

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Кирил Михайлов Мишев (ИФРГ-БАН)

за дисертационния труд „Кинетика на натрупване и премахване на белтъци от репликационната вилка при нейното спиране и рестарт“,

представен от **Теодора Красимирова Дянкова-Дановска** (Лаборатория по геномна стабилност, ИМБ-БАН) за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“

Дисертационният труд на тема „Кинетика на натрупване и премахване на белтъци от репликационната вилка при нейното спиране и рестарт“, представен от Теодора Красимирова Дянкова-Дановска за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“, е изработен под ръководството на доц. д-р Стойно Стойнов от Лабораторията по геномна стабилност към ИМБ-БАН.

Работата на Теодора Дянкова-Дановска е посветена на изучаване на механизмите за преодоляване на репликационен стрес в човешки клетки. Дисертантката разработва нов подход за проследяване на динамиката на ключови белтъчни фактори на репликацията и поправката на ДНК в репликационни вилки на единични фокуси при прекъсване и последващо възобновяване на процеса на ДНК синтез. За целта Т. Дянкова-Дановска генерира флуоресцентни маркерни линии и прилага конфокална микроскопия на живи клетки с висока времева резолюция в присъствие на специфични инхибитори на изследваните белтъци. За количествен анализ на интензитета на флуоресценцията в проследяваните репликационни фокуси в хода на клетъчния цикъл е създаден изчислителен алгоритъм в рамките на разработения в Лабораторията по геномна стабилност софтуерен пакет CellTool. По този начин дисертантката успява да проведе прецизни измервания на кинетиката на натрупване и премахване на изучаваните белтъци в репликационните вилки. Тези изследвания са с фундаментален характер, но имат и потенциално значение за идентифицирането и характеризирането на нови фармакологични мишени като част от бъдещи стратегии за лечение на заболявания, свързани с репликационен стрес.

Експерименталната работа на Т. Дянкова-Дановска се основава на използването на бърз и високоефективен подход за обратимо спиране и рестарт на репликационните вилки с помощта на инхибитора на рибонуклеотид редуктазната активност хидроксиурея (HU). При добавяне на HU в средата за култивиране на клетките синтезът на ДНК се преустановява, поради изчерпване на съдържанието на дезоксирибонуклеотиди, като процесът се възобновява скоро след отстраняването на инхибитора. С този подход дисертантката проследява динамиката на натрупване и премахване на флуоресцентно белязани PCNA (ключов компонент от състава на репликационната вилка) и на RPA1 като маркер за разпространение на участъци от едноверижна ДНК в репликационния фокус. Измерени са времевите интервали на изчезване на PCNA фокусите като функция от подтиснато *de novo* натрупване в присъствие на HU, както и на повторно свързване на тази белтъчна клампа в областта на репликационната вилка в периода след възстановяване на нуклеотидния пул. Прецизният анализ на интензитета на флуоресцентния сигнал в

съчетание с публикувани от други групи данни за абсолютния брой PCNA молекули в HeLa клетки е позволил на дисертантката да определи с висока точност броя на тези комплекси във всеки от периодите на спиране и рестарт на единична репликационна вилка. Подобни изчисления са направени и за RPA1 белтъка, който постепенно се натрупва в условия на спрял ДНК синтез и продължаващо разплитане на двете полинуклеотидни вериги, а в периода след отстраняване на HU бързо се премахва от областта на вилката. Пълното възстановяване на процеса на репликация във всяка от изследваните единични клетки обуславя наблюдаваното впоследствие ненарушено протичане на останалите фази от клетъчния цикъл.

Тази експериментална постановка се използва от Т. Дянкова-Дановска за анализ на регулаторните механизми, които осигуряват преодоляването на ефектите от репликационния стрес. Ключови регулаторни белтъци се явяват ATR и ATM киназите, които имат доказани редица белтъчни субстрати с роля в процесите на репликация и поправка на ДНК. Една от функциите на ATR е свързана с координирането на полимеразната и хеликазната активност. Съответно, при спиране на репликационната вилка дисертантката установява много по-интензивно генериране на едноверижна ДНК и натрупване на RPA1 в условия на подтисната активност на ATR. Рестартирането на вилката в присъствие на ATR инхибитор не води до пълно отстраняване на покритата с RPA1 едноверижна ДНК, което впоследствие предизвиква нарушена митоза. За разлика от ATR, подтискането на активността на ATM не се отразява на динамиката на натрупване и премахване на PCNA и RPA1 при спиране и рестарт на вилката. При комбинираното инхибиране на ATM и ATR обаче Т. Дянкова-Дановска успява да открие значението на ATM за намаляване на участъците с едноверижна ДНК, чието присъствие пречи пречи пречи преминаването в следващите фази от клетъчния цикъл. С помощта на специфични инхибитори дисертантката изследва ролята и на други белтъци от поправката на ДНК при индуциране на репликационен стрес като MRE11 и PARP1. Универсалността на направените изводи относно тенденциите на изменение на натрупването на PCNA и RPA1 при спиране и рестарт на репликационната вилка е потвърдена чрез провеждане на идентични експерименти и в други две човешки клетъчни линии. Подходът за индукция на репликационен стрес чрез третиране с HU е приложен от Т. Дянкова-Дановска за тестване също на взаимовръзката между PCNA и субединица 2 от комплекса на ДНК полимеразата δ по отношение на динамиката им при прекъсване и възобновяване на синтеза на ДНК. Информацията от всички гореописани микроскопски опити е обработена с компютърната програма CellTool, която позволява високопроизводителна обработка на голям брой файлове от time-lapse експерименти, включително автоматизирано сегментиране, проследяване на флуоресцентни фокуси, алгоритми за визуализация на резултатите и математическо моделиране на данните. Т. Дянкова-Дановска има съществено участие в етапите на създаване и оптимизиране на програмата в Лабораторията по геномна стабилност към ИМБ-БАН.

Литературният обзор и списъкът с използвана литература (общо 234 литературни източника) успешно синтезират наличната към момента информация относно отделните етапи от процеса на репликация, основните участващи белтъчни комплекси, механизмите на регулация и източниците на репликационен стрес. Тази част от дисертацията е изчерпателно илюстрирана с фигури и схеми, адаптирани от ключови обзорни публикации по разглежданата тематика. Недостатък представлява липсата на въвеждаща информация

за структурата и функциите на белтъците от поправката на ДНК MRE11 и PAXIP1, които са предмет на експериментална работа в дисертационния труд.

Целта и задачите на дисертационния труд са точно формулирани. Единствено задачата, свързана с проследяване на кинетиката на натрупване на PAXIP1 в местата на комплексни повреди на ДНК в условия на подтисната активност на ATM киназата не е интегрирана по подходящ начин в дисертационния труд. Дисертантката не е обосновала убедително необходимостта от провеждането на тези изследвания и не става ясно как получените с PAXIP1 резултати допринасят за изпълнението на формулираната цел на дисертацията. Използваните материали и прилаганите методи и подходи са описани изчерпателно и позволяват възпроизвеждане на експериментите при необходимост от валидиране.

Разделът „Резултати“ обхваща 40 страници (малко под половината от обема на дисертацията без библиографията) и съдържа 29 фигури, повечето съставени от няколко панела с данни. Дисертантката е направила прецизен анализ на получените резултати, въз основа на който са изведени обосновани заключения. В раздела „Дискусия“ Т. Дянкова-Дановска разглежда съставения от нея модел за динамиката на PCNA и RPA1 по време на и след репликационен стрес в светлината на предишни публикувани резултати. Изтъкнати са предимствата, които предоставя използваната експериментална система в сравнение с досегашни подходи, а именно високата ѝ времева резолюция и голяма процесивност при обработката на микроскопските изображения, осигурявана от CellTool. Изводите и приносите в края на дисертацията са ясно формулирани и напълно отразяват представените експериментални резултати. Изготвеният автореферат коректно резюмира дисертационния труд на Т. Дянкова-Дановска.

Статиите на Т. Дянкова-Дановска по темата на дисертацията са общо три, като две са публикувани в международни списания с квантил Q1 и висок импакт фактор, а третата е в процес на ревизия, като ръкописът е публично достъпен под формата на препринт в депозитна база данни. В две от публикациите дисертантката е първи автор (самостоятелно или споделено с Георги Дановски). Отлично впечатление прави ясното разграничаване на индивидуалните приноси от тези на останалите съавтори, като за две от статиите дисертантката предоставя разделителен протокол. Т. Дянкова-Дановска е съавтор в още една научна публикация извън темата на дисертацията, а общият брой забелязани до момента цитирания на статии с нейно участие е над 100. По време на работата си по дисертационния труд Т. Дянкова-Дановска е взела участие в 10 научни конференции в България и чужбина и е била част от научния колектив на 4 проекта, финансирани от МОН и ФНИ. Тези участия демонстрират високата научна активност на дисертантката.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Представеният дисертационен труд на Т. Дянкова-Дановска обобщава няколкогодишни изследвания, насочени към изясняване на регулаторните механизми за преодоляване на репликационен стрес в човешки клетки. Прилагането на съвременни микроскопски подходи с висока времева резолюция в съчетание с новосъздадени алгоритми за високопроизводителна обработка на изображенията и математическо моделиране на данните е позволило на дисертантката да проведе прецизни кинетични измервания в

единични репликационни фокуси. Получената информация има съществен приносен характер и допринася за по-пълно разбиране на пластичността на репликационната вилка, от която зависи нейната стабилност. В хода на работата са създадени и характеризирани ценни генетични конструкции, които могат да бъдат използвани в бъдещи изследвания, посветени на стресови фактори с ефект върху динамиката на вилката. Експерименталните резултати са публикувани в реномирани международни списания и част от тях вече са цитирани многократно. Въз основа на представените ми за становище материали и допълнителни справки считам, че са напълно изпълнени нормативните изисквания и **убедено препоръчвам на уважаемото научно жури да присъди на Теодора Красимирова Дянкова-Дановска образователната и научна степен „Доктор“ в професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Молекулярна биология“.**

16.12.2024 г.

Изготвил становището:

(Кирил Мишев)