия на науките, в лабораторията по геномна стабилност, под ръководството на доц. д-р Стойно Стойнов. Трудът е представен на 108 стандартни страници, включва 41 фигури и повече от 240 литературни източника. Работата е докладвана и одобрена на заседание на разширен научен семинар на института.

2. Актуалност на разработваната тема

Представения ми за становище дисертационен труд на Теодора Дянкова представлява приносно изследване върху динамичните процеси протичащи при спиране и рестарт на репликационната вилка. Приложен е оригинален подход, който е позволил промените в количеството на ключови репликационни фактори и на едноверижна ДНК (основна сигнална структура за репликационен стрес) да бъдат проследявани количествено, практически в реално време със секундна резолюция, нещо което е постигнато за пръв път. Важността на получените резултати и на изследователския подход се определят от факта, че репликационния стрес е основен фактор в етиологията на раковите заболявания. В допълнение, репликационния стрес е следствие от ефекта на болшинството противоракови средства.

3. Познаване на проблематиката

Литературният обзор в дисертацията на Теодора Дянкова-Дановска разглежда ключовите аспекти на ДНК репликацията, репликационния стрес и механизмите за справяне с него. Разгледани са подробно основните стъпки на репликацията: инициация, елонгация и терминация. Особено внимание е обърнато на функционирането на CMG комплекса, ролята на репликационните белтъци като PCNA и RPA, както и на динамиката на водещата и изоставащата верига. Описано е състоянието на репликационен стрес като основен фактор, компрометиращ геномната стабилност, полята на физическите пречки пред репликационните вилки, включително ДНК увреждания и труднодостъпни геномни региони, и метаболитни фактори като изчерпване на нуклеотидния резерв. Разгледани са механизмите на контролните пунктове във връзка с функциите на киназите ATM и ATR. Описани са. Подчертана е централната роля на ATR киназата в откриването и отговора на едноверижна ДНК (ssDNA),

както и взаимодействията ѝ с други белтъци участващи в запазването на геномната стабилност. Освен това е описано значението на белтъците PCNA и RPA в стабилизирането на вилката.

Литературният обзор на Теодора Дянкова-Дановска е отлично подготвен и демонстрира висока компетентност в научната област. Той не само предоставя задълбочен преглед на съществуващата литература, но и дава отлична основа за разбиране на научната значимост и иновативността на представеното изследване.

4. Методология

Основните експерименти са проведени с HeLa Kyoto клетки, модифицирани чрез рекомбинантни ВАС-ове за експресия на флуоресцентно белязани белтъци PCNA и RPA1. Тази техника осигурява експресия на белтъците на нива, близки до ендогенните, което гарантира физиологична релевантност на резултатите.

Основният метод за изследване е микроскопия на живи клетки с времева резолюция от 30 секунди. Използвани са комбинация от Airyscan и spinning disk микроскопия за проследяване на динамиката на PCNA и RPA1 в реално време. В хода на изследванията е индуциран репликационен стрес с хидроксиурея (HU), а ролята на киназите ATR и ATM е изследвана чрез използването на специфични инхибитори.

Данните от микроскопските изображения са анализирани с помощта на собствено разработени алгоритми и софтуер. Това включва измерване на интензитета на сигналите на PCNA и RPA1 в отделни репликационни фокуси и количествено определяне на фракцията от свързания и свободния белтък. За валидиране на нивата на експресия на белтъците и сравнение с техните ендогенни аналози е използван Western blot анализ.

Резултатите показват, че при репликационен стрес PCNA бързо се премахва от вилките, докато RPA се натрупва постепенно върху едноверижна ДНК (ssDNA). Възстановяването на нуклеотидния резерв след HU третиране води до бърз рестарт на вилките и премахване на RPA. Инхибирането на ATR значително ускорява натрупването на RPA, което води до изчерпване на резервите и натрупване на остатъчна ssDNA, докато ко-инхибирането на ATR и ATM предизвиква митотична катастрофа. Изследването демонстрира ролята на RAD18 при премахването на PCNA и стабилизацията на вилките, докато инхибирането на MRE11 не оказва съществено влияние върху наблюдаваните процеси.

Използваните методи позволяват детайлно проследяване на динамиката на белтъците в реално време и предоставят нови прозрения за клетъчния отговор на репликационния стрес. Това изследване осигурява значителен напредък в разбирането на тези процеси и отваря нови перспективи за разработване на антиракови терапии, насочени към ATR и ATM сигнализационните пътища.

5. Постигнати резултати

Дисертантката представя изследване върху динамиката на репликационните вилки при тяхното спиране и рестарт, като се използва подход, базиран на микроскопия на живи клетки с висока времева резолюция. При репликационен стрес, индуциран с хидроксиурея, се

наблюдават два основни процеса: бързо премахване на PCNA, което отразява спад в ДНК синтезата, и постепенно натрупване на RPA върху едноверижна ДНК. Процесът на натрупване на RPA достига до 2400 нуклеотида на вилка, дори при активен S-фазен контролен пункт.

Инхибирането на ATR води до деветкратно ускоряване на натрупването на RPA, което предизвиква изчерпване на клетъчните резерви от RPA в рамките на 20 минути. При рестарта на вилките, инхибирането ATR причинява задържане на количеството на едноверижната ДНК (до 600 нд едноверижна ДНК на вилка). Инхибирането на ATR не влияе върху кинетиката на повторното натрупване на PCNA или премахването на RPA1 по време на рестарта на вилките, но води до остатъчна фракция на RPA1, която остава свързана в репликационните фокуси.

Ко-инхибирането на ATR и ATM води до по-значително натрупване на ssDNA, което води до митотична катастрофа. От друга страна, възстановяването на нуклеотидния резерв след NU третиране позволява бърз рестарт на вилките без остатъчна ssDNA, което допринася за гладкото преминаване на клетъчния цикъл.

Допълнителни експерименти показват, че инхибирането на MRE11 влияе върху динамиката на PCNA и RPA, докато E3 лигазата RAD18 се натрупва при спрени вилки едновременно с премахването на PCNA.

Чрез използване на количествен анализ и математическо моделиране са определени кинетиката и точните количества белтъци, участващи в тези процеси. Тези резултати не само разширяват разбирането за клетъчния отговор на репликационния стрес, но също така предоставят основа за разработване на нови антиракови терапии, насочени към ATR и ATM сигналните пътища.

Тези резултати предоставят нови знания за белтъчната динамиката на репликационните вилки в условия на репликационен стрес. Това от своя страна предлага нови възможности за изучаване на антиракови агенти.

6. Заключение

Дисертацията на Теодора Дянкова-Дановска е висококачествено научно изследване, което освен предоставя оригинални резултати с изясняващи отговора на клетката на репликационен стрес с възможности за тяхното практическо приложение в биомедицинските науки. Авторката демонстрира отлична компетентност в научната област и успешно е приложила най-съвременни експериментални методи, разработени в Лабораторията по геномна стабилност.

Представени са 3 публикации свързани с дисертацията, една от които към момента на написване на становището е изпратена за публикация (с DOI). Общия импакт фактор на публикациите на Т. Дянкова е над 20 и те са цитирани над 140 пъти.

Предвид казаното считам, че дисертантката Т. Дянкова е изграден висококвалифициран млад изследовател, който напълно отговаря на изискванията за придобиването на ОНС „Доктор“. Препоръчвам на членовете на уважаемото научно жури да присъди на Теодора Дянкова-Дановска образователната и научна степен „Доктор“.

Подпис:

Доц. д-р Анастас Господинов

Дата: 18. 12. 2024 г.