

РЕЦЕНЗИЯ

от чл.-кор. Нина Атанасова, дбн, ИЕМПАМ-БАН

относно: дисертационен труд на Елина Димитрова Аврамска от ИБИР-БАН

на тема „Влияние на метилационния статус върху гени, свързани с репродуктивния потенциал и рецепторите на вроден имунитет“

за получаване на образователна и научна степен „Доктор“

Област 6 на висшето образование Аграрни науки и ветеринарна медицина,

Професионално направление 6.3 Животновъдство, научна специалност: “Развъждане на селскостопански животни, биология и биотехника на размножаването” (04.02.01)

Дисертационният труд на Елина Аврамска е адресиран към проблем от фундаментално значение за репродуктивната биология и медицина, отличаващ се не само с висока актуалност, но и с иновативна перспектива. Въпросите, свързани с имунологично обусловения инфертилитет при мъжа стават все по-тревожни предвид, че над 15 % от случаите на мъжко безплодие са по тази причина. Същевременно се увеличава процентът на мъжкия фактор в бездетните двойки, като той се изравнява с този, при който причините са в жената. Една от причините за стерилитет е изработване на антитела срещу собствени антигени от репродуктивната система, в т.ч и срещу сперматозоиди. Механизмите на автоимунния инфертилитет са неизяснени, а в основата на имунологичната привилигерованост на тестиса са Сертолиевите клетки чрез изградената от тях кръвно-тескитуларна бариера и способността им да функционират като „непрофесионални“ имунни клетки. Компетентността на тези клетки да експресират рецептори на вродената имунна сигнализация в отговор на неинфекциозни агенти, поставя редица въпроси, предвид че Сертолиевите клетки фагоцитират дегенериращи полови клетки и остатъчни телца, процеси които нормално съпътстват образуването на сперматозоидите от тестисите. Съвременното разбиране за значението на епигенетичната регулация на генната експресия, в контекста на вродения имунен отговор е предизвикателството към което се е насочила Елина Аврамска при разработване на дисертационния си труд. Той е задълбочено изследване, което се простира в широк обхват, благодарение на богатата гама от молекулярно биологични и биоинформатични подходи, на основата на които могат да се градят хипотези за епигенетичната регулация на вродената имунна сигнализация в Сертолиевите клетки.

Дисертационният труд е написан на общо 162 страници и е структуриран по общоприетия начин с разпределение на отделните раздели, както следва: Въведение – 4 стр.; Литературен обзор - 34 стр.; Цел и задачи – 2 стр.; Материали и методи – 19 стр.;

Собствени резултати – 48 стр.; Дискусия – 18 стр.; Изводи – 1 стр.; Приноси – 1 стр.; Литература от 263 източника – 27 стр. Основните раздели са в балансирано съотношение, като логично най-обемист от тях е този за собствените резултати (една трета от целия труд).

Литературният обзор е целенасочено развит с оглед темата на труда и се отличава с ясен и стегнат стил. Структуриран е в три глави, които са насочени към разработваната тема: (i) роля на Сертолиевите клетки по отношение на тестикуларния автоимунитет; (ii) рецептори на вродения имунен отговор (семейството на Toll-подобните рецептори, улавящи външни патогени и на NOD рецепторите, сензори на ендогенна тъканна и клетъчна увреда-DAMP); активация на инфламазомата NALP3; (iii) епигенетична регулация на генната експресия. Логично, последната глава е най-обширно развита, представяйки принципите на ДНК метилиране; роля на окисления метилцитозин и неговия метаболизъм в динамични/преходни епигенетични маркери и като механизъм на ДНК деметилиране; метилиране на хистонови белтъци като активни и репресивни маркери; РНК-базирани механизми на епигенетична регулация (роля на малки некодиращи РНКи – микроРНКи, къси интерфериращи РНКи и дълги некодиращи РНКи). Предоставена е много богата информация в критично-аналитичен стил, очертавайки неизяснените въпроси.

Половината от цитираните литературни източници са от последните 10 години, което недвусмислено показва актуалността на разработвания проблем. В края на прегледа би могло да се изведе кратко обобщение на неизяснените въпроси, които се поставят в хода на изложението и насочват към логично мотивирана цел, формулирана кратко и ясно. Поставени са **7 задачи**, които убеждават за успешното изпълнение на целта. Създава се впечатление за съвременното ниво на разработката за изясняване на механизмите на клетъчната сигнализация в основата на вродения имунен отговор – оста TLR4 – MAPK1 – през NF- κ B и през инфлазомния комплекс NALP3/каспаза-1, както и влиянието на оста върху клетъчната пролиферация и жизненост/активност, участие в индуциране на клетъчна смърт. Тези приоритети са в контекста на епигенетичната регулация, като подходът за нейното изучаване преминава през целия труд посредством прилагане на глобално деметилиране или генно заглушаване. Трябва да се отбележи, че изследователските интереси се основават на мащабен биоинформатичен анализ, въз основа на който са представени обогатени пътища на MAPK/ERKs сигналната ос, йонни канали, автофагия, редица проинфламаторни цитокини, активност на инфлазомата и тяхната свързаност с TLR4.

Разделът „**Материали и методи**“ представя подробна информация за използваните материали (реагенти/агенти, китове, клетъчни линии) и прилаганите методи – клетъчно култивиране за осъществяване на модерни техники на генно заглушаване (чрез малки интерфериращи РНКи) и трансфекция на репортерен ген, протоколи за количествено

определяне на йонен поток, мембранен интегритет и клетъчна смърт; RT-qPCR, проточна флуоцитометрия, двуменсионална гелелектрофореза с денситометричен анализ, биоинформатика и статистика. Очевидно е, че са използвани високо качествени материали и подходящи методики, което гарантира добросъвестно изпълнение с получаване на надеждни резултати.

Разделът „Резултати“ е структуриран в девет глави, разпределени така, че всеки раздел да изпълни всяка една от задачите.

Приоритетите в изследванията на дисертантката се основават на високо-технологичен биоинформатичен анализ (глава 1) на потенциални протени, свързващи пътищата на вродената имунна сигнализация и епигенетичните модификации в Сертолиевите клетки. За целта протеомния анализ е извършен върху изображения от двуменсионална гел електрофореза (разделяне по молекулно тегло и изоелектрична точка) на лизати от комерсиална клетъчна линия 15P-1 миши Сертолиеве клетки от зрял тип, третирани с лиганд на TLR4 (LPS) или агент за тотално деметилиране (5-Aza-2'-deoxycytidine). Биоинформатичната обработка на изображенията е богато илюстрирана (22 фигури и 3 таблици), въз основа на която са предсказани протеинови съответствия и са идентифицирани потенциалните протеини представляващи интерес. Това е постигнато чрез извличане и филтриране на данни от бази данни Proteome-pl 2.0, използваща IPC2_protein алгоритъм, основаващ се на „машинно обучение“ за определяне на рКа, след което се извършва идентифициране на статистически обогатени потенциални протеини и сигнални пътища (приложение на онлайн инструмента Enrichr). Въз основа на биоинформатичния анализ са получени данни от фундаментално значение за възможността LPS-индуцираните сигнални пътища да отразяват специфични за клетъчния тип епигенетични профили. Промените в сигналните пътища показват силна зависимост от епигенетична регулация (просредством ДНК метилиране) на MAPK киназния път, йонните канали, промени в P13K-свързаната автофагия, сигнализация с дефектна пироптоза (т.е. нарушения в сигнализацията на инфламазомата).

Въз основа на данните от биоинформатичния анализ, авторката основателно се фокусира върху изследвания на влиянието на ДНК метилирането върху експресията и активността на ключови молекули/фактори от сигналните оси на вродения имунен отговор. В експериментални условия (глава 2) на глобално деметилиране с 5-Aza-2'-deoxycytidine тя установява подтисната експресия на NOD2 и NALP3 и индукция на NOD1.

Логично, дисертантката се насочва към комплексно проследяване на промените в MAPK1 сигналния механизъм и инфламазомата NALP3, посредством отчитане активността на NF- κ B, каспаза-1, нивата на интерлевкин 1 β , (IL-1 β) и свързаните с тях промени в йонния поток за калий (Kv1.3-канални), в клетъчната миграция/пролиферация, клетъчна смърт и автофагия. За целта тя прилага широк набор от третирания на

Сертолиево-клетъчната линия с лиганди/агонисти на TLR4 (LPS) и NOD1 рецептора (iE-DAP) в условия на генно заглушаване (на MAPK1) или активиране на инфламазомата с АТР (стресов фактор). Последният е ендегенен продукт на клетъчна увреда (DAMP) и прибавен към клетъчната култура е външен сигнал за увреждане и допълнително активиране на NALP3.

Получени са голям обем от данни, много добре илюстрирани с микрофотографии и графики – общо 17 на брой. Накратко, резултатите на авторката и тяхният приносен характер могат да се обобщят в 4 основни направления, както следва:

1. Заглушаване на MAPK1 (чрез къса интерферираща РНКa – siMARK1) в Сертолиевите клетки води до повишена активност на NF- κ B (определена чрез репортерен вектор експресиращ секреторна алкална фосфатаза) и каспаза-1, заедно с увеличена пролиферация/миграция на СКи. В интактни условия (контрола), както и при индукция на TLR4 чрез LPS (без заглушаване на MAPK1) активността на NF- κ B и каспаза 1 са по-слаби/ограничени, заедно с понижена пролиферация/миграция на СКи. Авторката обяснява тези находки с възможността, заглушаването на MAPK1 да води до превключване към по-висока експресия на p38MAPK, т.к се знае, че p38MAPK пътят е съществен за активиране на NF- κ B след индукция с LPS.

Следователно, NF- κ B е ключов активиращ фактор на възпалителния процес в Сертолиевите клетки, подготвяйки инфламазомата за активиране, като същевременно насърчава клетъчната пролиферация и оцеляването на клетката.

2. Индуциране на TLR4 и NOD рецепторите (с LPS и iE-DAP, съответно) в Сертолиево-клетъчните култури и допълнително активиране на инфламазомата NALP3 с АТР води до активиране на каспаза 1 и продукция на IL-1 β . При тези условия се установява усилен поток на калиеви йони чрез активиране на волтаж-зависимите калиеви канали Kv1.3. Паралелно с това се отчита повишена клетъчна смърт (апоптоза). Изследване на мембранныя интегритет при настъпване на клетъчна смърт показва повишена макроавтофагия, като не са наблюдавани признаци за пироптоза (изтичане на клетъчно съдържимо).

Авторката установява подтисната микроавтофагия (автофагоцитоза на митохондрии – митофагия), което е различно от находката при макрофаги, където NF- κ B (при индукция с LPS) повишава митофагията с оглед да предотврати прекомерното възпаление и клетъчна смърт. Тя изказва предположението, че NF- κ B контролира както пътищата за индуциране, така и за потискане на възпалението, митофагията и клетъчната смърт, в зависимост от типа на клетката.

Дисертантката дава и алтернативно предположение за активиране на инфламазомата при тези условия посредством установеното от нея повишена активност на дехидрогеназите – феномен описан при карцином на млечна жлеза за улесняване на метастазирането.

3. Повишеният поток на K^+ след активиране на MAPK1 в SKi чрез индуциране на TLR4 (с LPS) са в унисон с данните, че Kv1.3 калиевите канали се регулират от MAPK1 сигнализацията, която ги активира чрез фосфорилиране.
4. В резултат на комплексното разглеждане на своите резултати, дисертантката предлага обобщен модел в Сертолиевите клетки за взаимодействия на MAPK1/TLR4/NF-kB/, йонните потоци, инфламазомна активация/каспаза 1/IL-1 β и автофагия. Тук бих препоръчала да се даде кратко обяснение на схематично представения модел.

Дискусията е стегната, като собствените резултати са широко интерпретирани с богатата информация за клетъчната сигнализация на вродения имунитет с многопосочните пътища и комплексни събития. Изведени са 7 извода, които дават отговор на поставените задачи. Формулирани са три оригинални приноса, сполучливо обобщение на постиженията, изказани в изводите.

(i) Те трасират пътищата на TLR4 сигнализацията в Сертолиевите клетки в контекста на епигенетичната регулация на ключовите оси на вродения имунен отговор като MAPK1 сигнализацията и активацията на инфламазомата NALP3.

(ii) Установен е повишен поток на калиеви йони (активиране на каналите Kv1.3) при индуциране на двата рецептора (TLR4 и NOD1), кореспондиращ с увеличена експресия на ефекторите (каспаза 1 и IL-1 β) и клетъчна смърт (апоптоза).

(iii) Самостоятелната индукция на TLR4 води до понижена клетъчна пролиферация и миграция при потисната активност на NF-kB и ограничено действие на каспаза-1. При допълнително активиране на инфламазомата (с ATP), индукцията на TLR4 активира каспаза-1 и повишава клетъчната смърт. Това е в унисон с виждането, че NF-kB е ключов активиращ фактор на възпалителния процес, от който заедно с други фактори (поток на калиеви йони) зависи съдбата на клетката (пролиферация или възпаление/смърт).

Във връзка с дисертацията са публикувани 2 статии в български списания. Има още една публикация в съавторство, отпечатана в списание с Q3. Представени са девет участия в научни форуми – 6 от които са на международни форуми. Дисертантката е ръководител на един проект, финасиран по програма за млади учен на БАН/2016 г. Тя е изпълнила образователната и научната програма на Центъра за обучение към БАН – получила е 466 кредита при изискуем минимум от 250 т. (според изискванията за докторанти зачислени преди 01.01.2019 година)

В заключение, обемът и качеството на проведеното комплексно и широко-обхватно изследване определят дисертационния труд на Елина Аврамска, като завършена и прецизно осъществена научна разработка с ясно изразено фундаментално значение и оригиналност. Биоинформатичната платформа въз основа на която е развита експерименталната разработка със съвременни молекулярно-биологични методи, характеризират труда като интердисциплинарен и високо-технологичен. Прави впечатление високото научно ниво и професионализъм на изпълнение на дисертационния труд и от изискания научен стил при неговото написване и оформяне. Въз основа на получените данни Елина Аврамска представя съвременно виждане за факторите и събитията, които са маркерни за епигенетичната регулация на вродената имунна сигнализация на Сертолиевите клетки. Предоставените нови знания несъмнено са принос за разбиране на механизмите на имунологично-обусловеният инфертилитет при мъжа. Обемът и качеството на труда и успешното изпълнение на образователната и научна програма напълно покриват критериите на ЗРАС на РБ и съответните правилници за неговото приложение. С придобитите знания и умения Аврамска е изграден учен, способен за самостоятелна научно-изследователска работа. Във връзка с горе-изложеното, с висока убеденост давам положителна оценка на дисертационния труд на тема „Влияние на метилационния статус върху гени, свързани с репродуктивния потенциал и рецепторите на вроден имунитет” и препоръчвам на членовете на почитаемото Научно жури да гласуват „ЗА” присъждане на образователната и научна степен „Доктор” на Елина Аврамска.

26.01.2024 г.

Рецензент:

/чл.-кор. проф. Нина Атанасова, дбн/