

## СТАНОВИЩЕ

на дисертационния труд на доц. д-р Красимира Олегова Тодорова –Хайрабедян на тема: „Генно-регулаторна мрежа между микро РНК-204, онкофузията TMPRSS2-ERG и транскрипционни фактори със значение за метастазирането“ за присъждане на научната степен „Доктор на науките“ по професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Имунология“ (шифър 01.06.23)

от проф. д-р Румяна Миронова – ИМБ „Академик Румен Цанев“ – БАН

### Обща характеристика и оценка на дисертацията

Ракът на простатата е най-често развиващият се неопластичен процес при мъжете, след рака на белия дроб, и втората по честота причина смъртност при мъжете. Причините за това злокачествено заболяване, както и връзката между възпалителни процеси на простата, доброкачествена хиперплазия и нейната трансформация в карцином не са напълно изяснени. Известно е, че на молекулно равнище патологичните процеси, водещи до малигнизация на простатната тъкан, са съпроводени с генни мутации, геномни преустройства и промяна в експресията на редица гени. Поради механизма си на действие малките некодраци РНКи (миРНКи) допринасят съществено за това мащабно разстройство в генно-регулаторната мрежа, което от своя страна значително затруднява диференциалната диагностика, прогноза и терапия на заболяването. Това определя актуалността и значимостта на настоящия дисертационен труд, който си поставя за цел да хвърли светлина върху ролята на една конкретна миРНК (миРНК-204) в генно-регулаторните изменения, които настъпват в хода на туморната прогресия и водят до появата на карциномни форми, които са неподатливи на андроген-депривационна терапия.

Дисертацията на доц. К. Тодорова-Хайрабедян представлява една солидна монография върху простатния карцином, написана на 325 стр. и включваща близо 500 (499) литературни източника. Няма да се спирам подробно на структурата на дисертацията, която е стандартно оформена и добре балансирана с акцент върху раздел „Резултати“, съставляващ 50% от обема на дисертацията. Смятам, че след малка преработка на дисертацията ще се получи една интересна и стойностна монография върху рак на простата. Тя би могла да се публикува на български и/или английски език, което препоръчвам на докторантката и което е израз на моята висока оценка за теоретичната и експериментална стойност на нейния труд. Имам само малка забележка към заглавието на този труд, в което трябваше да фигурира думата „простатен карцином“. Литературният обзор е всеобхватен и задълбочен и логично води към поставените цели и задачи. Смятам, че можеше да се спечели още в тази посока ако в прегледа на миРНКите беше включена миРНК-204 като отделна подточка.

Извършена е внушителна по обем експериментална работа. Като са използвани четири клетъчни модели на простатен карцином, е изследван ефектът на миРНК-204 върху а) жизнеността и миграцията на раковите клетки; б) процесите на възпаление и автофагоцитоза; в) експресията на три онкогенни транскрипционни фактори (сMYB, RUNX2, ETS1) и на белтъци, участващи в епително-мезенхимната трансформация (EMT); г) експресията на андрогенния рецептор (AR) и на онкогенен слят белтък между трансмембранна серинова протеаза и транскрипционен фактор ERG (онкофузия TMPRSS2-ERG) самостоятелно и след тотално геномно деметилиране; и д) метилирането на промоторите на слетия ген и на гена за AR. Обратно, проследени са ефектите от

тоталното геномно деметилиране и от заглушаването на трите транскрипционни фактори върху експресията на миРНК-204. С две от клетъчните линии е проведен протеомен анализ след трансфекция с миРНК-204. Допълнителни експерименти, без участието на миРНК-204, включват а) изследване ефекта от заглушаването на трите транскрипционни фактори върху експресията на молекули, участващи в ЕМТ, както и върху експресията и метилирането (на промоторите) на гените за AP и за онкофузията TMPRSS2-ERG; б) хистохимични изследвания за количествена оценка на потенциални туморни макери; в) изпитване на екстракт от „възкръсващото“ растение родопски силивряк (*Haberlea rhodopensis*) за ефект върху окислителни, генотоксични и възпалителни процеси в раковите клетки; и г) изследване на серуми от пациенти с простатен карцином за иРНК и белтъчен продукт на онкофузията TMPRSS2-ERG. Биологичните материали, използвани в изследванията са а) четири клетъчни линии от простатен карцином с различен генотип и малигнен потенциал, б) тъканни срези от простати с различна патология в т. ч. карцином и в) серуми от пациенти с диагностициран рак на простатата в напреднал стадий. Използван е голям набор от адекватни и съвременни методи, между които количествени PCR и нано-протеомика, проточна цитометрия (FACS) и генно заглушаване.

Масщабната експериментална работа генерира голям брой резултати, които са добре описани и подкрепени с илюстративен материал (153 фигури). Намерени са завишени нива на миРНК-204 в двете клетъчни линии с по-лоша прогноза, които са носители на онкофузията TMPRSS2-ERG. В същото време миРНК-204 е слабо експресирана в нормална простатна тъкан, което поставя въпроса дали миРНК-204 би могла да се окаже като онкоген (онко-миРНК). Както се вижда от многобройните изследвания, на този въпрос не може да се даде еднозначен отговор. В ранните етапи на простатната канцерогенеза поведението на миРНК-204 е по-скоро на супресор, който напр. инхибира експресията на онкогенните транскрипционни фактори. С напредването на злокачествения процес обаче този контрол се губи и миРНК-204 се превръща по-скоро в онкоген (напр. инхибира експресията на E-cadherin). Според мен способността на миРНКите да повлияват трансляцията на много иРНК едновременно прави за тях тясна рамката „супресор-онкоген“. По-важен е ефектът на миРНК-204 върху конкретни генни продукти в конкретен генетичен контекст (в норма и патология). Макар че човешкият геном е секвениран, към настоящия момент не са известни продуктите на всички човешки гени и техните функционални взаимоотношения в нормалните клетъчни фенотипи. Това прави още по-трудно охарактеризирането на тези взаимоотношения в случаите на патологии. Ето защо мотото на дисертацията „I found it hard, it's hard to find. Oh well, whatever, nevermind“ е много уместно. Науката изживява екстензивен, но необходим етап на натрупване на данни и усилията на Красимира заслужават адмирации, тъй като поставят липсващи стрелки в генно-регулаторната мрежа на простатния карцином. Дискусията е премерена, предпазливо и умело направена в светлината на собствените резултати и литературни данни. Смятам, че структурирането на дискусията в отделни подточки би я направило „по-четима“. Приемам направените изводи и формулираните научни приноси от докторантката.

### **Препоръки, въпроси и забелжки**

1. В светлината на гореказаното, смятам че включването на нормална простатна клетъчна линия в изследванията, успоредно с четирите карциномни линии, би позволило съставянето на генно-регулаторна мрежа за нормалната простата.

Нейното съпоставяне с тази за карцином на простатата би улеснило интерпретирането на резултатите.

2. Проведените изследвания не позволяват да се отговори на въпроса кои от ефектите на миРНК-204 върху експресията на белтъчните фактори са директни и кои индиректни. Отправлям като препоръка за бъдещи изследвания провеждането на биоинформатични анализи, чрез които да се потърсят прицелни места за миРНК-204 в иРНКите, особено на онези белтъчни фактори, които се повлияват отрицателно от свръх-експресията на миРНК-204 като например ETS1 и cMYB.
3. Експресията на миРНК-204 в нормална простатна тъкан е слаба, слаба е и експресията на тази миРНК в клетъчните линии, които не са носители на онкофузията TMPRSS2-ERG (добра прогноза) в сравнение с нейните носители (лоша прогноза). Освен това е известно, че някои миРНКи се откриват в кръвната циркулация като резултат от пасивни (клетъчна смърт) или активни (секреция) процеси. Въпрос: Провеждани ли са целенасочени изследвания за откриване на миРНК-204 в серуми от пациенти с простатен карцином и ако не, целесъобразно ли е според докторантката провеждането на подобни изследвания?
4. Как могат да се обяснят разнопосочните данни от протеомните анализи чрез 2D-електрофореза и мас-спектрометрия? Съгласно първия анализ по-голямо по степен различие в белтъчния профил след трансфекция с миРНК-204 се установява за PC3-клетките, а съгласно вторият – за LNCaP-клетките.
5. Съкращението RT-qPCR се използва в случаите, когато полимеразната верижна реакция се предшества от превръщането на РНК в кДНК чрез обратна транскриптаза (RT, reverse transcriptase). Използването на това съкращение е неправомерно в случаите на директна амплификация на ДНК, напр. когато се изследва степента на метилиране на някои промотори (Фиг. 34, автореферат).
6. В методите на стр. 79 е посочено, че белтъчната концентрация 0.210 mg/ml отговаря на 210 ng белтък в 1 µl. Според мен, тя отговаря на 210 ng белтък в 1 µl.

#### **Наукометрични показатели свързани с дисертацията**

Резултатите от изследванията, включени в дисертацията, са отразени в 14 публикации с общ имакт-фактор (ИФ) 11.476 (изискуем минимум ИФ 10) и са представени на 11 научни форуми с общ ИФ от резюметата 12.033. В публикуваните трудове ясно се вижда личният пронос на докторантката. Тя е водещ (първи или последен) автор в 9 от 14 статии. Подадена е заявка за български патент, в който доц. К. Тодорова-Хайрабедян е първи автор. Общият брой цитати от всички трудове на докторантката до момента е 65 при изискван минимум от 100 цитата, съгласно допълнителните (препоръчителни) изисквания на ИБИР-БАН за дпускане до защита. Като се има предвид, че статията с най-висок ИФ 4.77 е публикувана през тази година, очаквам цитиранията на доц. Тодорова-Хайрабедян бързо да покрият и този норматив в близките години. Резултатите, включени в дисертацията, са получени във връзка с разработването на един научно-изследователски проект (финансиран от ФНИ), ръководен от докторантката и на 3

проекта, в които тя е била участник (единият финансиран от ЕСФ по ОП „Развитие на човешките ресурси и два от МУ-Плевен).

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Доц. Красимира Тодорова-Хайрабедян ни представя един ерудиран научен труд с безспорен принос към фундаменталната наука и клинична практика. Тя е изграден изследовател, способен самостоятелно да организира и ръководи научни изследвания със значим характер. Нейният дисертационен труд е намерил адекватно популяризиране в научните среди, отговарящо на изискванията на ЗРАСРБ и на почти всички допълнителни и препоръчителни критерии на ИБИР-БАН. Ето защо категоричното ми становище е, че Научното Жури по настоящата процедура има всички основания да даде своя положителен вот за присъждането на научната степен „Доктор на науките“ на доц. Красимира Олегова Тодорова-Хайрабедян.

10 август, 2015 г.



проф. Р. Миронова