

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**

**ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО**

**„АКАД. КИРИЛ БРАТАНОВ“**

---

**„ВЛИЯНИЕ НА СПЕЦИФИЧНИ МИКРО РНК-И В ТУМОРНАТА  
ПАТОГЕНЕЗА, ЧРЕЗ ПРОМЯНА НА ПРОЦЕСИТЕ НА АВТОФАГИЯ И  
ВРОДЕНА ИМУННА СИГНАЛИЗАЦИЯ“**

**Радостина Петкова Цветанкова**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на

Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

по професионално направление 4.3 Биологически науки

**Научна специалност: Имунология**

**Научен ръководител: Проф. Красимира Тодорова – Хайрабеян, дбн**

Лаборатория по „Репродуктивни ОМИКс технологии“

**София, 2024 г.**

Дисертационният труд е написан на 160 страници и е илюстриран с 4 схеми, 33 фигури, 3 таблици и 5 диаграми. Библиографията включва 359 литературни източника.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на ..... от ..... часа в заседателната зала на ИБИР-БАН, бул. Цариградско шосе №73, София, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности в ИБИР-БАН, пред научно жури в състав:

Вътрешни членове:

1. Проф. д-р Стефан Лолов, дмн
2. Доц. Диана Зашева, дб

Външни членове:

1. Проф. Радостина Александрова, дб – ИЕМПАМ - БАН
2. Проф. Христо Гагов, дб – БФ - СУ
3. Доц. д-р Анастас Пашов, дм – ИМикБ – БАН

Резервни членове:

1. Доц. Милена Мурджева, дб
2. Доц. Георги Николаев Георгиев, дб – БФ – СУ

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в Библиотеката на ИБИР-БАН, бул. Цариградско шосе №73, София, както и на интернет страницата на ИБИР (<http://ibir.bas.bg>)

*Забележка: Номерата на фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд.*



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**

**ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО**

**„АКАД. КИРИЛ БРАТАНОВ“**

---

**„ВЛИЯНИЕ НА СПЕЦИФИЧНИ МИКРО РНК-И В ТУМОРНАТА  
ПАТОГЕНЕЗА, ЧРЕЗ ПРОМЯНА НА ПРОЦЕСИТЕ НА АВТОФАГИЯ И  
ВРОДЕНА ИМУННА СИГНАЛИЗАЦИЯ“**

**Радостина Петкова Цветанкова**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на

Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

по професионално направление 4.3 Биологически науки

**Научна специалност: Имунология**

**Научен ръководител: Проф. Красимира Тодорова – Хайрабемян, дбн**

Лаборатория по „Репродуктивни ОМИКс технологии“

**София, 2024 г.**

## СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ.....	5
I. ЦЕЛ .....	6
II. ЗАДАЧИ.....	7
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	8
IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ.....	9
V. ИЗВОДИ.....	35
VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	36
VII. СПИСЪК С НАУЧНИТЕ СТАТИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	37
VIII. СПИСЪК С УЧАСТИЯ НА НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА.....	39

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

AR	андрогенен рецептор
DMSO	диметилсулфоксид
EMT	епително-мезенхимна трансформация
FBS	фетален телешки серум
GAPDH	глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа
LPS	липополизахарид
MFI	медианен флуоресцентен индекс
MAPK1	митоген-активирана протеин киназа 1
mTOR	таргет на рапамицин при бозайници
NF-kB	ядрен фактор капа-бета
PTEN	фосфатаза и тензин хомолог
PI3K	фосфоинозитид 3-киназа
PSA	простатно-специфичен антиген
RT-qPCR	обратно-транскриптазна количествена полимеразно-верижна реакция
ROS	реактивни форми на кислорода
SEAP	секреция на ембрионална алкална фосфатаза
TLRs	“toll”- подобни рецептори

## **ВЪВЕДЕНИЕ**

Простатният карцином е най-често срещаното онкологично заболяване при мъже в напреднала възраст в световен мащаб. Въпреки съвременните терапевтични и диагностични методи, той се нарежда на пето място сред туморите причиняващи смърт при мъжете, според GLOBAL CANCER OBSERVATORY към 2020г.

В съвременната медицинска практика най-често използвания неинвазивен диагностичен маркер е серумният PSA. Въпреки, че неговите повишени нива често корелират с метастатичната прогноза на това заболяване, той може да покаже фалшиво завишени резултати при немалигнени състояния на простатната жлеза, като доброкачествена простатна хиперплазия, възпаление на простатата или травматични състояния, а и също така нормални стойности при по-агресивни форми на простатен карцином. Именно тези данни налагат спешното откриване на нови диагностични и прогностични маркери, които да притежават нужната специфичност и чувствителност за по-точна диагностика на простатен карцином, с което да се повиши ранното откриване на това заболяване и същевременно да се подобрят терапевтичните резултати.

Подходящи кандидати за диагностика и терапия на онкологични заболявания, в това число и простатен карцином са микро РНК-ите. Те са малки не кодиращи протеин молекули, които са относително стабилни в различни биологични течности като кръв, слюнка, еякулат и урина. Те регулират редица жизненоважни сигнални пътища в клетката на пост-транскрипционно ниво. Променената регулация на микро РНК-ите има отношение към редица патологични състояния, включително и туморогенезата на простатен карцином. В предвид това, че техните експресионни нива показват както висока органо-специфичност, така и зависимост от стадия на заболяването те се явяват като надеждни неинвазивни биомаркери за диагностика на простатен карцином.

През последните години стана ясно, че експресията на повече от 60% от всички човешки гени е регулирана от микро РНК-ите, което дава предпоставка тези молекули да имат и терапевтична роля в туморогенезата. За тази цел се налага разкриването на допълнителни регулаторни механизми, повлияни от микро РНК-ите и участващи в онкогенезата чрез промяна на процесите на автофагия, митофагия, ДНК метилиране и вродена имунна сигнализация, повлияващи клетъчната миграция, пролиферация, диференциация и последваща терапевтична резистентност.

## **I. ЦЕЛ**

Целта на настоящия дисертационен труд бе да се проследят процесите на автофагия и вродена имунна сигнализация, след заглушаване на гена MAPK1 и модулиране на нивата на микро РНК-141 в простатната карциногенеза.

## II. ЗАДАЧИ

1. Проследяване на влиянието на микро РНК-141 върху вродените имунни сигнални пътища и неимунните такива в РС3 клетъчна линия.
2. Проследяване на ефектите на микро РНК-141 върху експресията на ATG16L и LC3 на транскрипционно и протеиново ниво в LNCaP и РС3 клетъчни линии.
3. Проследяване на ефектите на siMAPK1 върху експресията на ATG16L и LC3 на транскрипционно и протеиново ниво при LNCaP и РС3 клетъчни линии.
4. Проследяване на влиянието на инфламаторния стимул LPS върху относителните нива на ATG16L и LC3 транскриптите в РС3 клетъчна линия.
5. Проследяване на влиянието на микро РНК-141 в условия на глад и нормални условия в LNCaP и РС3 клетъчни линии върху процесите на автофагия и митофагия.
6. Проследяване на влиянието на MAPK1 ген в условия на глад и нормални условия в LNCaP и РС3 клетъчни линии върху процесите на автофагия и митофагия.
7. Проследяване на влиянието на MAPK1 ген върху проинфламаторната сигнализация, опосредствана от NF- $\kappa$ B в РС3 клетъчна линия.
8. Проследяване на влиянието на микро РНК-141 върху глобалното 5-mC ДНК метилиране в LNCaP и РС3 клетъчни линии.
9. Проследяване на влиянието на MAPK1 ген върху клетъчната миграция на LNCaP и РС3 клетъчни линии.

### III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### Материали

1. Метастатични клетъчни линии на простатен карцином – LNCaP (лимфна метастаза) и PC3 (костно - мозъчна метастаза)
2. Реагенти и трансфектиращи агенти
  - 2.2. Синтетични микро РНК-и – микро РНК-141 мимик и инхибитор (5 pmol)
  - 2.3. Синтетичен аналог на малка интерферираща РНК-а – siMAPK1 (5 pmol)
  - 2.4. Трансфектант
  - 2.5. Флуоресцентни бои и антитела за оценка на специфична и неспецифична автофагия
  - 2.6. Реагент за блокиране сливането на зрялата автофагозома с лизозомата
  - 2.7. Реагенти и праймери използвани за RT-qPCR
  - 2.8. Колориметрично отчитане на NF-kB сигналинга - SEAP Reporter Assay кит
  - 2.9. Глобално ДНК метилиране - кит 5-тС ДНК ELISA кит
  - 2.10. Кит за изготвяне на библиотека - Ligation Sequencing kit ID

#### Методи

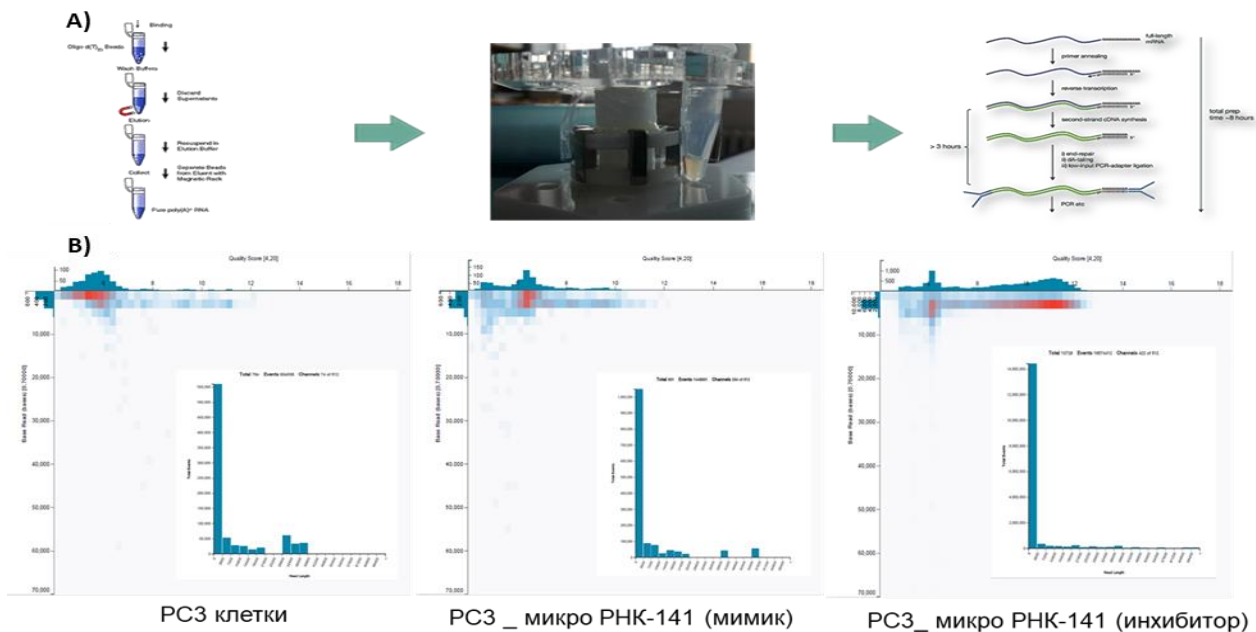
1. Обратно-транскриптазна полимеразно-верижна реакция (RT-qPCR)
2. Нанопорово секвениране от ново поколение (Oxford Nanopore)
  - 2.1. Изолване на иРНК и синтез на копи ДНК
  - 2.2. Подготовка на библиотека за секвениране
  - 2.3. Сравнителен транскриптомен анализ
3. Тест за оценка на клетъчната миграция (Scratch тест)
4. Проточна флоуцитометрия
5. Флуоресцентна микроскопия
6. Трансфекция
7. Клетъчно култивиране
8. Колориметричен метод
9. Метилационен анализ
10. Софтуерна обработка на данните – Статистически анализ - GraphPad Prism8, Flowing Software 2.5.1 (Turku Bioscience), ImageJ софтуер, SeqMonk, g:Profiler (функционално обогатяване на гени).



#### IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

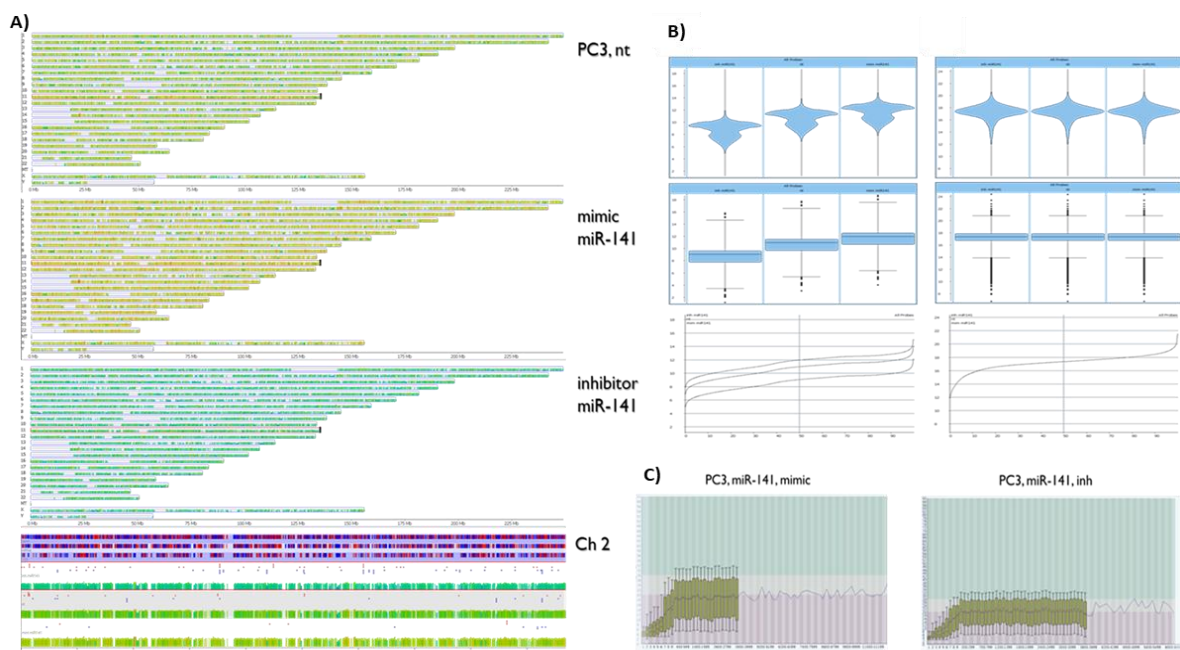
### МИКРО РНК-141 ИНИЦИИРА ПОТИСНАТ ТУМОРЕН ФЕНОТИП ПРИ РС3 КЛЕТЪЧНА ЛИНИЯ

В настоящия дисертационен труд бе проследена регулацията на автофагията и митофагията, опосредствана от микро РНК-141 в два метастатични модела на простатно-карциномни клетъчни линии. Раковите стволови клетки (CSCs), както и нарушения в клетъчната пролиферация и апоптоза (Baohong Z. et al., 2008) имат основна роля в туморогенезата при редица онкогенни заболявания. През последните няколко години доказателствата, че много от тези процеси са регулирани именно от микро РНК-ите, значително се увеличават (Scheel C. et al., 2012; Alison MR et al., 2011). Установено и описано в няколко литературни източника бе, че микро РНК-141, която е част от микро РНК-200 семейството, се експресира аномално в редица злокачествени човешки тумори и участва в различни клетъчни процеси, в т.ч. пролиферация, миграция, инвазия и епително-мезенхимния преход (EMT) (Gao Y. et al., 2016).



**Фиг. 1. Нанопорово секвениране.** **A)** Схематично представяне на изолиране на *i*РНК от трансфектирани с микро РНК-141 мимик/инхибитор РС3 метастатични клетки на простатен карцином, конверирането ѝ в копи ДНК и изготвяне на библиотека за секвениране, посредством *Ligation Sequencing kit 1D (LSK 108)*. **В)** Разпределение на дължините и качеството на прочитите (*cDNA Sequencing for the MinION™ device, 9.4 flow cell*).

В литературата е описано, че микро РНК-141 има дуалистична роля при различните тумори, но това строго зависи от вида карцином и стадия му на развитие. Някои автори съобщават, че повишената експресия на микро РНК-141 се ограничава в туморните епителни клетки, за разлика от стромалните и е свързана с по-лоша прогноза за лечение и по-агресивен карцином на простатата (Richardsen E. et al., 2019). В други литературни източници се докладва, че микро РНК-141 притежава и тумор-супресорни свойства при ПК. Чрез секвениране бе установено, че микро РНК-141 потиска простатните ракови клетки, които са CD44+ и EZH2 положително маркирани, и метастазирането, чрез таргетиране на про-метастатични гени. Други неини таргетни мишени са членове от семейството на Rho GTPase (CDC42, CDC42EP3, RAC1 и ARPC5), с което се доказва, че микро РНК-141 използва множество механизми за възпрепятстване растежа и развитието на тумора и метастазите (Gao Y. et al., 2016; Liu C. et al., 2017).



**Фиг. 2. Нанопорово секвениране.** *А) Анализ на диференциалната експресия. Прочити картирани чрез SeqMonk спрямо GRCh38 референтен човешки геном. В) Нормализиране на прочитите в SeqMonk при третирани PC3 клетки с микро РНК-141 мимик/инхибитор и нетретирани клетки. Осредняване и премахване на отклоненията на експресията (outlier). С) FastQC качествен рейтинг и позиция на прочитите (bp) във всички бази.*



**Фиг. 3. Нанопорово секвениране. Имуни и неимуни сигнални пътища, изведени посредством анализ за обогатяване на генен набор – g:Profiler (G:GOST) на база откритите гени след транскриптомния анализ.**

В настоящото изследване, бе направено нанопорово секвениране (Фиг. 1 и Фиг. 2) на РС3 клетъчна линия (костно-мозъчна метастаза на простатен карцином). След като третирахме клетките, в *in vitro* условия, с микро РНК-141 (синтетичен инхибитор) установихме сигнални пътища свързани с Rho GTPase активиращи KTN1 ген и сигнални пътища, участващи във везикуларната биогенеза на лизозомите. Един от механизмите на кинектин-медираната Rho GTPase е да участва в цитоскелетната динамика, клетъчното придвижване, клетъчното делене и транспорта на везикули и органели в клетката (в т.ч. лизозомален транспорт) (Toyoshima I. et al., 1992; Vignal E. et al., 2001; Gao L. et al., 2021). Кинектин 1 е протеин, който се кодира от KNT1 ген. Повишената експресия на KNT1 е свързана с лоша прогноза, стимулиране на растежа и инвазията при тройно негативен карцином на гърдата (TNBC). Свърхекспресираният KTN1 може значително да повиши протеиновите нива на фосфорилиран NF-κB/p65 в Ser536, чрез взаимодействие с NF-κB/p65, а това да повиши нивата на провъзпалителни цитокини, като CXCL8 (Gao L. et al., 2021). Хроничното възпаление може да бъде една от причините за възникване и развитие на малигнено заболяване. След като направихме трансфекция на РС3 клетъчната линия със синтетичен аналог на микро РНК-141, не бе установена експресия на Rho GTPase/KTN1 гени, а по-скоро на гени, които обуславят тумор-потиснат фенотип. Бяха открити свързани с автофагия TAK1 пътища, TAK1-NFκB и TAK1-p38MAPK взаимодействия (Фиг. 3) и обогатени

сигнални пътища, участващи във вродения имунитет след трансфектиране на клетките с микро РНК-141 мимик. TAK1 активира p38MAPK, която е класическа киназа, имаща участие в пролиферацията и клетъчното оцеляване и NF-κB транскрипционния фактор (*Таблица 1*). Активната TAK1 киназа участва в убиквитинирането на IκB инхибитора на NF-κB, което позволява на транскрипционния фактор да премине през ядрените пори и да индуцира имунен отговор чрез продуциране на про-инфламаторни фактори (Koul HR et al., 2013). От друга страна TAK1 инхибира фосфорилирането на p70 S6 киназа 1 (S6K1), като по този начин индуцира автофагия (Shin J. et al., 2013).

<b>Pathways enriched after miR-141 downregulation via inhibitor (tumour enriched phenotype)</b>	<b>Pathways enriched after miR-141 rescue-mimic upregulation (tumour suppressed phenotype)</b>
RHO GTPases activate KTN1	p75NTR recruits signalling complexes
FGFR2 alternative splicing	p75NTR signals via NF-κB
Cytosolic tRNA aminoacylation	JNK (c-Jun kinases) phosphorylation and activation mediated by activated human TAK1
Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA	activated TAK1 mediates p38 MAPK activation
Acyl chain remodelling of PC	TAK1 activates NF-κB by phosphorylation and activation of IKKS complex
Insulin processing	TRAF6 mediated Induction of NF-κB and MAP kinases upon TLR7/8 or 9 activation
Acyl chain remodelling of PE	Toll Like Receptor 4 (TLR4) Cascade
Lysosome Vesicle Biogenesis	NOD1/2 Signalling Pathway

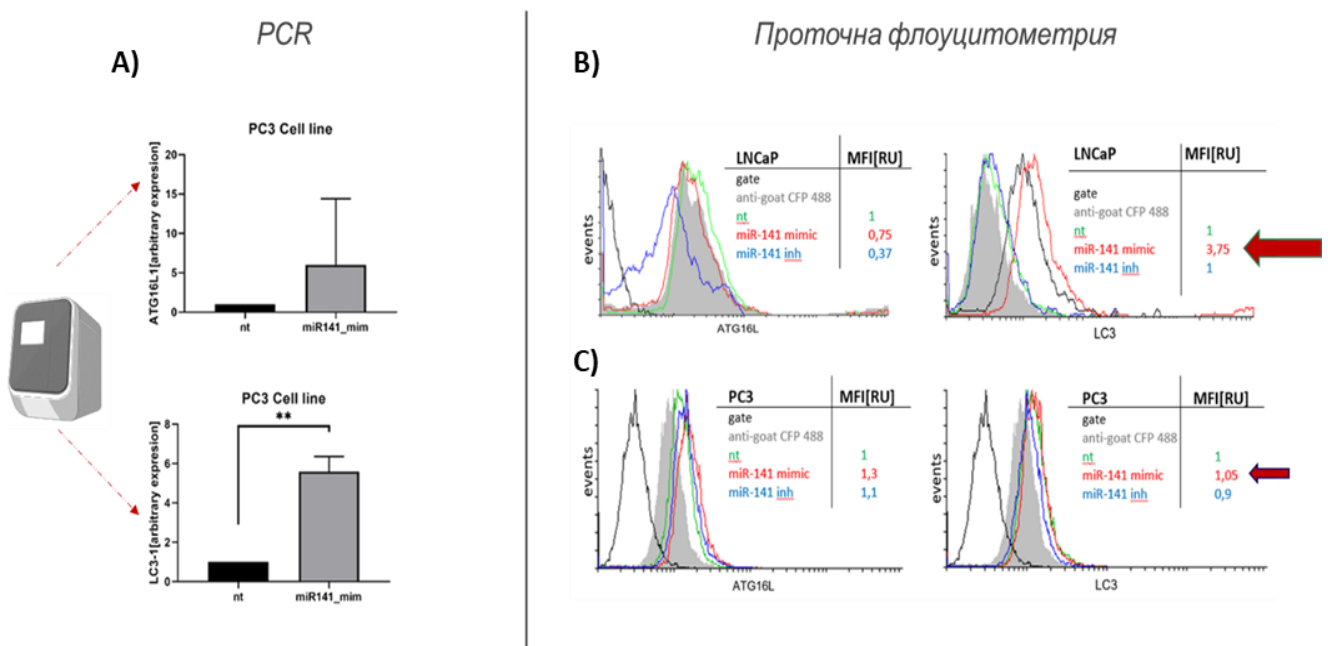
**Таблица 1. Нанопорово секвениране. Обогатени сигнални пътища след трансфектиране с микро РНК-141 мимик и микро РНК-141 инхибитор.**

В нашето проучване открихме също така сигнални пътища, които участват в активирането на NF-κB и MAPKs, опосредствано от TRAF6 (TNF Receptor Associated factor 6). Повишената експресия на TRAF6 може да бъде благоприятна поради индуцирането на имунен отговор в клетката, но проучванията показват, че високата експресия на TRAF6 корелира с лоша прогноза за пациенти с плоско-клетъчен карцином на глава и шия и може да промотира лимфни метастази (Wang J. et al., 2020; Chen L. et al., 2017). Въпреки задълбочените изследвания върху ролята на микро РНК-

141, има нужда от провеждане на още изследвания за изясняване на точната ѝ роля в простатната карциногенеза.

### МИКРО РНК-141 ПОВИШАВА ATG16L И LC3 ПРИ PC3 КЛЕТКИТЕ И ПОВИШАВА LC3 ЕКСПРЕСИЯТА ПРИ LNCaP КЛЕТЪЧНА ЛИНИЯ

В настоящият дисертационен труд бе проследена връзката между микро РНК-141 и автофагията на транскрипционно и протеиново ниво в две метастатични клетъчни линии на простатен карцином. Данните от тези изследвания ни дават по-добър поглед върху ефекта на микро РНК-141 асоцииран с процесите на макроавтофагия. На транскрипционно ниво, след като увеличихме нивата на микро РНК-141 в клетъчен модел на костно-мозъчна метастаза - PC3 (AR<sup>-/-</sup>; p53<sup>-/-</sup>), установихме че ранният и късният маркер за автофагия (ATG16L и LC3-1) бяха повишени спрямо контролните клетки (**Фиг. 4 А**). При проследяване на протеиновата експресия на ATG16L и LC3, бе



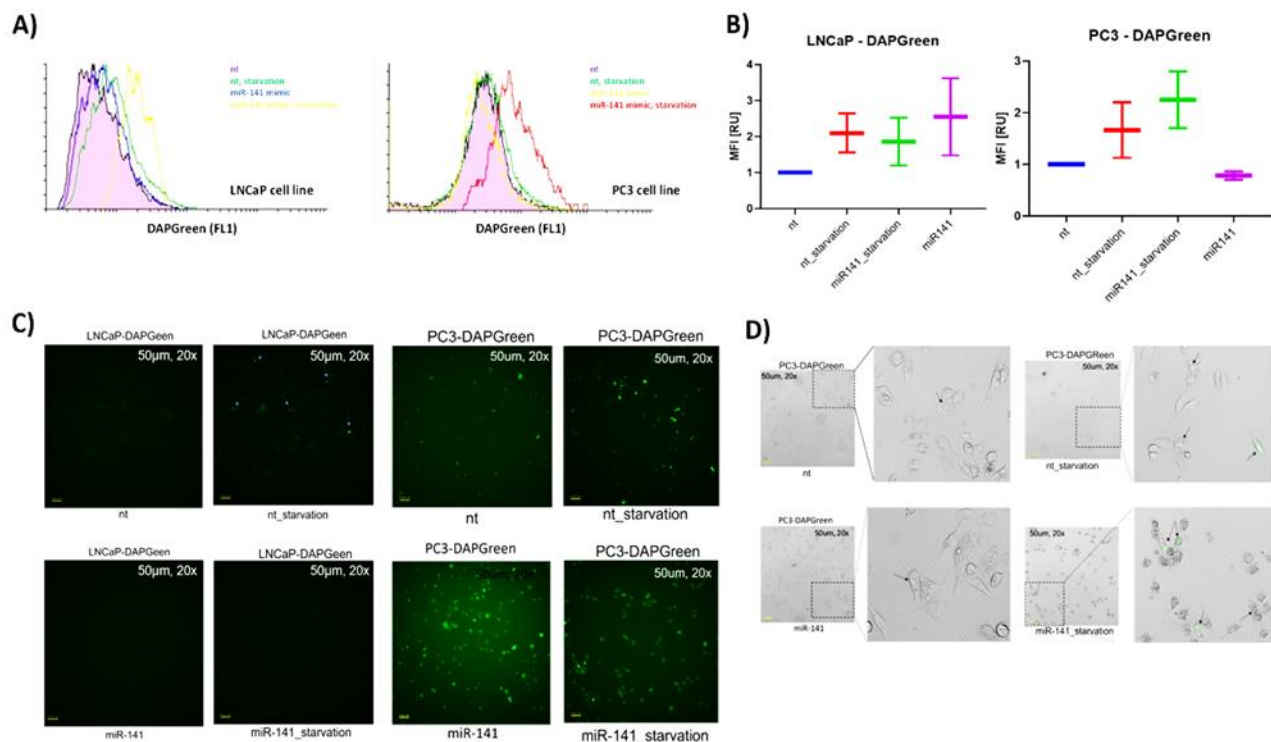
**Фиг. 4. Влияние на микро РНК-141 върху маркери за автофагия.** А) Относителна експресия на транскриптите на ATG16L и LC3-1, след модулиране нивата на микро РНК-141 в PC3 клетъчна линия, сравнени с контрола нетретирани клетки. **\*\*P<0,01; S.D., n=2.** FCS хистограми изведени чрез Flowing Software 2.5.1 (Turku Bioscience), показващи ефекта на микро РНК-141 мимик/инхибитор върху протеиновата експресия на ATG16L и LC3 при LNCaP **В**) и PC3 клетъчни линии **С**). Експресията е представена чрез медианен флуоресцентен индекс (MFI), а получените стойности са нормализирани към единица (1) контрола.

установено слабо завишаване на маркерите за автофагия при PC3 клетки (**Фиг. 4 С**). Това явление, най-вероятно, се дължи на регулация от други молекули (в т. ч. РНК-и), които повлияват деструктивно ATG16L и LC3 и РНК-и. След трансфектиране на LNCaP клетките с микро РНК-141, установихме че протеиновите нива на LC3 маркера бяха завишени спрямо контролата нетретирани клетки (**Фиг. 4 В**). В различните етапи от развитие на простатния карцином, променената регулация на автофагията може да потенцира по различни начини туморния растеж. Силно индуцираната автофагия, при по-късни стадии, може да потенцира туморния растеж чрез подпомагане на клетъчното оцеляване в хипоксична среда и среда бедна на хранителни вещества. В ранни стадии, при инхибиране на автофагията, туморния растеж може да бъде подпомогнат чрез натрупване на много свободни радикали в клетките и това да доведе до повишена онкогенност (Ziraro E. et al., 2013).

### **МИКРО РНК-141 ПОВИШАВА МАКРОАВТОФАГИЯТА ПРИ PC3 КЛЕТЪЧНА ЛИНИЯ В УСЛОВИЯ НА ГЛАДУВАНЕ**

В настоящия дисертационен труд проследихме влиянието на микро РНК-141 върху автофагията в различни условия на *in vitro* клетъчно култивиране. При проследяване на неспецифичната макроавтофагия, посредством цитометричен анализ и DAPIGreen оцветяване, бе установено че самостоятелно микро РНК-141 не повишава нивата на макроавтофагия, но комбинирането и с гладуване (**Фиг. 5 В**), доведе до по-силна автофагиялна индукция. Този ефект бе наблюдаван и при флуоресцентни микрофотографии, направени в същата постановка (**Фиг. 5 D**). Проследихме нивата на макроавтофагия и при LNCaP клетките чрез оцветяване с DAPIGreen боя, след увеличаване на микро РНК-141. Данните от получените резултати показаха, че макроавтофагията се индуцира от гладуване, но по-силен сигнал отчетохме след трансфекция с микро РНК-141 (**Фиг. 5 В**). Чрез флуоресцентна микрофотография успяхме да локализираме DAPIGreen боя само при клетките, които са поставени в условия на гладуване (**Фиг. 5 С**). Тези резултати ни показват, че вероятно p53<sup>+/+</sup> LNCaP клетките, със запазена андроген рецепторна сигнализация пряко използват процесите на автофагия като конкурентни пътища на апоптозата при избор на оцеляване.

Автофагията подпомага туморните клетки да се справят с метаболитния стрес, което до известна степен може да потисне туморогенезата. Неправилната регулация на p62, който е ключов участник в крайните стъпки при формиране на автофагозома води до повишаване на ROS (Robin Mathew et al., 2009). В условията на намалени в тумора



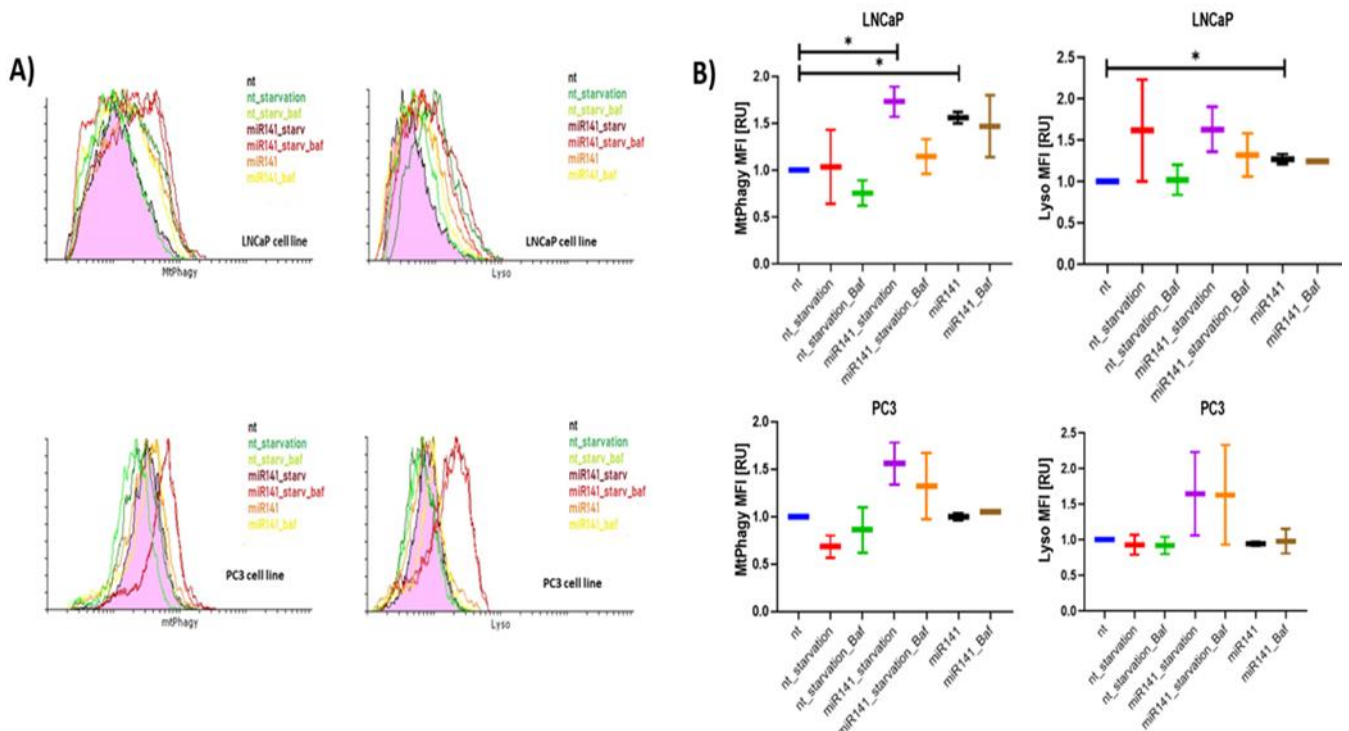
**Фиг. 5. Влияние на микро РНК-141 върху макроавтофагията. А) FCS хистограми на LNCaP и PC3 клетки в различни условия изведени чрез Flowing Software 2.5.1 (Turku Bioscience). В) Графично представяне на флоуцитометричен анализ (FCS), показващ влиянието на микро РНК-141 мимик върху макроавтофагията при LNCaP и PC3 клетки, в нормални условия и условия на гладуване. Експресията е представена чрез медианен флуоресцентен индекс (MFI), а получените стойности са нормализирани към единица (1) контрола. Ех. 488 пт/Ет. 500-563пт; S.D., n=2. Флуоресцентна микроскопия (Etalita). Качествена оценка на макроавтофагията в нормални условия, условия на гладуване, след трансфекция с микро РНК-141 и в комбинация от двата стимула при LNCaP C) и PC3 клетъчните линии D); (20x).**

нива на микро-РНК 141, които се посочват в редица научни съобщения при изследване на нивата на тази микро РНК-а, в т.ч. и костни метастази (Huang S. et al., 2017), наблюдаваната намалена митофагия, особено в условия на метаболитен недоимък, е един от механизмите усилващи развитието на още по-злокачествени мутантни форми.

### **МИКРО РНК-141 В УСЛОВИЯ НА ГЛАДУВАНЕ ИНДУЦИРА МИТОФАГИЯ ПРИ LNCaP И PC3 КЛЕТЪЧНИ ЛИНИИ**

Данните от проведената експериментална постановка с PC3 клетки показват, че условията на гладуване, не повишиха нивата на митофагия при костната метастаза

обект на нашите изследвания. Микро РНК-141 самостоятелно също не повлия този процес, но комбинацията от гладуване с микро РНК-141 доведе до силна индукция на митофагията. А добавянето на Бафиломицин А1 към средата блокира флукса автофагозома-лизозома (**Фиг. 6**). От флуоресцентната микроскопия, която беше



**Фиг. 6. Влияние на микро РНК-141 върху митофагията. А)** FCS хистограми на LNCaP и PC3 клетки в различни условия изведени чрез Flowing Software 2.5.1 (Turku Bioscience). **В)** Графично представяне на флоуцитометричен анализ на LNCaP и PC3 клетъчни линии. Ефектът на микро РНК-141 мимик върху митоавтофагоцитарния флукс в нормални условия, условия на гладуване, след трансфекция с микро РНК-141 и след третиране с Vafilomicin A1. Експресията е представена чрез медианен флуоресцентен индекс (MFI), а получените стойности са нормализирани към единица (1) контрола. Ex. 530 nm/Em. 700 nm (MPhagy) и Ex. 398 nm/Em. 525 nm (Lyso); \* $P < 0,05$ ; S.D.;  $n = 2$ .

направена, най-силен сигнал се прояви при клетките, в които бяха увеличени нивата на микро РНК-141 в условия на гладуване (**Фиг. 7**), както и след добавяне на Бафиломицин А1. Вероятно поради силната стимулация от тези третираня, морфологията на клетките също беше нарушена. Тъй като митофагията е процес на избирателно разграждане и премахване на дефектни или повредени митохондрии от клетката, този процес е важен и за поддържането на клетъчната хомеостаза.

Тъй като едни от характеристиките на микро РНК-ите са, че те могат да модулират множество генни транскрипти (Agrawal N. et al., 2003), бе интересно да се проследи по

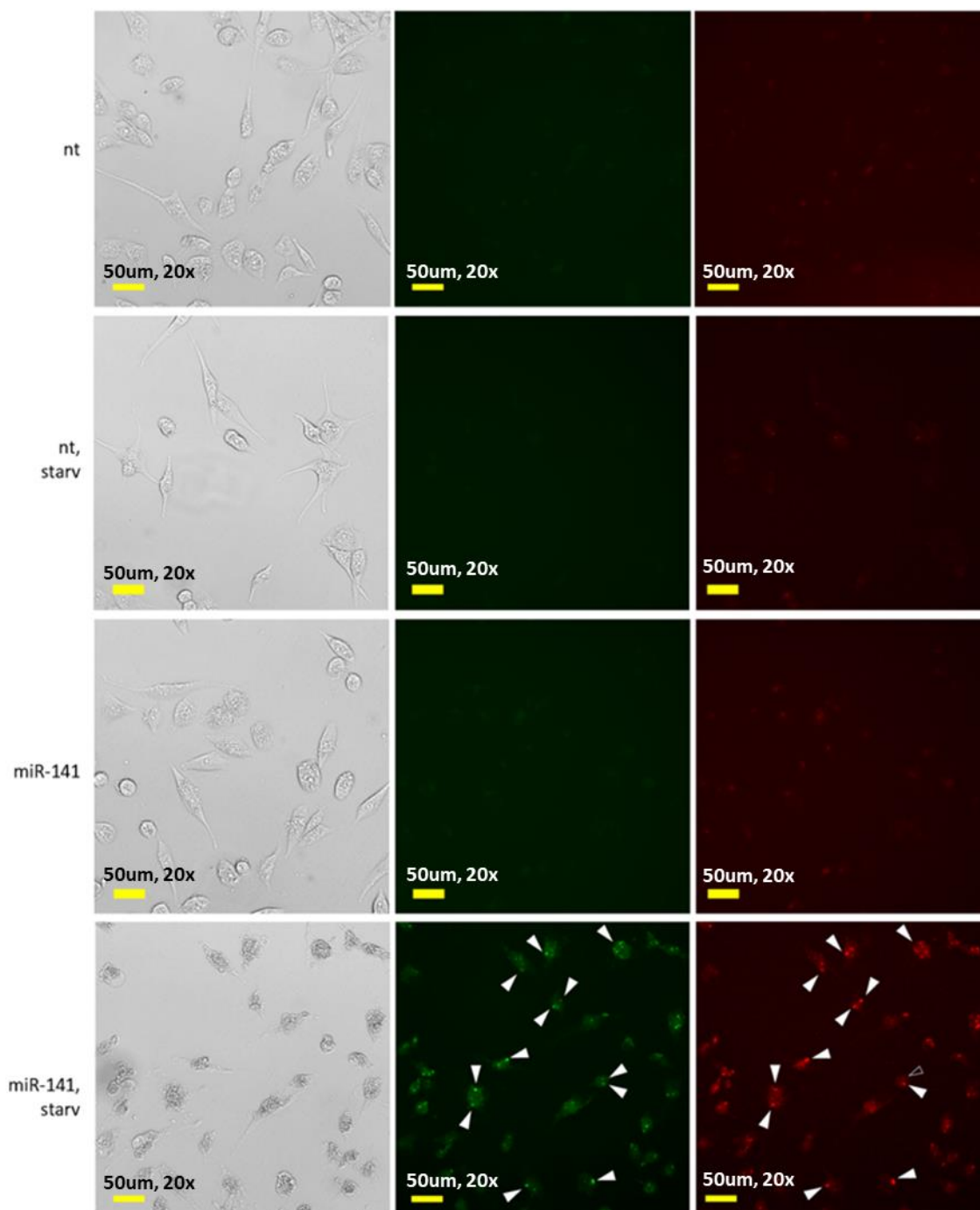


какъв начин микро РНК-141 ще повлияе митофагията при лимфо-възлов метастатичен модел на простатен карцином в различни условия на клетъчно култивиране. Митофагията не се повлия от ниската концентрация на глюкоза и липсата на фетален телешки серум в средата за култивиране. В аналогични условия, инициращи гладуване, след трансфектиране на LNCaP клетките със синтетичен аналог на микро РНК-141, бе отчетен най-силен сигнал на флуоресценция. Когато добавихме микро РНК-141 в нормални условия на клетъчно култивиране, отново наблюдавахме повишена митофагия, което е показателно, че митофагията при LNCaP клетъчна линия се повишава в резултат от увеличаване нивата на микро РНК-141. При същата експериментална постановка проследихме и интензитета на светене на лизозомите, които бяха маркирани с друга рН-зависима боя (Lyso). Установихме, че силата на флуоресцентния сигнал съвпада с интензитета на светене при увредените митохондрии, които са в процес на митофагия. Нивата на формираните лизозоми при условия на гладуване бяха по-високи, в условия на гладуване, спрямо контролата нетретирани клетки и спрямо митохондриите в процес на разграждане, това може да се дължи на друг вид автофагия. Загубата на митохондриалната мембрана и деполяризацията на митохондриите предхождат митофагията и това има пряка роля в последващото им „поглъщане“ от автофагозоми (Chourasia A.N. et al., 2015). Тук можем да спекулираме, че микро РНК-141 положително регулира увреждането на митохондриите. Но от друга страна тя може да се разглежда като полезен участник в този процес, като индуцира повишена митофагия и по този начин участва в метаболизирането на митохондрии, които са загубили своя функционален потенциал. Но дали това няма да подобри преживяемостта на карциномните клетки и ще доведе до по-лоша прогноза при това заболяване е обект на още проучвания.

### **СВРЪХЕКСПРЕСИЯТА НА AR ПРИ LNCaP КЛЕТКИТЕ ИМА ПРЯК ЕФЕКТ ВЪРХУ ДНК ДЕМЕТИЛИРАНЕТО МЕДИИРАНО ОТ МИКРО РНК-141**

Нивата на микро РНК-141 са повишени в клетъчната линия LNCaP (p53<sup>+/+</sup>; AR<sup>+/+</sup>), в сравнение с костно-мозъчната метастатична PC3 (p53<sup>-/-</sup>; AR<sup>-/-</sup>) клетъчна линия. Това е обратно пропорционално на метилирането на промоторната област на микро РНК-141, която е неметилирана при лимфната метастаза, но хиперметилирана в PC3 клетъчната линия (*Схема 1.*). Тумор-супресорната роля на микро РНК-ите в онкогенезата на простатата, включително микро РНК-141, е от решаващо значение за предотвратяване на епително-мезенхимния преход (Lynch SM et al., 2016). AR-сигнализирането има

сложно участие в прехода на простатен карцином към хормонална резистентност. Първоначално повишеното AR-сигнализиране се променя и става под влиянието на отделен препрограмиран AR-транскрипционен контрол, за да насърчи епително-мезенхимния преход (Todorova K. et al., 2016).

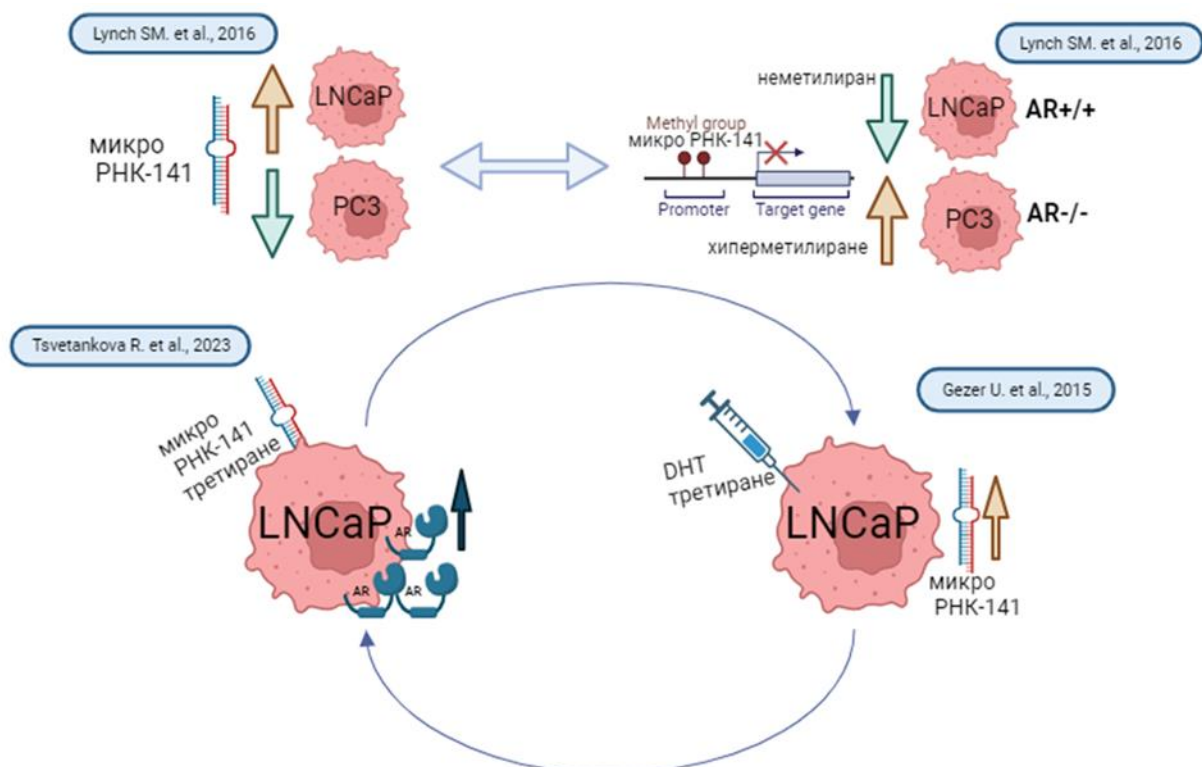


**Фиг. 7. Флуоресцентна микрофотография (Etaluma). Локализиране на лизозоми (зелено) и увредени митохондрии (червено) при PC3 клетъчната линия в нормални условия, условия на гладуване, трансфекция с микро РНК-141 и комбинация от двата стимула; (20x).**

Следователно ролята на микро РНК-141 е от по-голямо значение в този процес, отколкото в по-ранните процеси на ПК.

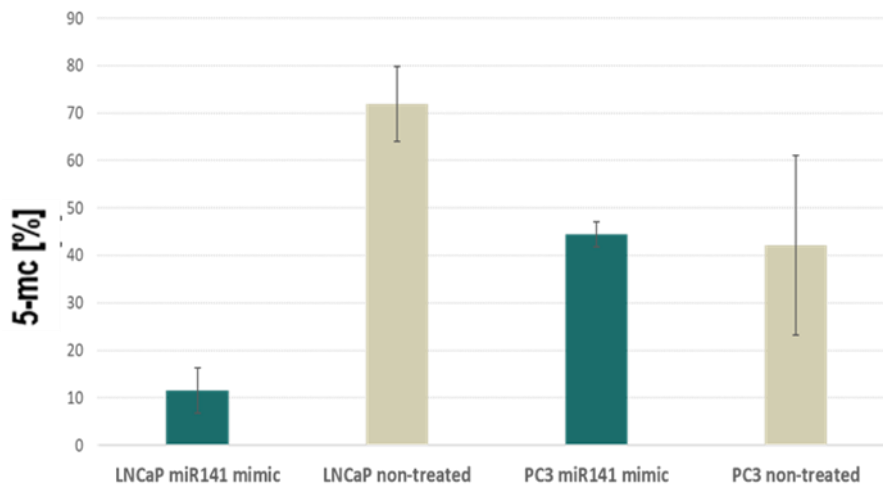
В настоящия експеримент, ние увеличихме нивата на микро РНК-141, използвайки 24-часова трансфекция, за да проследим ролята ѝ върху глобалното ДНК метилиране в LNCaP и PC3 клетъчните линии. От това функционално изследване бе установено, че тоталните нива на метилиране на ДНК бяха значително намалени в AR-позитивната LNCaP клетъчна линия, докато възстановяването на микро РНК-141 не показва значителен ефект в AR-отрицателната PC3 клетъчна линия (**Фиг. 8**).

В предишни проучвания бе показано, че нивата на микро РНК-141 са андрогенно регулирани и *in vitro* стимулирането с ДНТ (дихидротестостерон) на LNCaP клетъчна линия, също повишава експресията на микро РНК-141, в зависимост от дозата (Gezer U. et al., 2015) (**Схема 1**). В предишни наши проучвания ние открихме, че увеличаването на микро РНК-141 посредством синтетичен мимик, допълнително увеличава AR експресията, насърчавайки неблагоприятната положителна обратна връзка.



**Схема 1.** Нивата на микро РНК-141 са под андрогенна регулация и вероятно са под епигенетичен контрол. Свръхекспресията на AR при LNCaP клетките има пряк ефект върху ДНК деметилирането медирано от микро РНК-141.

Ние поставяме хипотезата, че свръхекспресията на андрогенния рецептор в LNCaP клетъчната линия има пряк ефект върху деметилирането на ДНК под влияние на микро РНК-141, за разлика от AR-отрицателните PC3 клетки, като по този начин допълнително се насърчава ROS про-възпалителното сигнализиране, причинено от ROS деметилирането. В устойчив на кастрация ПК, подобно на PC3 костно-мозъчната метастаза (Hayrabedyan S./K. et al., 2013), прекомерното завишаване на ROS би увредило сериозно клетката и клетъчните структури, като тези аберации могат да бъдат редуцирани чрез MAPK1-медирано активиране на автофагия.

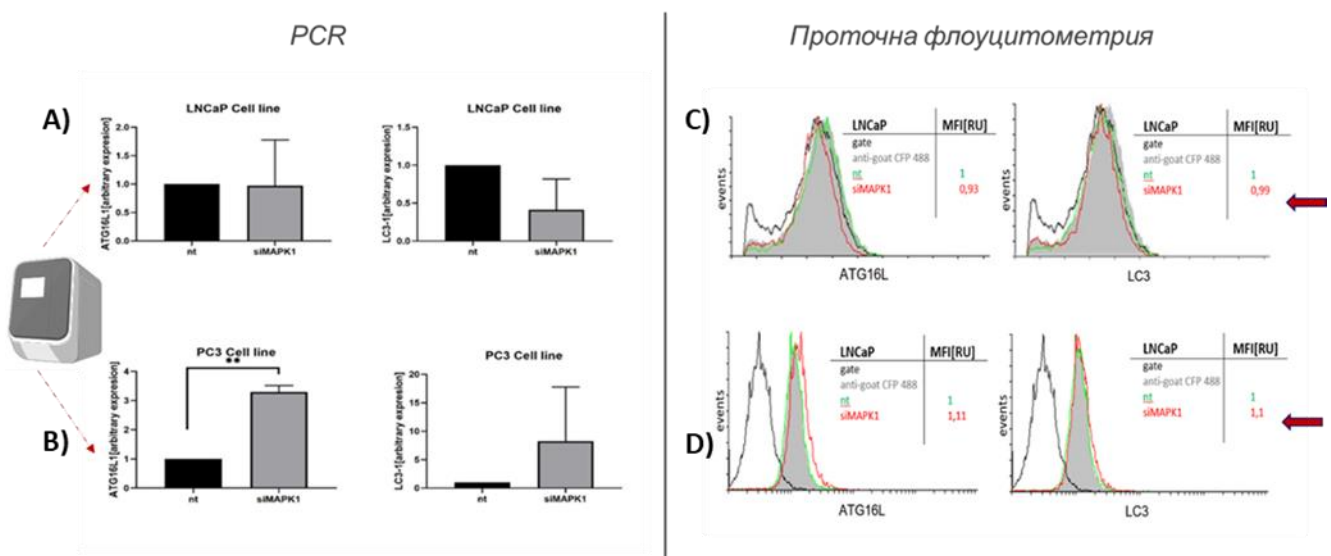


**Фиг. 8. Глобално ДНК метилиране (5-мС).** Количествено определяне на ДНК метилиране (5-мС) чрез ELISA четец в LNCaP и PC3 метастатични клетъчни линии на простатен карцином след 24-часова трансфекция с микро РНК-141 мимик. Отчитането на стойностите бе направено на 30 мин.; Abs: 405 nm; S.D.; n=2.

Въпреки несъмнения прогрес в разкриване на механизмите на действие на тези некодиращи РНК-и, все още съществуват много неизвестни около тях и влиянието им върху простатната карциногенеза. Напоследък все повече проучвания се правят за изследване на микро РНК-и в урината. Настоящите подходи за откриване на ПК са инвазивни и не са чувствителни към ранните форми на заболяването. Много проучвания са необходими, за да може ПК да бъде диагностициран неинвазивно посредством откриването на микро РНК-и в телесни течности като кръв и урина, но несъмнено в близкото бъдеще, с напредване на биотехнологиите и науката, микро РНК-ите ще бъдат установени като нови биомаркери за диагностика на ПК и прогнозиране на резултатите от лечението му (Won Tae Kim et al., 2013).

## МАРК1 ПОЛОЖИТЕЛНО РЕГУЛИРА LC3 ПРИ LNCaP, НО ИМА НЕГАТИВНА РЕГУЛАЦИЯ ВЪРХУ АТG16L И LC3 ПРИ РС3 КЛЕТЪЧНА ЛИНИЯ

В настоящия дисертационен труд бе проследено влиянието на малки интерфериращи РНК-и специфични за МАРК1 върху маркерите за автофагия. На транскрипционното и протеиновото ниво, установихме че заглушаването на МАРК1 потиска нивата на LC3 в LNCaP клетъчната линия, докато в РС3 клетъчната линия нивата на АТG16L и LC3 бяха завишени спрямо контролата нетретирани клетки (**Фиг. 9**).



**Фиг. 9. Влияние на siMAPK1 върху маркери за автофагия.** Относителна експресия на транскриптите на АТG16L и LC3-1, след генно заглушаване със siMAPK1 в LNCaP **A**) и РС3 клетъчна линия **B**), сравнени с контрола нетретирани клетки.  $**P < 0,01$ ; S.D.,  $n=2$ . FCS хистограми изведени чрез Flowing Software 2.5.1 (Turku Bioscience), показващи ефекта на siMAPK1 върху протеиновата експресия на АТG16L и LC3 при LNCaP **C**) и РС3 клетъчни линии **D**). Експресията е представена чрез медианен флуоресцентен индекс (MF1), а получените стойности са нормализирани към единица (1) контрола.

Наскоро бе показано, че МАРК1 (ERK2/МЕК/p42), член на семейството на митоген-активираните протеин кинази (МАРК), е свързана с туморна прогресия, инвазия и метастази (Lee S. et al., 2020). МАРК1 често е свръхекспресирана при резистентен на кастрация карцином на простатата (Mukherjee R. et al., 2011). МАРК1 (ERK2) може също да активира транскрипционния фактор NF kappa B (NF-κB) чрез фосфорилиране на неговия инхибитор I kappa B alpha (IKBα), което води до неговото убиквитиниране и

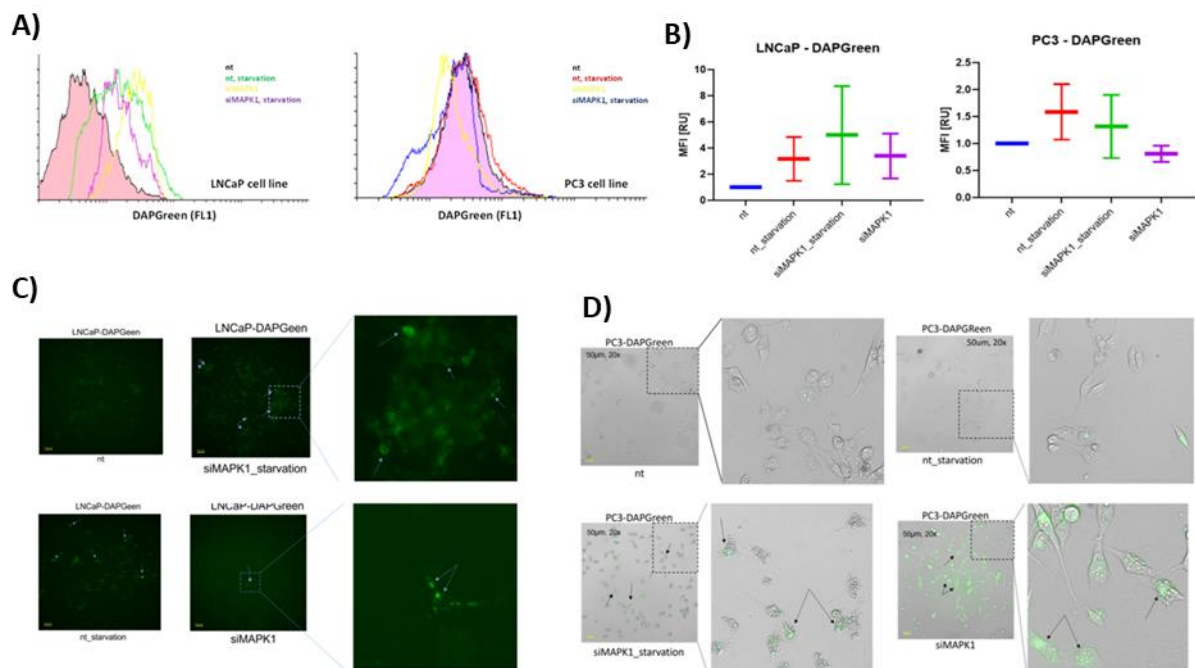
NF-κB ядрена транслокация, с последващо активиране на таргетни гени (Kramer HF et al., 2007). Установено е, че NF-κB се активира конститутивно при ПК, насърчавайки неговото започване и по-нататъшно прогресиране към резистентен на кастрация простатен карцином (Thomas-Jardin SE, et al., 2020), чрез повишаване на клетъчното оцеляване, туморната инвазия, метастази и резистентност към химиотерапия.

### **ЗАГЛУШАВАНЕТО НА MAPK1 В УСЛОВИЕ НА ГЛАДУВАНЕ ПРИ LNCaP ИНДУЦИРА НАЙ-СИЛНА МАКРОАВТОФАГИЯ, ДОКАТО ПРИ PC3 КЛЕТКИТЕ ГЛАДУВАНЕТО Е ОСНОВЕН ПЪТ НА АКТИВАЦИЯ**

Тъй като в карциномните клетки се наблюдава силно изразено потискане на апоптозата и ранно инхибиране на автофагията (Corcelle EA et al., 2009; Hippert MM et al., 2006; Das S. et al., 2021), беше направена хипотезата, че инхибираната експресия на микро РНК-141 при простатен карцином може да взаимодейства с JNK и MAPK1 пътища, модулирайки клетъчната смърт. При здрави епителни клетки, които са в среда богата на хранителни вещества и растежни фактори, mTORC1, който е стимулиран от АКТ/ПКВ и MAPK1/ERK2-MAPK3/ERK1 регулира автофагията като я потиска (Williams T. et al., 2009). Скорешни проучвания подчертават сложното взаимодействие между автофагията и апоптозата. Например, инхибирането на макроавтофагията чрез заглушаване на протеините свързани с автофагията (Atg5, Atg6/Becn1, Atg10 или Atg12) или използването на фармакологични средства, нарушаващи формирането на автофаголизозомите (например 3-метиладенин, хидроксихлорокин, бафиломицин А1 или монензин) е показано, че засилват клетъчната смърт, индуцирана от апоптоза, поради намалена стабилизация на митохондриалната мембрана или инхибиране на каспазите (Boya P. et al., 2005). Когато проследихме макроавтофагията в двете клетъчни линии, установихме, че заглушаване на MAPK1 в условия на гладуване най-силно повишава макроавтофагията при LNCaP клетъчната линия, докато при PC3 клетъчната линия гладуването е основен път на активация (*Фиг. 10*).

Като се има в предвид загубата на PTEN и високата експресия на MAPK1 в двете клетъчни линии (Qi W. et al., 2009; Chetram MA et al., 2011; Jamaspishvili T. et al., 2020; Gioeli D. et al., 1999), вероятно Becn1, ULK1 и VCIPL са необходими за функционирането на макроавтофагията, но PTEN-зависимият PINK1/Parkin2 път е по-слабо изразен. Съответно, микро РНК-141 мимик-индуцираната JNK/c-Jun потенциално

фосфорилира Beclin-1 и LC3. Това съответства с нашите наблюдения, че микро РНК-141 индуцира LC3 експресия в LNCaP, но не и в PC3 клетъчната линия. От друга страна, високата активност на MAPK1 потиска макроавтофагията и в двете клетъчни линии, и това зависи от условията на гладуване (вероятно свързано с mTOR). MAPK1 също така потиска митофагията в двете клетъчни линии. Докато този феномен варира в LNCaP, той беше стабилен при PC3 клетъчната линия. Това съответства на MAPK1-зависима индукция на LC3 в LNCaP клетки и MAPK1-зависимо потискане в PC3 костно-мозъчната метастатична клетъчна линия. Тъй като MAPK1 е съществена за митофагията при гладуване в нормалните епителни клетки, посредством алтернативния RAB8 път, ние заключихме, че при напреднал метастазирал простатен карцином, който е в стадии на хормонална резистентност, както е при PC3 клетъчната линия, митофагията не е зависима от MAPK1.



**Фиг. 10. Влияние на siMAPK1 върху макроавтофагията.** *A)* FCS хистограми на LNCaP и PC3 клетки в различни условия изведени чрез Flowing Software 2.5.1 (Turku Bioscience). *B)* Графично представяне на флоуцитометричен анализ (FCS), показващ влиянието на siMAPK1 върху макроавтофагията при LNCaP и PC3 клетки, в нормални условия и условия на гладуване. Експресията е представена чрез медианен флуоресцентен индекс (MFI), а получените стойности са нормализирани към единица (1) контрола. Ex. 488 nm/Em. 500-563nm; S.D., n=2. Флуоресцентна микроскопия (Etaluma). Качествена оценка на макроавтофагията в нормални условия, условия на гладуване, след трансфекция с микро РНК-141 и в комбинация от двата стимула при LNCaP *C)* и PC3 клетъчните линии *D)*; (20x).

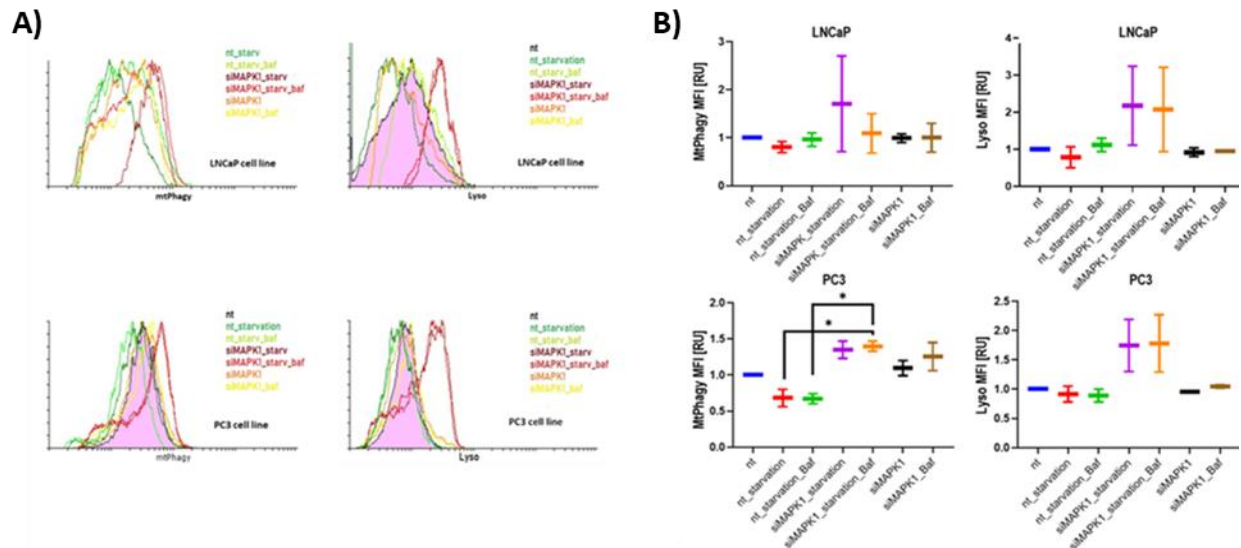
Начинът на действие на MAPK1 остава неизяснен, но има доказателства, че тя насърчава разграждането на ULK1 (Deng R. et al., 2021), което е съществено както за макроавтофагията, така и за специфичната митофагия.

## **ПОТИСКАНЕТО НА MAPK1 В УСЛОВИЯ НА ГЛАДУВАНЕ ПОВИШАВА МИТОФАГИЯТА ПРИ LNCAP И РС3 КЛЕТКИ**

Свързания с автофагията протеин Atg5 играе важна роля в този процес. Калпаин-медираното разцепване на Atg5 може да промени молекулярната сигнализация към автофагия или апоптоза (Rubinstein AD et al., 2011). Освен това, свързаните с митохондрии протеини могат да посредничат в това взаимодействие между пътища свързани с автофагията и апоптозата. Например Калпаин-разцепеният Atg5 взаимодейства с митохондриалния мембранно-свързан комплекс на Beclin-1 и анти-апоптоичния Bcl-2, определяйки преминаването към автофагия или апоптоза. Beclin-1 и ULK1 са директни субстрати на АКТ и играят основна роля във формирането на автофагозоми. Скорошни данни предполагат, че пресечната точка между клетъчната смърт свързана с автофагията и апоптозата може би наистина е в митохондриите (Noguchi M. et al., 2020), потенциално, чрез mTORC1 и Akt пътища (Noguchi M. et al., 2014; Matsuda-Lennikov M. et al., 2014). При проучвания с карцином на дебелото черво, активацията на JNK е изключително важна за повишаване на активността на Atg5 и Beclin-1, което води до медирана от автофагията клетъчна смърт. Освен това, зависимото от Atg5 формиране на автофагозоми и каспазо-независимата клетъчна смърт при фибробласти в отговор на онкогена H-ras, бе открито че зависи само от Rac1/MKK7/JNK/c-Jun, като пропуска ERK (MAPK1) или p38 MAPK пътища (Xie CM et al., 2011). Обратно на това бе открито, че MAPK/p38 е негативен регулатор на ATG5, като по този начин инхибира автофагията (Klionsky DJ et al., 2021). ULK1 не е важен само за инициирането на макроавтофагията, но също така стимулира и митофагията. Неговата роля е ключова в селективното разграждане на митохондриите чрез автофагия. ULK1 се придвижва към фрагментирани митохондрии, за да фосфорилира и стабилизира митохондриалните протеини BNIP3 и FUNDC1, насърчавайки тяхното свързване с LC3, което е съществено за инициирането на митофагията и отстраняването на увредени митохондрии (Wu W. et al., 2014; Poole LP et al., 2021). При хипоксични условия BNIP3 също се фосфорилира и стабилизира от JNK 1/2 (киназа c-Jun N-терминална 1/2), което допълнително допринася за свързването с LC3 (He YL et al.,

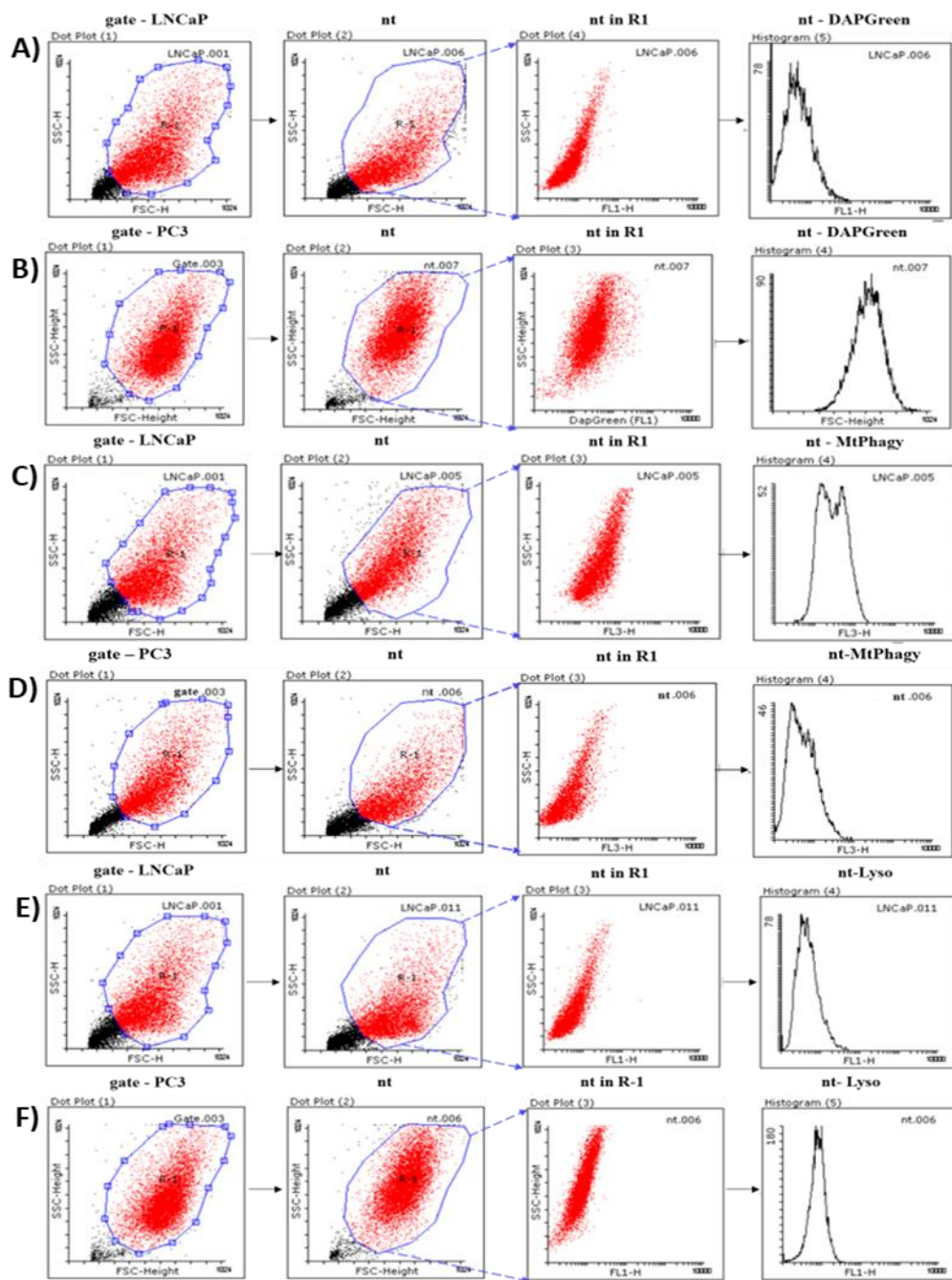


2022). Поради това възстановяването на микро РНК-141, което индуцира JNK сигнализацията може потенциално да активира ULK1 или директно да повиши митофагията чрез JNK-BNIP3-LC3 пътя. Обратно на това, активацията на MAPK1 (ERK2), може да потисне митофагията чрез фосфорилиране на ULK1, което води до неговата деградация, както се наблюдава при костна метастаза на карцином на гърдата. Това понижаване на митофагията увеличава метастатичния потенциал на карциномните клетки (Deng R. et al., 2021).

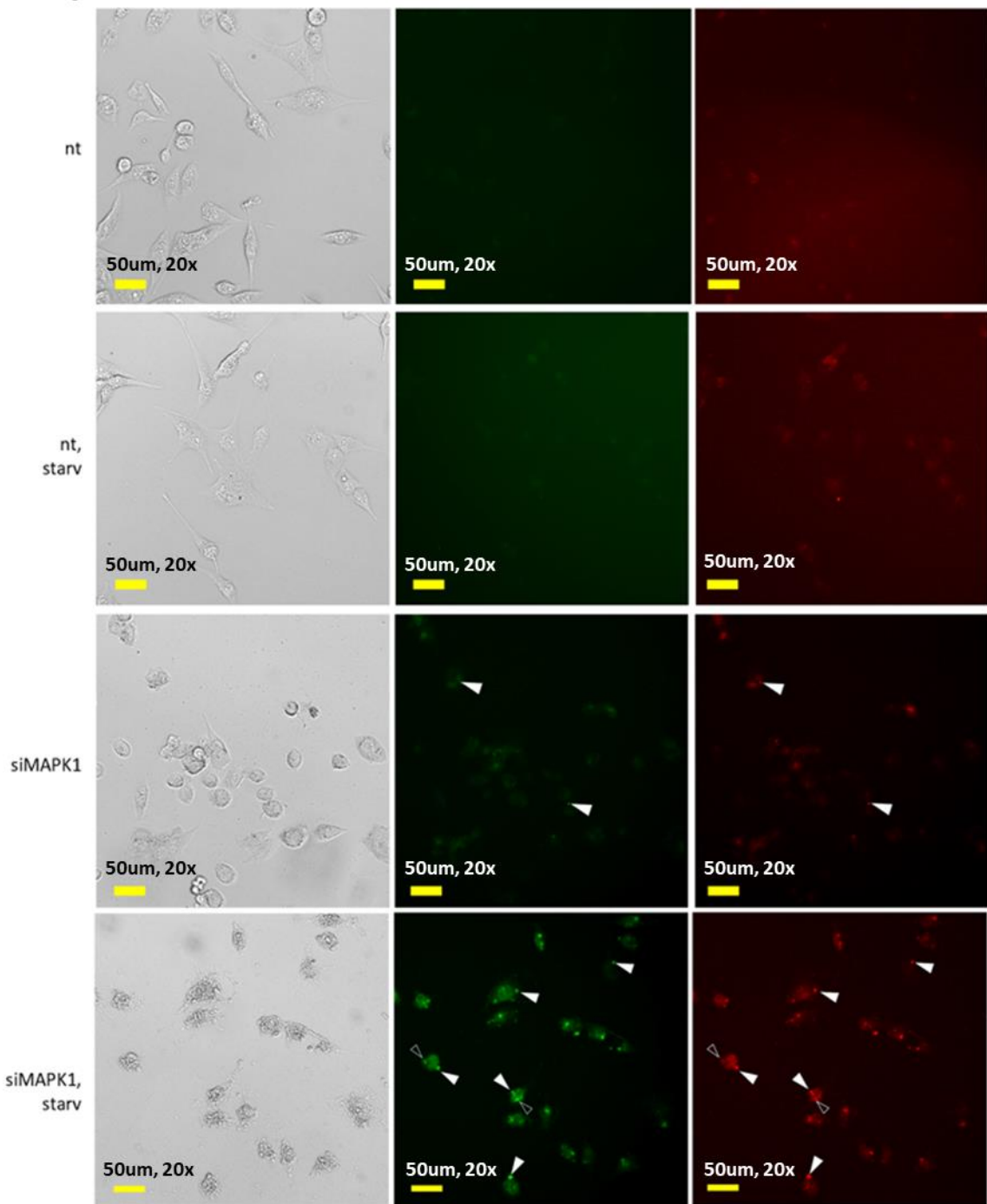


**Фиг. 11. Влияние на siMAPK1 върху митофагията.** **A)** FCS хистограми на LNCaP и PC3 клетки в различни условия изведени чрез Flowing Software 2.5.1 (Turku Bioscience). **B)** Графично представяне на флуоцитометричен анализ на LNCaP и PC3 клетъчни линии. Ефектът на siMAPK1 върху митоавтофагоцитарния флукс в нормални условия, условия на гладуване, след трансфекция с микро РНК-141 и след третиране с Bafilomycin A1. Експресията е представена чрез медианен флуоресцентен индекс (MFI), а получените стойности са нормализирани към единица (1) контрола. Ex. 530 nm/Em. 700 nm (MitPhagy) и Ex. 398 nm/Em. 525 nm (Lyso); \* $P < 0,05$ ; S.D.;  $n=2$ .

Когато проследихме митофагията при LNCaP клетъчната линия, установихме, че митоавтофагиалния флукс също беше най-силно повишен след блокиране на MAPK1 в комбинация с гладуване (Фиг. 11 B). При PC3 клетъчната линия Най- силна митофагия отчетохме при клетките, които са поставени в условия на гладуване и трансфектирани със siMAPK1 (Фиг. 11 B). Този феномен наблюдавахме и микроскопски, като вероятно комбинацията между двата стимула води до много силна автофагия и клетъчна смърт породена от нея (Фиг. 13).



**Фиг. 12.** Стратегия за фенотипен анализ на LNCaP и PC3 клетъчни линии на простатен карцином. Първоначално популацията от клетки бе определена спрямо флуцитометричните показатели за големина (forward scatter - FSC) и гранулираност (side scatter -SSC). Спрямо позитивните събития отчетени с DAPGreen (FL1-H) **A**); **B**), MtPhagy (FL3-H) **C**); **D**) и Lyso боите (FL1-H) **E**); **F**) бе изведена хистограма от която бе генериран median fluorescence index (MFI).



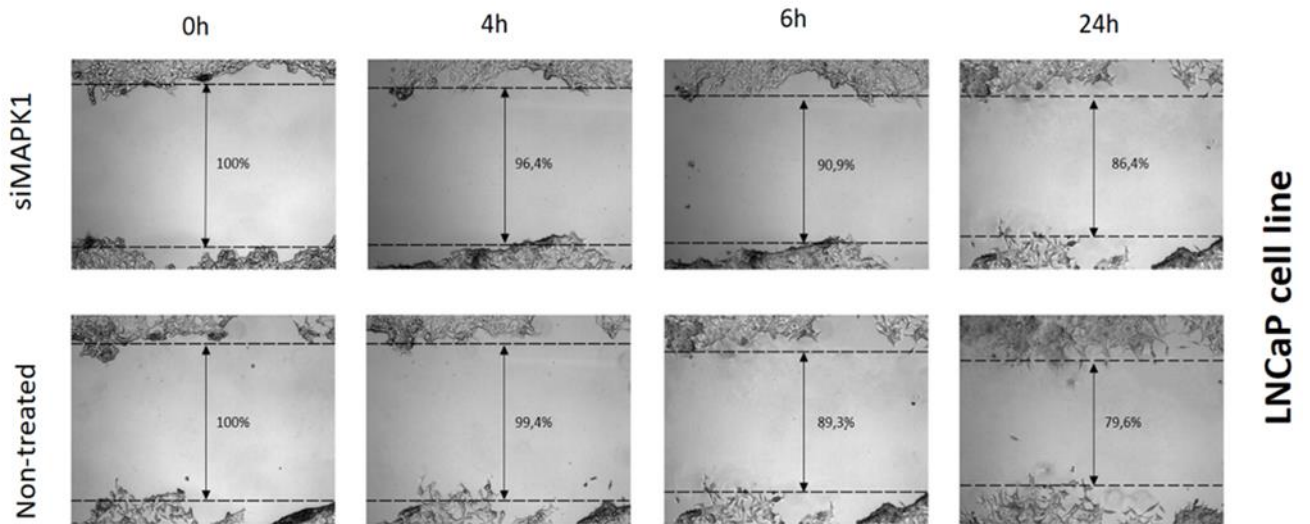
**Фиг. 13.** Флуоресцентна микрофотография (*Etaluma*). Локализиране на лизозоми (зелено) и увредени митохондрии (червено) при PC3 клетъчната линия в нормални условия, условия на гладуване, трансфекция със siMAPK1 и комбинация от двата стимула; (20x).

Въпреки, че реактивните кислородни форми на кислорода (ROS) предизвикват оксидативен стрес, който води до увреждане на клетките, той също така се свързва и с образуването на тумори, вероятно като вторичен посредник в различни каскади на сигнални пътища (Kumar B. et al., 2008). В литературата е описано, че продукцията на ROS е по-висока при клетки на простатен карцином, отколкото в нормалните епителни клетки. Това е по-силно изразено при клетки на простатен карцином, устойчиви на хормонална терапия, с костно-мозъчен метастатичен потенциал и нулева активност на p53 (PC3 клетъчна линия), в сравнение с по-малко злокачествените метастазиращи клетки на простатен карцином в лимфните възли (LNCaP клетъчна линия) (Kumar B. et al., 2008; Nayrabedyan S./T. et al., 2013). Митофагията играе ключова роля в регулацията на качеството на митохондриите и производството на ROS в карциномните клетки. Нарушената митофагия може да повиши увреждането на ДНК.

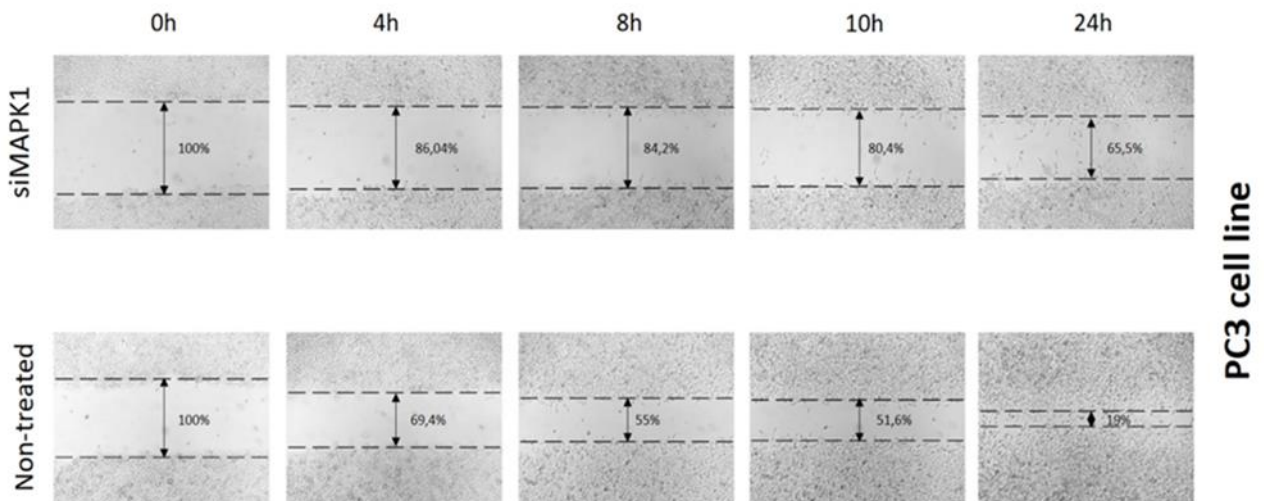
### **siMAPK1 ПОТИСКА КЛЕТЪЧНАТА МИГРАЦИЯ В LNCaP И PC3 КЛЕТЪЧНИТЕ ЛИНИИ**

MAPK1 често е свръхекспресирана при резистентен на хормонална терапия простатен карцином (Mukherjee R. et al., 2011). Активацията на MAPK1 е важна за андроген-рецепторната транскрипционна активация в AR-негативни клетки на ПК. В литературата е описано, че MAPK1 инхибирането води до понижена експресия на AR-таргетни гени, както и PSA и TMPRSS2, и сенсибилизация към андрогенна терапия (Cheung S. et al., 2021) в AR-негативни, но не и в AR-позитивни клетки (Mukherjee R. et al., 2011). По подобен начин, ние открихме, че заглушаването на MAPK1 повлиява най-вече AR-отрицателната резистентна на кастрация костна метастаза (PC3 клетъчна линия) (*Фиг. 15*), но не и AR-положителната LNCaP клетъчна линия (*Фиг. 14*), получена от лимфен възел. В настоящия дисертационен труд ние заглушихме MAPK1 (ERK2) за 48 часа, в *in vitro* условия, при AR-положителен лимфен модел на ПК (LNCaP, AR<sup>+/+</sup>, p53<sup>+/+</sup>) и при AR-отрицателен костно-мозъчен модел на ПК (PC3, AR<sup>-/-</sup>, p53<sup>-/-</sup>) и проследихме клетъчната инвазивност, с помощта на тест за клетъчна миграция, проведен в продължение на 24 часа. Нашето проучване установи, че заглушаването на MAPK1 намалява клетъчната миграция най-вече в AR-отрицателната PC3 клетъчна линия, с впечатляващите 46,5% (19% спрямо 65,5%), в сравнение със само 6,8% (79,6% спрямо 86,4%) намаляване на миграцията в AR-положителната LNCaP клетъчна линия. Тъй като една от нашите цели е да подпомогнем резистентната на кастрация

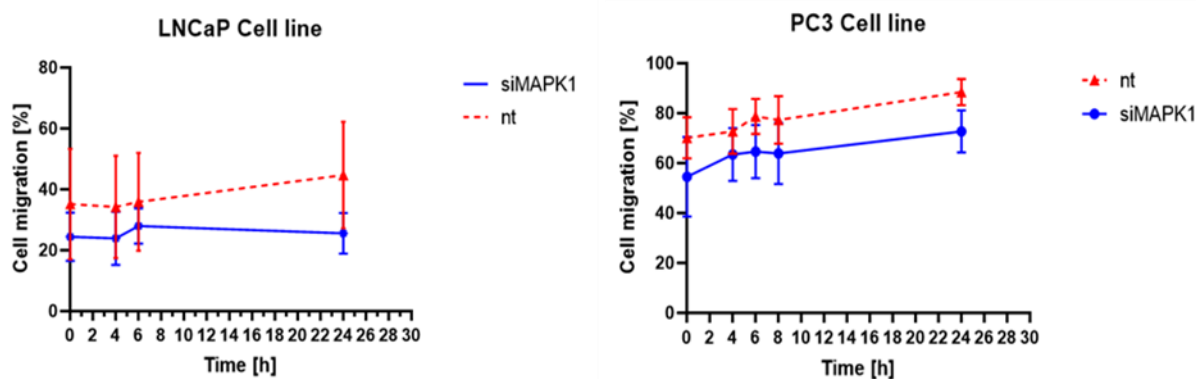
химиотерапия при метастазирал простатен карцином, заглушаването на MAPK1 изглежда е един добър подход в контекста на добавъчна терапевтична методика.



**Фиг. 14.** *Репрезентативни резултати от Scratch тест.* Разстоянието на клетъчната миграция измерена в проценти при LNCaP клетъчна линия, след генно заглушаване на MAPK1 за 0, 4, 6 и 24 часа. Снимките са направени на 20x увеличение.



**Фиг. 15.** *Репрезентативни резултати от Scratch тест.* Разстояние на клетъчната миграция, измерена в проценти при PC3 клетъчна линия, след генно заглушаване на MAPK1 за 0, 4, 8, 10 и 24 часа. Снимките са направени на 10x увеличение.



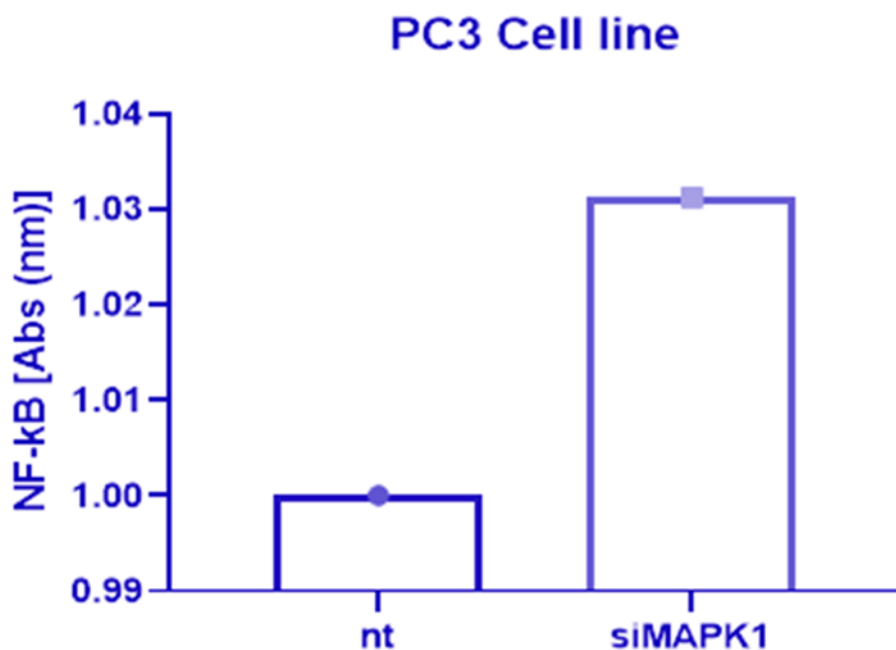
**Фиг. 16.** Графично представяне на клетъчната миграция при LNCaP и PC3 клетъчни линии на простатен карцином, след трансфектиране на клетките със siMAPK1. Резултатите от Scratch теста са представени в проценти [%] между съотношението от първичната Scratch линия и затварянето ѝ във времеви интервали. Разстоянието на Scratch линията е представена като средно  $\pm$  SD,  $n=3$ .

### **NF-kB СИГНАЛИЗАЦИЯТА НЕ ЗАВИСИ САМО ОТ MAPK1 ИНДУКЦИЯТА ПРИ PC3 КЛЕТКИ**

За съжаление, нашите функционални изследвания, направени посредством високочувствителен вектор (SEAP), показаха че заглушаването на MAPK1 за 48 часа в резистентната на хормонална терапия PC3 клетъчна линия ( $AR^{-/-}$ ,  $p53^{-/-}$ ) доведе до повишено NF-kB активиране (Фиг. 17). Предишни проучвания показват, че NF-kB сигнализацията може да се активира от MAPK кинази (Braicu C. et al., 2019), но нашите открития разкриват, че NF-kB активацията не зависи само от MAPK1 индукцията в този устойчив на хормонална терапия модел на простатен карцином. Конституитивната активност на NF-kB, която бе открита в AR-отрицателни, но не и в AR-положителни клетки на метастатичен карцином на простатата, беше съпътствана от няколко, постоянно експресирани, про-възпалителни сигнални пътища като IL-6/ERK1/ERK2, TNF- $\alpha$ /NIK, TNF/p38, IL-1/NIK или IL-1/p38 (Rodriguez-Berriguete G. et al., 2010). По този начин се насърчава непрекъснатото активиране на NF-kB в простатната карциногенеза. В комбинация с про-възпалителната сигнализация опосредствана от NF-kB експресията, бе установено, че автофагията има цитопротективна роля в резистентни към хормонална терапия PC3 клетки срещу два химиотерапевтика, целящи индуциране на апоптоза – целекоксиб и доцетаксел (Cristofani R. et al., 2018). Във втория случай протекцията на клетъчното оцеляване е свързано с повишена митофагия,

която на по-късен етап селективно се свързва с MAPK1/3 (Zhao Y. et al., 2013). Това предполага, че MAPK1 е „препрограмизирана“, за да поддържа NF- $\kappa$ B анти-апоптотични свойства при резистентен на кастрация костно-мозъчен модел на простатен карцином. Други проучвания с доцетаксел също подкрепят това твърдение, като показват цитопатичен ефект в LNCaP, но не и при PC3 клетки. Вероятно това се дължи на активирането на MAPK1 и води до терапевтична резистентност към анти-митотичния препарат (Cristofani R. et al., 2018).

Транскрипционния фактор NF- $\kappa$ B е един от ключовите медиатори на вродените имунни отговори и има важна роля във възпалително-асоциираната туморна прогресия (Abdul K. et al., 2018). Предишни проучвания показват, че проинфламаторната сигнализация, опосредствана от NF- $\kappa$ B допринася за по-висока малигненост на ПК. Възпалителните стимули са свързани не само с развитието на злокачествено заболяване, но и с резистентност към кастрационна терапия и повишена пролиферативна активност на карциномните клетки (Staal J. et al., 2018).

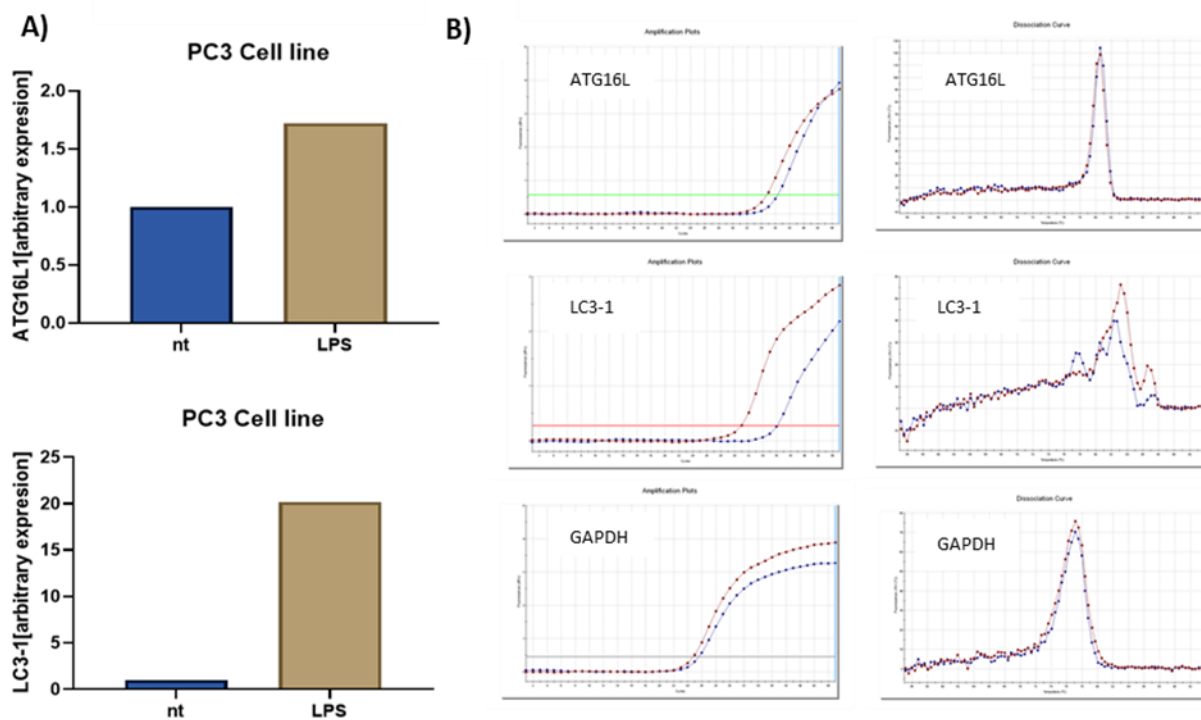


**Фиг. 17.** Нивата на активен NF- $\kappa$ B в PC3 клетъчна линия след заглушаване на MAPK1, измерени колориметрично чрез SEAP - репортерен плазмид секретирал алкална фосфатаза. Стойностите бяха нормализирани към единица (1) контрола. Отчитането бе направено на 40 мин. на  $\lambda_{\text{ем}} = 405 \text{ nm}$ .

## **LPS ПОВИШАВА ATG16L И LC3 ТРАНСКРИПТИТЕ ПРИ PC3 КЛЕТЪЧНАТА ЛИНИЯ**

В настоящия труд бе проследено и влиянието на възпалителния стрес върху транскрипционните фактори ATG16L и LC3 в AR-отрицателната клетъчна линия на простатен карцином. Едни от стимулите, които могат да потенцират активация на NF- $\kappa$ B през TLR4 (Toll- подобен рецептор 4) и да активират възпалително състояние са липополизахаридите (LPS) (Sakai J. et al., 2017). Възпалението е един от ключовите фактори, които потенцират туморната патогенеза. През последните години стана ясно, че сигнални пътища, които участват в отключената от възпаление карциногенеза могат да участват и в регулацията на автофагията чрез активирането или инхибирането ѝ (Monkkonen T. et al., 2018). Модулирането на вродената имунна сигнализация често е опосредствана от Toll- подобните рецептори с последваща активация на различни транскрипционни пътища като NF- $\kappa$ B, митоген-активирана протеин киназа (MAPK) и интерферон регулаторни фактори (IRFs), които участват в регулация на туморната прогресия чрез възпаление, пролиферация, ангиогенеза и метастазиране. NF- $\kappa$ B активираната каскада индуцира експресията на цитокини, в т.ч. тумор некротизиращ фактор алфа (TNF- $\alpha$ ), интерлевкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ) и IL-6, които могат да причинят туморогенно възпаление (Lee EJ et al., 2021; Hayat M.A. et al., 2017; Javid N. et al., 2020). От друга страна експресиранияте цитокини могат да повлияят сигнални пътища, в които участва MAPK1 и по този начин да се активира автофагия или пък да се потисне чрез mTOR, който е ключов инхибитор на автофагията. Отчитайки факта, че повече от 90% простатния карцином има склонност да метастазира в регионалните кости (Pasoglou V. et al., 2016), в настоящия дисертационен труд бе проследено влиянието на LPS върху ранен (ATG16L) и късен маркер (LC3-1) на автофагията, след 24-часово третиране на PC3 клетъчната линия, която използвахме за модел на костна метастаза. Транскрипционните нива на ATG16L и LC3-1 бяха повишени, спрямо нивата им в нетретирания контролна група, като нивата на LC3-1 бяха значително по-високи (**Фиг. 17**). Нашите резултати показват, че възпалителната стимулация опосредствана от липополизахариди, индуцира повишаване на автофагията, като това може да иницира туморна прогресия, чрез инхибиране на апоптотични пътища и да бъде причина за терапевтична резистентност при напреднал метастатичен стадий на простатен карцином.

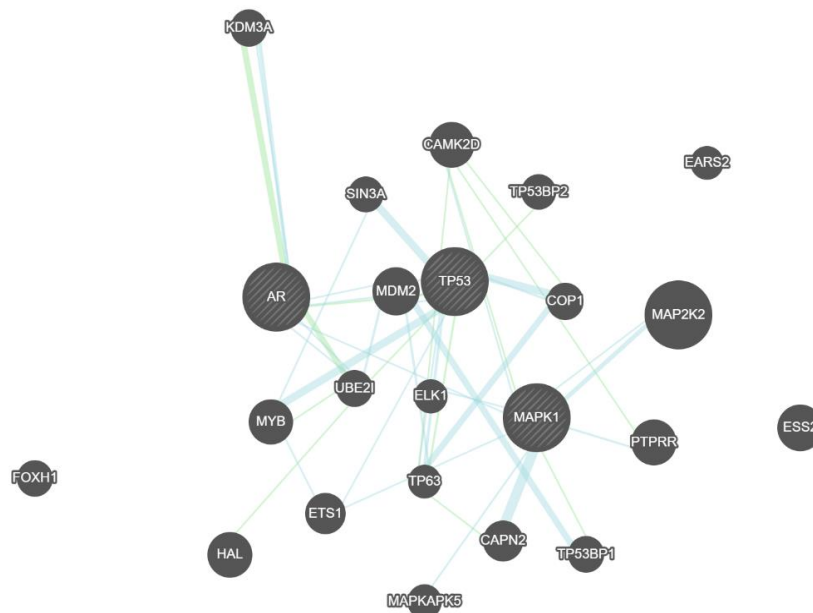




**Фиг. 18.** Графично А), амплификационно и дисоциационно В) представяне на относителната експресия на транскриптите на *ATG16L* и *LC3-1* в *LNCaP* и *PC3* клетъчна линия, след третиране на клетките с *LPS*, сравнени с контрола от нетретиранни клетки. Относителните нива на експресия бяха нормализирани по референтен ген *GAPDH* (Housekeeping gene). Флуоресценцията е представена като отрицателна първа производна на промяната на температурата ( $-Rn'(T)$ ).

## Заклучение:

В нашето проучване бе подчертана ключовата роля на микро РНК-141 в регулацията на митофагията при клетки на простатен карцином, в частност в контекста на p53 статуса. Сложното взаимодействие между микро РНК-141 и MAPK8/JNK и MAPK1 пътищата подчертава сложната регулация на автофагията в карциномните клетки. Различните отговори на LNCaP и PC3 метастатични клетъчни линии на простатен карцином, след изкуствено повишаване нивата на микро РНК-141, особено в условия на гладуване, подчертават ролята на MAPK1 в автофагията и митофагията. Нашите наблюдения предполагат, че възстановяването на микро РНК-141 експресията може да предостави обещаващ терапевтичен път при специфични генотипове на простатен карцином, особено тези които имат характеристиките на PC3 клетъчната линия. Освен това потенциалът на MAPK1 като терапевтична цел, изисква по-задълбочени проучвания, като се има в предвид инхибиторната ѝ роля в автофагията. Тъй като карциномните клетки непрекъснато развиват стратегии за избягване на клетъчна смърт, разбирането и таргетирането на молекулярните механизми, лежащи в основата на автофагията и митофагията може да отвори път към по-ефективни карциномни терапии.



**Диаграма 1. Генно-регулаторна мрежа получена с помощта на софтуера GENEMANIA. Генетичното взаимодействие (зелено) и сигнални пътища (синьо), в които участват гените експресиращи AR, TP53 и MAPK1.**

## V. ИЗВОДИ

1. В РС3 клетъчната линия микро РНК-141 води до обогатяване на TAK1-NF-kB и TAK1-p38MAPK сигнални пътища, свързани с автофагията, както и NLR вродени имунни пътища. От друга страна инхибирането на микро РНК-141 води до обогатяване на повече неимунни сигнални пътища.
2. Микро РНК-141 има положителна регулаторна роля върху LC3 маркера за автофагия при LNCaP и РС3 клетъчните линии.
3. MAPK1 участва в положителната регулация на ATG16L и LC3 при клетъчния модел на лимфна метастаза, докато в костно-мозъчния модел на простатен карцином MAPK1 потиска маркерите за автофагия на транскрипционно и протеиново ниво.
4. Третирането с LPS значително завишава относителната експресия на транскриптите ATG16L и LC3 в РС3 клетъчната линия. Вероятно възникнали бактериални инфекции, при напреднала простатна карциногенеза, може да доведат до завишена макроавтофагия и това да бъде потенциална причина за терапевтична резистентност.
5. Микро РНК-141 повишава макроавтофагията при LNCaP клетъчната линия, докато при РС3 клетките това се наблюдава при комбинация на микро РНК-141 с гладуване. Микро РНК-141 потенцира митофагията при LNCaP клетъчната линия, докато при РС3 клетките тя по-скоро има лимитирани възможности.
6. При LNCaP клетъчната линия макроавтофагията е основен път при гладуване, а MAPK1 има по-скоро потенциращ митофагията ефект. РС3 костното метастазиране вероятно е подпомогнато от потиснатата митофагия, с участието на MAPK1.
7. Заглушаването на MAPK1 ген, води до повишена проинфламаторна сигнализация в РС3 клетъчната линия.
8. Микро РНК-141 потиска глобалното ДНК метилиране в LNCaP клетъчната линия.
9. Миграцията на двете клетъчни линии се повлия след заглушаване със siMAPK1, като това е по-ясно изразено в модела на костна метастаза.

## **VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

1. Доказана е ключовата роля на микро РНК-141 в регулацията на митофагията и макроавтофагията. Микро РНК-141 може да предостави обещаваща терапевтична стратегия при специфични генотипове на простатен карцином, особено на такива с подобни характеристики на РС3 клетъчната линия.
2. Селективното инхибиране на MAPK1 в комбинация с възстановяването на нивата на микро РНК-141 може да се използва потенциално като добавъчно лечение към химиотерапия, като персонализиран подход към устойчив на кастрационна терапия карцином на простатата.

## VII. СПИСЪК С НАУЧНИТЕ СТАТИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Radostina Tsvetankova**, Ilka Tsvetkova, Albena Apostolova, Soren Hayrabedian, Krassimira Todorova, „Combined microRNA-141 rescue and MAPK1 silencing as putative strategy to support chemotherapy in translational stage towards metastatic castration-resistant prostate cancer - an in vitro model study“, "Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences«, DOI: <https://doi.org/10.7546/CRABS.2023.08.15> , Q3 – 15т.
2. **Radostina Tsvetankova**, Ilka Tsvetkova, Soren Hayrabedian, Krassimira Todorova, „Restoring Mitophagy in Prostate Cancer Cells: The Role of miR-141 Rescue in Counteracting MAPK1/ERK2-Dependent Autophagy Suppression“, Biotechnology Biotechnological Equipment, Q3 – 15т.

## VIII. СПИСЪК С УЧАСТИЯ НА НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Доклад пред научно мероприятие в страната- **Радостина Цветанкова**, Илка Цветкова, Сорен Хайрабедян, Красимира Тодорова, “Изследване клетъчната сигнализация на транскрипционния фактор МАПК1 в модулирането на автофагията и проинфламаторните сигнали в процеса на търсене на нови биомаркери на простатната канцерогенеза” – 29-31 август 2019г., „Втори интердисциплинарен докторантски форум посветен на 150 годишнина на БАН“, Боровец, България.
2. Доклад пред научно мероприятие в чужбина – А. Apostolova, Vladimir Stoev, **Radostina Tsvetankova**, Ilka Tsvetkova, Soren Hayrabedian, Krassimira Todorova, “Has- miR-141 rescue induces transcriptome and protein changes autophagy induction, innate immunity pathways modulation and suppresses pro-oncogenic transcriptional factors”- 23.04.2019, „3rd Annual Meeting COST Action TRANSAutophagy“, Sofia, Bulgaria.
3. Доклад пред научно мероприятие в чужбина – Soren Hayrabedian, Ilka Tsvetkova, **Radostina Tsvetankova**, Albena Pamukova, Gabriel Elmadjian, Krassimira Todorova, “Direct RNA sequencing of poly(A)<sup>+</sup> and poly(A)-enriched transcriptome provides opportunity for studying the changes in mRNA / lncRNA landscape and epi-

transcriptomic modifications promoting cancer stemness and metastatic phenotype” - 2nd and 3rd December 2020г., “Nanopore Community Meeting 2020 online conference hosted by Oxford Nanopore on the 1st “, London, United Kingdom.

4. Доклад пред научно мероприятие в чужбина – **Radostina Tsvetankova**, Илка Tsvetkova, Vladimir Stoev, Soren Hayrabedian, Krassimira Todorova, “Hsa-miR-141 downregulation in prostate cancer provides survival benefit via innate immune cell signaling and mitophagy modulation” , 1-4 September 2021, 6th European Congress of Immunology (ECI 2021)“, Virtual Meeting.
5. Доклад пред научно мероприятие в чужбина - Vladimir Kostov Stoev, Илка Tsvetanova Tsvetkova, **Radostina Petkova Tsvetankova**, Soren Bohos Hayrabedian, Krassimira Olegova Todorova, “Stemness acquisition in prostate cancer confers immune surveillance evasion through lncRNA SNHG16 and lncRNA CRNDE mediated alternative checkpoint B7-H3 (CD276) upregulation”, 1-4 September 2021, 6th European Congress of Immunology (ECI 2021), Virtual Meeting.

## ДОПЪЛНИТЕЛНИ УЧАСТИЯ, ПУБЛИКАЦИИ И ПРОЕКТИ ПО ВРЕМЕ НА ДОКТОРАНТУРАТА

### I. Доклад пред научно мероприятие в страната

1. **Участие в постерна сесия на тема** „Изследване клетъчната сигнализация на транскрипционния фактор MAPK1 в модулирането на автофагията и проследяване влиянието на микро РНК-141 в процеса на търсене на нови биомаркери в простатната канцерогенеза“. **Радостина Цветанкова, Сорен Хайрабедян, Красимира Тодорова**, 2019- БАН

### II. Публикации в издания, които са реферирани и индексирани в световноизвестни база данни с научна информация

1. **Илка Tsvetkova, Radostina Tsvetankova, Krassimira Todorova, Soren Hayrabyedyan** “The Effect of CD300A Receptor on Caspase-1 Activity in the Context of Cell Death and on Its Activators Nlrp3 and Asc in Sertoli Cells”, Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences, 75(12), 1830–1839, Dec. 2022

### III. Мероприятия в чужбина

1. **“Училище по Имунология SIICA”**, Фундаментален курс. 2018г. - Месина, Италия

### IV. Участия в проекти

1. **Тип на конкурса и година:** Национална пътна карта за научна инфраструктура, 2022г.; **Номер или акроним на проекта:** НИКТЪДО1-178; **Тема:** *„Национална пътна карта за научна инфраструктура“*; **Координатор по проекта за партньорска организация** ИБИР-БАН – проф. д-р Сорен Хайрабедян, дбн; **Статус на проекта:** текущ
2. **Тип на конкурса и година:** COST акция 15138, 2019г.; **Номер или акроним на проекта:** КП-06-КОСТ/24; **Тема:** *„Предоставяне на национално съфинансиране за участие на български колективи в утвърдени акции по Европейската програма за сътрудничество в областта на научните изследвания и технологиите COST“*; **Ръководител на проекта:** проф. д-р Сорен Хайрабедян, дбн; **Статус на проекта:** приключил

3. **Тип на конкурса и година:** Финансиране на фундаментални научни изследвания по обществени предизвикателства, свързани с пандемията от Covid-19 – 2020г., 2020г.; **Номер или акроним на проекта:** КП-06-ДК1-12; **Тема:** *„Изследване на прекомерната реакция на тъканите, опосредствана от инфламазомите, водеща до клинично тежка SARS-CoV-2 инфекция. Транслационен подход“*. **Ръководител на проекта:** проф. д-р Сорен Хайрабемян, дбн; **Статус на проекта:** текущ
4. **Тип на конкурса и година:** Фундаментални научни изследвания, Декември 2019; **Номер или акроним на проекта:** КП-06-Н-33/4; **Тема:** *„Системно биологично идентифициране на сигнални пътища, подпомагащи избягването на имунния надзор в карциномни клетки със стволови характеристики“*. **Ръководител на проекта:** проф. Красимира Тодорова - Хайрабемян, дбн; **Статус на проекта:** текущ



## **БЛАГОДАРНОСТИ**

*Настоящия дисертационен труд бе изработен изцяло в лабораторията по „Репродуктивни ОМИКс технологии“ към Институт по биология и имунология на размножаването „акад. Кирил Братанов“, Българска Академия на Науките, София (ИБИР-БАН).*

*В следващите няколко реда бих искала да изкажа искрената си благодарност към научните си ръководители – проф. Красимира Тодорова-Хайрабемян, дбн и проф. д-р Сорен Хайрабемян, дбн, които в истинския смисъл на думата бяха мои учители през последните 5 години. Сърдечно благодаря за професионализма, ясните и целенасочени напътствия и съвети, за търпението, за подкрепата през целия период на изработване на дисертационния труд и за опита, който придобих под тяхно ръководство!*

*Благодарности се поднасят и на членовете от състава на Научния съвет за обективните и ценни съвети, в резултат на които научно-изследователския труд придоби завършен вид!*

*Бих желала да изкажа специалната си благодарност към ас. Илка Цветкова и към останалите колеги от екипа на лабораторията, за колегиалността, помощта и ценните съвети, които получих по време на изработване на научния труд!*

*И не на последно място, сърдечни благодарности поднасям на семейството и близките си за разбирането, вярата и подкрепата, които проявиха към мен през този период!*