



## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема „Генно-регулаторна мрежа между микроРНК-204, онкофузията TMPRSS2-ERG и транскрипционни фактори със значение за метастазирането”, с автор Доц. Красимира Олегова Тодорова-Хайрабедян, дб от ИБИР “Акад. Кирил Братанов” – БАН, с оглед на процедура за защита и присъждане на научната степен “Доктор на науките”, Област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, Професионално направление 4.3. Биологически науки, Научна специалност 01.06.23 “Имунология”

от проф. д-р Цветанка Цанкова Маринова, дм, дмн, Катедра „Биология, медицинска генетика и микробиология”, Медицински Факултет, СУ „Св. Климент Охридски”

Представеният за рецензиране дисертационен труд е актуално, задълбочено и с безспорен приносен характер изследване с научно-приложна стойност в областта на туморната имунобиология. Регулаторният ефект на микроРНК-ите върху множество транскрипционни фактори с тумор-супресорни или онкогенни функции е обект на интензивно изследване, с оглед изясняването на молекулните механизми на клетъчната онтогенеза и неопластичната трансформация на клетките. В този смисъл, трудът е посветен на един много съществен и значим медико-биологичен проблем, отнасящ се до изучаването на генно-регулаторните и структурно-функционални взаимодействия между микроРНК-204, онкофузията TMPRSS2-ERG и някои транскрипционни фактори със значение за онкогенезата и метастазирането при карцином на простатата.

Дисертационният труд е написан на 325 страници с оптимално съотношение на съставните му части: Увод; Литературен обзор с обобщение; Цел; Научно-изследователски задачи; Материал и методи; Резултати; Дискусия; Изводи; Приноси; Библиография. Илюстриран е с 153 фигури и 7 таблици. В библиографския списък са цитирани 499 литературни източника (1 автор на кирилица и 498 автора на латиница).

Литературният обзор е изчерпателен и аналитичен. В него са включени най-нови данни за някои най-съществени биомаркерни молекули и методи за диагноза при простатен карцином. Направен е анализ на известните до момента факти за молекулните механизми на онкогенезата. Обсъдена е ролята на TMPRSS2-ERG фузионния продукт в простатната канцерогенеза, както и на потенциала на микроРНК-ите като нови прогностични, диагностични и терапевтични маркери при простатен карцином. Изключително добро впечатление прави заключителната част на прегледа на известните факти, в която са отлично систематизирани и компетентно интерпретирани неяснотите и противоречията в литературните данни.

Целта на дисертационния труд е ясно формулирана: Да се изследва участието на микроРНК-204, транскрипционните фактори RUNX2, MYB, ETS1 и онкогенно реаранжираният фузионен протеин TMPRSS2-ERG в патологични

генно-регулаторни мрежи, имащи роля за малигнената трансформация при простатен карцином.

Задачите на проучването (пет задачи и девет подзадачи) са конкретно и аргументирано редактирани. Те се отнасят главно до: 1. Доказване на епигенетични регулаторни взаимодействия между микроРНК-204 и главни транскрипционни фактори (MYB, RUNX2, ETS1), оказващи влияние върху епитело-мезенхимната трансформация в клетъчен модел на простатен карцином; 2. Доказване на инфламаторни, генотоксични и оксидативни процеси, свързани с простатната канцерогенеза; 3. Доказване на модулиращата роля на микроРНК-204 върху сигналинга на андрогенния рецептор и свързани епигенетични механизми в простатната канцерогенеза; 4. Доказване на дисрегулацията на микроРНК-204 при настъпване на геномно реаранжиране и възникване на характеристичен за простатния карцином фузионен феномен TMPRSS2-ERG; 5. Създаване на модел, описващ генно-регулаторна мрежа с участието на микроРНК-204, транскрипционни фактори RUNX2, ETS, MYB, онкофузионен протеин TMPRSS2-ERG и взаимовръзката им с ключови елементи на андроген рецепторния сигналинг и епитело-мезенхимната трансформация.

Експерименталният материал е подходящ за целите на изследването и е достатъчен по обем за достоверен статистически анализ. Използвани са клетъчни култури, включително специално подбрани аденокарциномни клетъчни линии, среди за клетъчно култивиране и набор от антители, серуми от здрави лица и пациенти с карцином на простатата, както и тъканни срези от простатна жлеза с различни патологични промени, предоставени от Университетската Болница в гр. Плевен и Националния център по хематология и трансфузиология в гр. София.

Методичният подход е комплексен и адекватен на поставената цел. Той включва голям набор (21 методични подхода) от високо информативни и взаимно допълващи се съвременни методи (молекулно-биологични, клетъчно-биологични, молекулно-имунологични, биохимични, имунохимични, имунохистохимични и статистически), осигуряващи достоверност на получените резултати: 1. Клетъчно култивиране; 2. Трансфекция с микроРНК мимик и инхибитор, и генно заглушаване "knockdown"; 3. Обратнотранскриптна полимеразно-верижна реакция (RT-qPCR) и Метилационен специфичен RT-QPCR (MS-QPCR); 4. Проточна цитометрия; 5. Приготвяне на протеинови екстракти за електрофореза и електрофоретично разделяне (SDS-PAGE); 6. Електротрансфер и Имуно-блот (Western блот, ECL); 7. Двуйзмерна електрофореза (2D PAGE) и сребърно оцветяване; 8. Количествена нанопротеомика; 9. Имунофлуоресценция на клетки; 10. Луциферазна Репортерна Система; 11. Продуциране на стабилна репортерна клетъчна линия; 12. Колориметрична SEAP Репортерна Система за откриване на активен NFκB; 13. Ултравioletово радиационно третиране на клетки; 14. Флуоресцентен метод за откриване на реактивни форми на кислорода (ROS); 15. Клетъчен пролиферативен тест (ССК-8); 16. Тест за оценка на клетъчна миграция ("scratch

test”); 17. Пълно (тотално) геномно деметилиране (5-азацитидин); 18. Имунохистохимия и количествена имунохистохимия; 19. Статистическа обработка на данните от количествената имунохистохимия; 20. Методи за детекция на онкофузионен протеин; 21. Статистически анализ.

Описанието на собствените резултати е задълбочено, логично и изчерпателно. То без съмнение показва отличната методична подготовка на доц. Тодорова, нейната старателност, добросъвестност, компетентност и прецизност в работата. Изложението свидетелства за уменията ѝ да съпоставя литературните данни, да анализира умело получените резултати и да прави мотивирани обобщения. Получените резултати са представени в пет раздела, включващи 64 подраздела. Обект на анализ са следните по-съществени процеси, закономерности и взаимодействия: I. Епигенетични регулаторни взаимодействия между микроРНК-204 и главни транскрипционни фактори (MYB, RUNX2 и ETS1), оказващи влияние върху епитело-мезенхимната трансформация и AR сигналинг в клетъчен модел на простатен карцином; II. Изследвания върху инфламаторни, генотоксични и оксидативни процеси, свързани с простатната канцерогенеза; III. Модулираща роля на микроРНК-204 върху сигналинга на андрогенния рецептор и свързани епигенетични механизми в простатната канцерогенеза; IV. Дисрегулация на микроРНК-204 при настъпване на геномно реаранжиране и възникване на специфичен за простатният карцином фузионен феномен TMPRSS2-ERG; V. Модел на генно-регулаторни взаимоотношения с участието на микроРНК-204 в карцином на простата. Въз основа на получените резултати в настоящият дисертационен труд е представена схема, анализираща генно-регулаторните взаимодействия между микроРНК-204, главните транскрипционни фактори RUNX2, c-MYB, и ETS1, онкофузионният феномен TMPRSS2-ERG, транскрипционният фактор и маркер ERG, андрогенният рецептор и молекули, участващи в епитело-мезенхимната трансформация при простатен карцином (SLUG, SOX9, VEGF, E-cadherin, N-cadherin). Изложението без съмнение е доказателство за високата ерудираност на автора.

Получените приоритетни резултати имат главно фундаментален характер с приложно значение за медицинската практика. Те представляват много съществен принос в познанията за простатната канцерогенеза.

Илюстративният материал е с много високо качество и достатъчен по обем за изпълнение на задачите на дисертационния труд. Приложените микрофотографии, схеми и таблици илюстрират убедително представените данни и са много компетентно интерпретирани.

Формулираните седем извода отразяват правилно получените резултати и имат научно-приложна стойност:

1. Установени са функционални вътрешни зависимости в генно-регулаторната мрежа между микроРНК-204 и главните транскрипционни фактори RUNX2, ETS и MYB със значение за малигнената трансформация при простатен карцином.

2. Установен е ефект на модулиране на генно-регулаторната мрежа (микроРНК-204 – RUNX2, ETS, MYB) върху процеса на епитело-мезенхимната трансформация при простатен карцином.

3. Доказана е взаимовръзката между възникващият в малигнизиращи простатни карциноми фузионен онкопротеин TMPRSS2–ERG, установената генно-регулаторна мрежа (микроРНК-204 – RUNX2, ETS, MYB) и ключови елементи на андроген-рецепторния сигналинг.

4. Открит в механизъм, по който микроРНК-204 свързва вродения имунен сигналинг и хроничното възпаление с модулацията на сигналинга на андрогенния рецептор.

5. Установено е, че микроРНК-204 повлиява метилази, регулиращи активността на андрогенния рецептор и повлиява онкофузионният протеин TMPRSS2–ERG, като регулира метилирането на промотора му.

6. Направен е сравнителен анализ на експресионния профил на TMPRSS2–ERG, установен в серумите от пациенти с простатен карцином на транскрипционно и протеиново ниво и е намерена взаимовръзка с експресията на ERG в същите серуми. По този начин е доказано, че намерената TMPRSS2–ERG експресия подпомага суб-селекцията на пациенти, които са най-застрашени от развитие на андрогенна резистентност.

7. Количественото профилиране на секреторните колонии по маркери за геномна протекция и геномна увреда (AMACR, COX-2, GSTP1) и подлежащите им базални клетки с отчитане на нарушенията в линейността на базалният слой (по p63), позволява да се проследи техния клетъчен ред и показва, че началните стадии на простатната канцерогенеза започват с процеса на простатна атрофия чрез трансформация на базалните клетки в неопластични клетки. Това позволява обективното разграничаване на възникващите “in situ” карциноми от състоянията на преканцероза.

Най-съществените оригинални приноси на дисертационния труд се отнасят главно до следното:

1. Установено е за първи път, че микроРНК-204 губи рестриктивните си свойства по отношение на онкогенни транскрипционни фактори и участва в потискането на онкофузионния продукт TMPRSS2–ERG, както и води до препрограмиране на андроген рецепторния сигналинг с промяна на част от неговите прицелни гени.

2. Установено е, 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, като промяна в нивата на ДНК промоторно метилиране, промяна на ключови ДНК метилази, хистонова регулация и препрограмиране на убиквитинирането, свързано с транскрипционната регулация на андрогенния рецептор.

3. Установена е модулаторната роля на генно-регулаторната мрежа микроРНК-204 – RUNX2, ETS1, c-MYB върху процеса на епитело-мезенхимната трансформация при простатен карцином.

4. Установена е модулаторната роля на главните транскрипционни фактори RUNX2, ETS1, c-MYB върху онкофузионния продукт TMPRSS2-ERG и андроген рецепторният сигналинг.

5. Получени са нови данни, позволяващи оценка на метастатичния потенциал, като е анализирана онкофузията TMPRSS2-ERG в серуми от пациенти с простатен карцином на ниво иРНК. Направен е сравнителен анализ с данните за транскрипционния фактор ERG, получени от изследвания на същите серуми.

6. С важно приложно значение за клиничната практика е създадения аналитичен метод за детекция и количествена оценка на протеиновите продукти само на тези генни реаранжировки, които водят до правилно функционално навити части на TMPRSS2 и ERG, и биха имали функционална активност като транскрипционен фактор с цел стратифициране на пациентите с най-висока вероятност за преминаване към андрогенна резистентност.

7. Изказана е оригинална хипотеза относно възможността простатно-карциномната инициация да започне от базалните прогениторни клетки на преканцерозни състояния при хронично възпаление въз основа на загубата на гени, поддържащи епителната диференциация и характерни промени в количествените експресионни профили.

Авторефератът е изготвен съгласно изискванията и отразява правилно най-съществените резултати и научните приноси на дисертационния труд.

Списъкът на научните трудове на Доц. Красимира Олегова Тодорова-Хайрабедян, дб включва 42 заглавия, в това число 1 автореферат на кандидатска дисертация, един заявен патент, съавторство в две монографични издания и 39 научни публикации, в 19 от които тя е първи автор (IF = 62.763; цитирания 65; h-index = 5). Участията в конгреси са 30, като в 9 от тях Доц. Тодорова е първи автор (IF = 31.9). Научните трудове, свързани с дисертационния труд са 14 броя - съавторство в едно монографично издание и 13 научни статии, в 7 от които тя е първи автор (IF=23.509). На конгреси и симпозиуми са докладвани общо 11 научни съобщения, свързани с дисертационния труд, от които 2 в чужбина и 9 в български научни форуми с международно участие.

Броят на цитиранията на научните публикации с участието на д-р Красимира Тодорова-Хайрабедян, публикувани в международни, рецензирани и индексирани списания и книги е 65.

Изследователската работа на Доц. Тодорова по темата на дисертацията е финансово подпомогната чрез финансиране от национални и международни научно-изследователски договори. Тя участва в изпълнението на десет научно-изследователски проекта, на два от които е ръководител.

Доц. Красимира Олегова Тодорова-Хайрабедян, дб е възпитаник на СУ „Св. Климент Охридски“, с диплома за ОКС „Магистър“, специалност „Биология“, Серия А-200СУ, №149659/27.02.2001 г., специализация „Клетъчна биология и биология на развитието“. Притежава Диплома за ОНС „Доктор“, № 30923/29.12.2006, ВАК, Научна специалност 01.06.23 „Имунология“. Тя е ръководител на Лаборатория по репродуктивни ОМИКС технологии в ИБИР

“Акад. Кирил Братанов” – БАН, София. Била е гост-изследовател в Essex University, School of Biological Sciences, Colchester, UK; Basel University, Switzerland и в Harvard Cutaneous Biology Research Center at Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA. Научно-изследователските ѝ интереси са разностранни и са в следните области: туморна имунология, онкофузионни феномени, микроРНКи, туморна и клетъчна биология, ангиогенеза, карцином на простатата – туморни маркери, ДНК ваксини, хуморален и клетъчен имуноен отговор, цитогенетика, екология и опазване на околната среда. Автор е на патент. Доц. Тодорова е много трудолюбив, добронамерен и толерантен колега, който притежава значим методичен, изследователски и преподавателски опит като научен ръководител на дипломанти в СУ “Св. Климент Охридски”.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният за рецензиране дисертационен труд е актуално по замисъл и модерно в методично отношение задълбочено проучване, резултат от трудоемка, много прецизно и добросъвестно изпълнена експериментална работа. Резултатите са по подходящ начин представени, отлично документирани, компетентно дискутирани и имат оригинален приносен характер в областта на туморната имунобиология. Дисертационният труд допринася за изясняването на някои молекулни механизми в регулацията на простатната канцерогенеза и е теоретична основа за нови молекулогенетични и имунобиологични диагностични и терапевтични подходи в клиничната практика. Като обем и качество дисертационната работа напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение, с оглед присъждането на научната степен „Доктор на науките”.

В заключение, като отчитам научно-приложната стойност и приносния характер на рецензирания дисертационен труд „Генно-регулаторна мрежа между микроРНК-204, онкофузията TMPRSS2-ERG и транскрипционни фактори със значение за метастазирането”, бих могла напълно убедено да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури да го оценят положително и да присъдят на неговия автор Доц. Красимира Олегова Тодорова -Хайрабедян, дб научната степен „Доктор на науките” в Област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, Професионално направление 4.3. Биологически науки, Научна специалност 01.06.23 “Имунология”.

17. 07. 2015 г., София

Рецензент: .....

(Проф. д-р Ц. Маринова, дм, дмн)