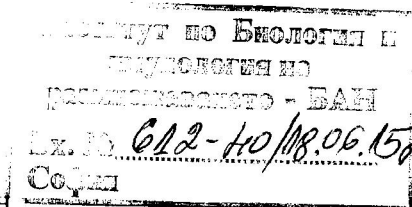


## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Мария Иванова, дн  
ИБИР, БАН



**Относно:** Дисертационен труд по процедура за присъждане на научна степен „доктор на науките“, заповед № 163 от 13.05.2015 г., представен от доц. Красимира Тодорова, за нуждите на лаборатория по „Репродуктивни омикс технологии“ - ИБИР, БАН.

Тема на проекта за дисертация е: “Генно-регулаторна мрежа между микроРНК-204, онкофузионният протеин TMPRSS2-ERG и транскрипционни фактори със значение за метастазирането в простатната канцерогенеза”.

Областта на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика; Професионално направление 4.3. Биологически науки; Научна специалност “Имунология” Шифър на специалността 01.06.23

### 1. ОПИСАНИЕ НА ПРЕДСТАВЕНИТЕ МАТЕРИАЛИ

За участие в настоящия конкурс доц. Красимира Тодорова е представила комплект от документи, съгласно изискванията на ЗРАСРБ и правилника на „Института по биология и имунология на размножаването „Акад. К. Братанов“ при БАН.

Доц. Красимира Тодорова участва в конкурса с общо с 14 научни труда, от които 8 са с IF (IF - 11.476). От научните трудове един е глава от книга, отпечатана от високо реномирано научно издателство. Цялостната публикационна дейност обхваща 42 научни труда и 30 участия в конгреси, с общ IF 62.763. Представените публикации са публикувани в предимно в международни, български списания и в чуждестранни издания. От представените научни публикации по конкурса няма самостоятелни, в 8 публикации тя е първи автор, в 4 – втори автор, в останалите е на последващи места. Преобладават публикации, отпечатани предимно на английски език.

От общо 30 участия с доклади, постери и участия в конгреси и симпозиуми, за конкурса има представени 11 научни материали с IF 12.033, с което общия IF по конкурса става 23.509. Като цяло доц. Красимира Тодорова има 65 цитирания, предимно в чужди издания, без автоцитирания.

В списъка на научните трудове по конкурса не са включени такива, с които доцент Красимира Тодорова е получила званието „доктор“ и академичната степен „доцент“.

### 2. ДАННИ ЗА КАРИЕРНОТО И ТЕМАТИЧНОТО РАЗВИТИЕ НА КАНДИДАТА

Доцент Красимира Тодорова по специалност е биолог, с „Магистратура по Клетъчна биология и Биология на развитието“. От 2001 г. работи като биолог – специалист в Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. К. Братанов“, Българска Академия на Науките. Нейните научни интереси са в областта на

имунологията, клетъчна и молекулярна биология и през 2006 г , защитава докторска дисертация на тема: „Изследване на биомаркери при простатен карцином с диагностична и терапевтична цел” в научна специалност “Имунология”, Шифър 01.06.23. От 2002 г. е Красимира Тододова е асистент към института и нейната научно-изследователска работа е в областите на карцином на простатата – туморни маркери, ДНК ваксини, туморна имунология.

През 2008 г . Красимира Тодорова извършна научно-изследователска работа в областта на кожата и туморната биология, като постдокторант в Harvard Cutaneous Biology Research Center at Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA. От 2010 г е главен асистент в ИБИР – БАН. Нейните научни интереси касаят важни за Българската наука области, касаещи женския и мъжкия организъм. Красимира Тодорова задълбочава своите проучванията върху проблеми в репродукцията, свързани с туморната имунология, карцином на простатата, неоангиогенезата При женската репродукция насочва своите изследвания върху проследяване на маркери с предиктивно значение за определяне качеството на ембрионите при АРТ процедури. От януари 2013 г е доцент като нейното развитие в областта на имунологията обхваща и други научни области като молекулярна биология, генетика, протеомика, метаболомика и проучвания на микроРНКи, онкофузионни феномени.

Започвайки своето кариерно развитие с дейности в областта на репродуктивната имунология, преминавайки през умения за научно-изследователска и фундаментална работа чрез молекулярни и генетични методи, днес доц. Красимира Тодорова се е доказала като успешен млад учен със своите компетенции при използване на най-съвременни молекулярно-биологични и генетични техники, прилагайки творчество и иновативност чрез въвеждане на нанопротеомен и биоинформатичен анализ, като част от нейните изследвания.

Научно-изследователска дейност на доц. Красимира Тодорова е свързана също така, с подготвяне и осъществяване на научно-изследователски проекти, както и обучение на дипломант, студенти и планиране и провеждане на експерименти. Тя има успешно ръководство и участия в проекти, финансирани от национални и външни за България източници - 9 броя, от които 5 са включени в конкурса.

Не на последно място доц. Красимира Тодорова е автор на заявка за патент «Метод и кит за откриване на онкофузионе протеин» от 2014 г.

На доц. Красимира Тодорова са връчени 4 научни награди - 100 Млади български учени – биографична енциклопедия, 2012, Marquis Who's Who in the World, 2010 award, Marquis Who's Who in the World, 2009 award, Номинация за награда за млад учен в БАН 2006 – 2-ро място.

### **3. УЧЕБНО-ОБРАЗОВАТЕЛНА ДЕЙНОСТ**

Доц. Красимира Тодорова притежава отлични умения да презентира свои научни постижения. Тя е водила курсове по Проект “Студентски практики” по ОП “Развитие на човешките ресурси”. Научен ръководител е на 1 дипломант.

### **4. ТЕХНИЧЕСКИ УМЕНИЯ И КОМПЕТЕНЦИИ**

Доц. Красимира Тодорова работи без проблем с програмите Windows, MS Office (Word, Excel, Power Point), Adobe Photoshop, Internet, както и умее да работи с високоспециализирана апаратура за изследване на рекомбинантни ДНК протеини и други вещества, PCR, работа с микроРНКи. Използва съвременните знания за работа в областта на туморната и клетъчна биология и ангиогенеза, стем клетки в карциномното развитие, ДНК ваксини, хуморален и клетъчен имуноен отговор, цитогенетика и имунология и онкология и опазване на околната среда

От прегледа на нейната научна продукция се вижда умението и да съчетава прилагането на съвременни молекулярно-биологични, молекулярно-генетични методи, имунологични и имунохимични методи и други методи от клетъчата и молекулярна биология при сформирването на научно изследователски цели, които са приоритет на съвременното общество.

## **5. ОСНОВНИ НАПРАВЛЕНИЯ В ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКАТА РАБОТА НА КАНДИДАТА И НАЙ-ВАЖНИ НАУЧНИ ПРИНОСИ**

Дисертационният труд, представен от доц. д-р Красимира Тодорова разглежда важна тема касаеща едно от най-честите неопласитични заболявания при мъжете - карциномът на простатата, както и ни запознава с намирането на нови подходи в борбата срещу това заболяване.

Актуалността на темата е обоснована от нуждата за подобряване на мониторинга и терапията на това заболяване, както и от необходимостта за идентифициране на нови биомаркерни молекули, които да са с по-голяма надежност и по голяма точност при диференциране на междинни преканцерогенни състояния, както и при поставянето на точна диагностика на простатния карцином.

Едни от най-новите открития в тази област са направени през 1990 г. и касаят молекули, които вече са с доказани диагностични и терапевтични особености при други карциномни заболявания и това са микроРНК-ите. Регулаторният потенцициал на микроРНК-ите едновременно върху множество главни транскрипционни регулатори, които имат туморно-супресорни или онкогенни функции, са свързани с високата им предиктивна способност.

В настоящият момент, в България има оскъдни проучвания върху микроРНК-и. Има малко, почти единични изследвания, свързани с проследяването на конкретни микроРНК-и и връзката им с ключови транскрипционни фактори, както и с основни фузионно-реаранжирани протеини при простатен карцином. Именно в тази недостатъчно изследвана научна ниша е насочен разработения от доц. Тодорова дисертационен труд, което го прави изключително актуален.

Проектът за дисертация е разписан на 325 страници, съдържа 153 фигури и 7 таблици, ползвани са 499 литературни източника, предимно от последните 5 години.

Съдържа **уводна част** (2 страници), в която са изложени важни факти относно социалните аспекти на заболяването простатен карцином. Показва се липсата на биомаркерни молекули за диагностика и терапия и се доказва необходимостта от разкриване на нови некодиращи РНК-и и онкофузионни протеини.

**Литературният обзор** е направен пригледно и обхваща 47 стр. Разделен е на 5 основни глави, в съответствие със задачите. Разглеждат се проведени до сега изследвания в световен мащаб, които касаят етиологията и видовете простатен карцином; биомаркери за диагностика и терпия; молекулярни механизми на простатната канцерогенеза; ролята на микроРНК-ите като нови биомаркерни молекули; ролята на онкофузионните феномени при карцином.

Доч. Тодорова е направила обосновани бележки относно недостатъците на използваните до момента маркери и методи за диагностика и лечение. Посочила е фундаментални факти относно изменената експресия на микроРНК-ите при други туморни заболявания. Посочен е потенциала на некодиращите РНК-и за използване като диагностични, прогностични, предсказващи биомаркери и молекули, както и възможността да бъдат използвани за профилактика и лечение на карцином. В отделна подточка е развита взаимовръзката между андрогенният сигналинг и микроРНК ефекта върху андрогенният рецептор, който е основен таргет при лечение на простатен карцином.

Литературният обзор завършва с **Обобщение** от 6 стр., в което са посочени основните фактори и процеси, които са ключови за канцерогенезата и които биха могли да бъдат таргетни при изследователската дейност с цел подобряване на статуса на заболяването.

Добро впечатление прави, че на базата на направения литературен анализ се диференцират ясно неизяснените и спорни въпроси. Също така, като плюс на направената литературна справка е факта, че използваните литературните източници са от последните 5 и 10 г., с което още по ясно подчертава актуалността на проблема и необходимостта от проведените изследвания.

**Поставената цел** е свързана с изследване участието на микроРНК-204, транскрипционните фактори RUNX2, MYB, ETS1 и онкогенно реанжирианият фузионен протеин TMPRSS2-ERG в патологични генно-регулаторни мрежи, имащи роля за малигнената трансформация при простатен карцином. Тази цел е поставена, с оглед резултатите от изследванията да могат да се прилагат в диагностиката и терапията. За решаването на целта, Доц. Тодорова е поставила 11 задачи (общо 3 стр.).

Целта е написана точно и ясно и обосновано. Поставените задачи, макар и с много подзадачи, съответстват на поставената цел.

**Материалите и методите** са разписани на 19 страници. Включени са 26 метода като: обратно-транскриптазна полимеразна верижна реакция, проточна флоуцитометрия, трансфекция с некодиращи РНК-и, луцферазни репортерни системи, стабилни клетъчни линии, количествена имунохистохимия и имунофлуоресценция, и др. Прави много добро впечатление използването на съвременни методи за анализ, които съответстват на поставените задачи.

Експериментите сравняват състояния на карциномно индуцирано метилиране и тотално деметилиране. В този раздел са описани нововъведени методи относно



измерване на белтъчна експресия на онкофузионни протеини Тези подходи са нови и резултатите от тях са заявени за патентоване.

Друг важен принос с иновативен характер е въвеждането на нов метод, публикуван в реномирани референтни списания. Методът касае измерване на базалният слой клетки при простатната жлеза. Чрез този метод не се оценява наличието или липсата на дадена молекула, а се търси механизъм за нейното количествено определяне. Методът е основан на хипотезата за механизма на развитие от преканцерозно до канцерозно заболяване, като в известна степен се опровергават стари данни в литературата.

Прави много добро впечатление използването на съвременни методи Доц. Тодорова ги е съобщила с поставените задачи, което и позволява да даде точен отговор чрез използвания прецизен нанопротеомен и биоинформатичен анализ.

Добро впечатление прави използването на широк набор от материали и реагенти. Използвани са синтетични аналози и инхибитори на некодиращи РНК-и, 29 антители, растителни екстракти за функционални тестове, флуоресцентни багрила, клиничен материал (серуми и тъканни срези от пациенти с карцином, аденом, атрофия и неоплазия на простата, здрави контролни срези и серуми).

Бих казала, че особено важно при оценката на една дисертация е начина на изписване на методите за работа. Доц. Тодорова се е постарала методите за анализ да са разписани по начин, позволяващ тяхното възпроизвеждане. Консумативите са с показана марка и производител. Предоставени са рецепти на основни буфери и разтвори. Статистическите методи са разписани подробно.

**Разделът “Резултати”** е разписан на 165 страници (включващ 153 фигури, 7 таблици, 5 основни глави). Всъщност, голямата тежест и значимост на труда е точно в тази част.

*Първа глава* включва епигенетични регулаторни взаимодействия между микроРНК-204 и главните транскрипционни фактори (RNХ2, ETS1, MYB), оказващи влияние върху епитело-мезенхимната трансформация и андроген рецепторният сигналинг в клетъчен модел на простатен карцином. Като моделна система за простатен карцином са използвани 4 комерсиални клетъчни линии, които имат различна андрогенна чувствителност и степен на злокачественост.

Установена е модулаторната роля на генно-регулаторната мрежа микроРНК-204 — RUNX2, ETS1, MYB върху процеса на епитело-мезенхимната трансформация при простатен карцином. Доказано е, че микроРНК е директен негативен регулатор на главните транскрипционни фактори. Установените функционални вътрешни зависимости в генно-регулаторната мрежа са със значение за малигнената трансформация при простатен карцином. Доказан е ефекта на деметилирането върху микроРНК-204, като се наблюдава потискане на експресионните нива на изследваната некодираща РНК след действието на химиотерапевтика 5-азациитидин.

В заключение по първа глава е показан ефекта на микроРНК-204 върху жизнеността и миграционната способност на простатно-карциномните клетки.

Доц. Тодорова представя в края на всяко изследване обобщаващи фигури. В настоящата глава това позволи с лекота да сравнят данните между 4те клетъчни линии.

Предоставени са дисоциационните и амплификационните криви от полимеразно-верижните реакции. Данните за протеинова експресия са унагледени с 2 метода с цел потвърдителност на получените резултати (проточна цитометрия и имуноблот). В допълнение, за повишаване достоверността на данните от използваните методи, Доц. Тодорова допълнително добавя подточки, като генно заглушаване и трансфекция с микроРНК мимик или инхибитор. Използвани са 3 метода, доказващи ефективността на техниките за анализ - RT-PCR, FACS, луциферазна реакция.

*Втора глава* от "Резултати" логично и последователно включва изследвания върху инфламаторни, генотоксични и оксидативни процеси, свързани с простатната канцерогенеза. В изкуствено създадени условия на възпаление с или без участието на микроРНК-204 са изследвани експресионните профили на молекули, свързани с инфламаторните реакции.

Новото и важно в тези изследвания е, че е разкрит механизъм, по който микроРНК-204 свързва вродения имунен сигналинг и хроничното възпаление с модуляцията на сигналинга на андрогенният рецептор.

В допълнение на тези изследвания, доц. Тодорова провежда изследвания за ролята на микроРНК-204 върху процесите, свързани с автофагоцитозният сигналинг. От тези анализи е установен различен модулаторен ефект в зависимост от андрогенната чувствителност. Направена е количествена оценка на нивата на експресия на група маркерни молекули (AMACR, p63, COX-2, GSTP1) в тъканни срези от пациенти с простатна инфламаторна атрофия, простатна интраепителна неоплазия и простатен карцином, позволяваща обективното разграничаване на възникващите карциноми "in situ" от състояние на преканцероза и детектирането на суб-популации с характеристики на карциномни стволови клетки.

Също така, е направена количествена оценка на сравнително-експресионен анализ на група молекули (COX-2, GSTP1) в тъканни срези от пациенти с простатен карцином, простатен аденом и здрава простата.

Като важен принос може да се изтъкне резултатът, където разликите в установената експресия в аденом и карцином, показват възможността тези маркерни молекули да се прилагат като диагностичен панел към установени маркери за преканцерозни заболявания.

В *трета глава* от "Резултати" са включени нанопротеомни изследвания на клетъчни лизати от простатно-карциномните линии, които са с произход от метастаза от лимфен възел и костна метастаза. Първата линия е с андрогенна чувствителност за разлика от втората. Данните, които получава доц. Тодорова показват, че някои от ефектите на микроРНК-204 за регулация на андроген - рецепторният сигналинг и експресията на онкофузионният ген TMPRSS2-ERG, са опосредствани чрез епигенетични механизми. Такива са: промяната в нивата на ДНК промоторното метилиране, промяната на ключови ДНК метилази, хистоновата регулация и препрограмирането на убиквитинирането, свързано с транскрипционната регулация на андрогенния рецептор.

Прави добро впечатление направения задълбочен биоинформатичен анализ с използването на различни алгоритми за получаване на информация на най-засегнатите от микроРНК-204 протеини и сигналните пътища, в които те участват. Този подход е изключително важен и значим при обобщаване на получените резултати. В настоящия дисертационен труд този анализ убедително спомага за доказване достоверността на резултатите.

В своята последователност и логика на идеята на дисертационния труд е установена взаимовръзка между генно-регулаторна мрежа (микроРНК-204 — RUNX2, MYB, ETS1) и андрогенният рецептор. Доц. Тодорова доказва, че МикроРНК-204 кумулативно усилва експресията на AR при състояние на тотално деметилиране в клетъчен модел на простатен карцином. МикроРНК-204 индуцира намаление на степента на метилиране на промотора на AR. Също така се доказва, че главните транскрипционни фактори - RUNX2, c-MYB и ETS са позитивни регулатори на андрогенният рецептор. Установено е, че микроРНК-204 губи рестриктивните си свойства по отношение на онкогенни транскрипционни фактори и участва в активирането на онкофузионният продукт TMPRSS2-ERG, както и води до препрограмиране на андроген рецепторният сигналинг с промяна на част от неговите прицелни гени. За мен тази глава от изследванията е изключително значима.

В четвърта глава доц. Тодорова доказва взаимовръзката между възникващият в малигнизиращи простатни карциноми фузионен онкопротеин TMPRSS2-ERG и установената генно-регулаторна мрежа (микроРНК-204 — RUNX2, ETS, MYB). Създаден е аналитичен метод за детекция и количествена оценка на протеиновите продукти на онкофузията TMPRSS2-ERG, установена в серуми от пациенти с простатен карцином. Доц. Тодорова търси обективни подходи за оценка на метастатичният потенциал. За целта тя е анализираща онкофузията в серумите от пациенти с простатен карцином на транскрипционно и протеиново ниво, като данните са сравнени с експресията на ERG в същите серуми. В тази глава доц. Тодорова прави заключение с важен приносен характер, което подпомага при селекцията на пациенти, да се диференцират такива, които са най-застрашени от развитие на андрогенна резистентност.

Финалната пета глава включва обобщаваща информация и схема на взаимодействията на всички изследвани молекули, включени в генно-регулаторната мрежа. Доц. Тодорова много ясно и точно обобщава получените резултати от проведените изследвания, които добиват своя завършен и логичен вид.

Дискусията е разписана на 38 страници. Представени са оригиналните данни, съпоставени с оскъдните данни от литературни източници по този проблем. Всички получени резултати са обсъдени с заключителен елемент, налагащ определен извод. Прави добро впечатление точността и прецизността, с които доц. Тодорова прави разсъждения относно проведените от нея анализи и известните в тази насока изследвания.

Дискусията завършва със заключение, разписано на 5 страници. В него още по-ясно се свързват данните от получените резултати и се очертават оригиналните открития на изследователя. Заключителната част е естествен преход към изводите, които са 7 на брой.

Дисертационният труд завършва с 7 извода и 7 приноса с оригинален характер. Някои от направените изводи са изключително оригинални и имат значимост в практически аспект при решаването на важни аспекти в борбата с простатния карцином.

Налична е **библиографска справка** с 499 цитирани литературни източника. Цитирани са предимно чужди, но има и български източници.

**Заключение:** Представената дисертация на тема: "Генно-регулаторна мрежа между микроРНК-204, онкофузионният протеин TMPRSS2-ERG и транскрипционни фактори със значение за метастазирането в простатната канцерогенеза", разработена от доц. Красимира Тодорова, съответства на изискванията за написване и съдържание на важни научни приноси с фундаментален и приложен характер, съгласно изискванията на ЗРАСПБ и Правилника за приложение, Правилника на БАН и ИБИР и всички законови изисквания. Дисертационният труд съдържа значими резултати за фундаменталната и приложна наука, представени са приноси с иновативен характер, които имат практическо приложение и касаят диференцирането на някои междинни преканцерогенни състояния и решават важен проблем при поставянето на точна диагностика на простатния карцином.

Въз основа на представената информация, редовността на всички представени документи, очертавания научен профил, който съответства на тематиката на обявения конкурс, както и покриването на наукометричните изисквания за участие в конкурса, също както и значимостта на по-голямата част от публикациите, с които се кандидатства, високият импакт фактор, участието на научни конференции и симпозиуми, участието в проекти и преподавателска дейност, активността на кандидатката, отразена в получени награди и членство в научни организации, както и на основание лични впечатления за доц. Красимира Тодорова като прекрасен и перспективен млад учен с изграден облик и доказани морални устои, бих искала да кажа, че моето становище е положително и ще гласувам „За“ да и се присъди на научна степен „доктор на науките“, в област на висше образование е: 4. Природни науки, математика и информатика; Професионално направление 4.3. Биологически науки; Научна специалност "Имунология" Шифър на специалността 01.06.23.

19.06.2015 г.  
София

Подпис:   
проф. д-р М. Иванова, доктор на науките