

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „доктор”

Автор на дисертационния труд: Светла Георгиева Ангелова, главен асистент, докторант на самостоятелна подготовка в секция Молекулярна генетика, Институт по физиология на растенията и генетика /ИФРГ/ - БАН

Тема на дисертационния труд: Мутационен статус и профил на епигенетично промоторно метилиране в ATM и SNEK2 гените при български пациенти с рак на млечната жлеза. Антитуморна активност на българското лечебно растение *Tribulus terrestris* L.

Рецензент: проф. д-р Любомир Стоилов, завеждащ секция Молекулярна генетика, ИФРГ- БАН

Дисертационният труд на гл. ас. Светла Ангелова обхваща 190 страници, включващи 19 таблици, 50 фигури и библиография. Дисертацията е изградена по класическата схема - увод, литературен обзор, цели и задачи, материали и методи, резултати, обсъждане и литература, включваща 523 литературни източника, от които 3 на кирилица и 520 на латиница. Въз основа на получените резултати са формулирани 6 основни извода, както и два научни приноса. Списъкът на научните публикации във връзка с дисертационния труд включва 3 публикации с импакт фактор в авторитетни международни списания, 2 участия в национални научни форуми с доклади, публикувани в пълен текст, както и 6 участия в национални научни форуми с постери, доклади и резюмета.

Тематично дисертацията се отнася към една от най-актуалните и бързо развиващи се области на съвременните канцерогенетични изследвания, касаещи молекулярните механизми на генетичния контрол на рака на млечната жлеза (РМЖ) и по-специално значението и ролята на прото-онкогените и туморно-супресорните гени като молекулни маркери за етиологията, прогностиката и лечението на това социално-значимо както за България, така и за света заболяване. Ракът на млечната жлеза е най-често срещания инвазивен тумор при жените, причиняващ повече от 400 000 смъртни случая годишно в световен мащаб. Както и при другите тумори, тази болест има комплексен характер и хетерогенни генетични и биохимични основи, като засега е трудно да се дефинира един единствен геномен или метаболитен ключов фактор за

нейното формиране и прогресия. По отношение на генетичния контрол на заболяването, съвременните изследвания са концентрирани върху група от туморно-супресорни гени като P53, BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2 и прото-онкогени като PIC3CA и HER2, за които се приема, че са тясно асоциирани с РМЖ, което отразява предполагаемият полигенен характер на заболяването. В тази връзка анализът на мутационния статус и профила на метилиране на два от ключовите гени от тази група - ATM и CHEK2 с ключова роля в клетъчната сигнална трансдукция като есенциална част на дисертационния труд, насочена към изясняване на генетичния и епигенетичния контрол на РМЖ - е с неоспорима актуалност и значимост, както за теорията на онкогенетичните изследвания, така и за диагностиката, прогностиката и терапията на това заболяване. С възможностите за терапия на РМЖ е тясно свързан и разделът от дисертационния труд, посветен на анализ на антитуморната активност *in vitro* на екстракти от лечебното растение *Tribulus terrestris* L. при култивирани клетки от линия РМЖ.

Литературният обзор с обем от 50 страници заема около една трета от цялата дисертация. В него са анализирани последователно и аналитично природата на неопластичната трансформация, ролята на протоонкогените и туморно-супресорните гени в този процес и епигенетичните механизми на канцерогенезата. Представена е изчерпателна характеристика на РМЖ, като е акцентирано върху класификацията, прогностичните фактори, терапията и генетичния и епигенетичен контрол на заболяването. В контекста на дисертационния труд е логичен направения преглед на съвременните данни относно структурно-функционалната характеристика на гените ATM и CHEK2, връзките и зависимостите на мутационния и епигенетичния им статус с РМЖ, както и данните за антитуморния потенциал на лечебното растение *Tribulus terrestris* L. Подробно са анализирани епидемиологията, рисковите фактори и терапията на РМЖ, като трябва да се отбележи компетентното и умело боравене не само с молекулярно-генетичните, но и с медико-биологичните характеристики на заболяването, което е рядко срещано и значимо достойнство на разработката с такава насоченост. Цитираната литература е в по-голямата си част след 2000 г., като силно впечатление прави критичният преглед на първоизточниците, показващ освен задълбочено познаване на проблема, и изявената способност на дисертантката за синтетичен анализ на данните и генериране на нови идеи. Литературният обзор е обогатен със значителен брой фигури и схеми, някои от които авторски, което съществено улеснява възприемането на фактологията. Въз основа на този анализ

дисертантката е формулирала две основни работни хипотези, визиращи ангажираността на туморно-супресорните гени в етиологията на РМЖ и предполагаемата корелативна зависимост между метилационният статус на тези гени и клиничко-патологичните и молекулярно-генетични характеристики на болните. По отношение на антитуморната терапия се предполага селективна антитуморна активност на билката *Tribulus terrestris* L. Целите на изследването представляват естествено следствие от тези хипотези и са насочени към i. анализ на честотата и спектъра на генетичните изменения и статуса на метилиране в промотора на туморно супресорните гени *ATM* и *CHEK2* при български пациенти с РМЖ, ii. прогностичното значение на *ATM* и *CHEK2* гените за това заболяване iii. оценка на антитуморната активност на българското лечебно растение *Tribulus terrestris* L. при линия РМЖ клетки MCF-7. Поставените конкретни експериментални задачи са формулирани адекватно на целите на дисертационния труд.

Методологичният арсенал, използван в дисертацията е представен чрез систематична характеристика на експерименталния материал и методологията, използвана при молекулярно-генетичните анализи и оценката на антитуморната активност на *Tribulus terrestris*. Прави впечатление богатият набор от съвременни молекулярно-биологични и генетични подходи като клетъчно култивиране, изолиране на плазмидна и геномна ДНК, полимеразна верижна реакция (PCR) и пречистване на амплификационните продукти, SSCP-анализ в комбинация с предхождащ PCR и секвенционен анализ, бисулфитно модифициране на ДНК и метилационно-чувствителен PCR, молекулно клониране, агарозна и полиакриламидна гел електрофореза, флуоресцентна микроскопия, оценка на клетъчната преживяемост и апоптозата. Подборът и приложението на методичните подходи са изцяло адекватни на поставените експериментални цели и изследователски задачи, а обширният им спектър и прецизното изпълнение е доказателство за високото методологично ниво на дисертацията. Към този раздел, а и към дисертацията като цяло, бих отправил препоръка за редукция на някои директни терминологични заемки от английски език, като част от транслитерациите имат нужда от прецизиране, например „инсърт” или превода на SSCP-анализа в списъка на съкращенията. Някои от описаните експериментални протоколи страдат от известен схематизъм, който за дисертационен труд би трябвало да се избягва, например методологията за изолиране на ДНК от различни източници, а от представената информация не е ясен произходът на праймерните комбинации, използвани за анализ на мутационния профил на *ATM* гена - дали са подбрани по литературни данни или са собствен дизайн.

Изследването е проведено върху материал, изолиран от случайно подбрана представителна извадка от 145 пациенти със спорадична форма на РМЖ, претърпели оперативна интервенция. Скринингът на мутационния статус на АТМ и СНЕК2 гените е проведен посредством PCR-SSCP методологията, последвана от секвенционен анализ на детектираните ДНК полиморфизми.

АТМ генът кодира протеин-киназа със значима роля при активирането на клетъчния отговор към двойно-верижни ДНК скъсвания посредством последващо фосфорилиране на ключови туморно-супресорни гени като p53, СНЕК2 и H2AX. Продуктът на гена е въввлечен в разпознаването на увредените ДНК вериги и активира репаративните механизми, отговорни за фиксирането им. Редица изследвания показват асоцииране на някои специфични АТМ варианти с риска от РМЖ, но степента на това асоцииране и спектърът на патогенните му варианти остават все още нерешен въпрос.

Анализът на АТМ показва наличието на аберантни ДНК фрагменти при 11 от изследваните пациенти, локализирани в екзони 15 и 19, с честота съответно 2 и 9 установени полиморфизма. Секвенционният анализ е потвърдил наличието на базови замени, водещи до промяна в аминокиселинния състав на продукта на АТМ-гена, или мис-сенс мутации. При екзон 15 мутацията се изразява в замяната на тимин в позиция 2119 в рамките на кодон 707 с цитозин, водеща до замяна на серин с пролин. Анализът на екзон 39 показва наличието на идентични базови замени G-A при 5 от пациентите в позиция 5557 от кодон 1853, водещ до субституция на аспарагиновата киселина с аспартат. Останалите 4 мис-сенс мутации в този екзон освен описаната базова замяна показват и вариабилност в интрон 39. Извършената комплексна оценка на връзката на установения мутационен статус на АТМ гена с клинично-патологичните и молекулярно-генетични характеристики на РМЖ-пациентите показва статистически значима корелация със степента на малигненост на туморите. По отношение на общатата преживяемост и риска за летален изход е отчетено статистически незначимо понижаване на процента на преживяемост при носителите на АТМ мутация. Данните от метилационно-специфичния анализ на промоторната област на АТМ гена показват, че няма връзка между статуса на метилиране и функционалната му активност при скринираната извадка болни от РМЖ.

Туморно-супресорният ген СНЕК2 е другата протеинкиназа, обект на изследване в дисертацията, която е тясно-асоциирана с клетъчния отговор спрямо ДНК повреди. При активирането на гена, кодираният от него протеин инхибира CDC25C фосфатазата, възпрепятствайки навлизането на клетките в митоза. Освен това той

стабилизира туморно-супресорния протеин p53, което води до блокиране на клетъчния цикъл в G1 и фосфорилира гена BRCA1, водещо до възстановяване на преживяемостта на клетките след увреждане на ДНК.

Оптимизираните експериментални условия на PCR-SSCP анализа по отношение на 14-те екзона на CHEK2 гена са позволили достоверен анализ на мутационния му профил в изследваната популация. Данните от секвенирането показват наличие на 14 несинонимни базови замени в екзони 1б, 12 и 13, като за екзон 12 са характерни 2 случая на мис-сенс мутации от типа С-Т в позиция 1427 от кодон 476, водеща до замяна на треонина с метионин, а базовата субституция в позиция 1520 на гуанина с цитозин води и до промяна в аминокиселинния състав на CHEK2 пептида в кодон 507 от аланин в глицин. Трябва да се подчертае, че детектираната мутация в кодон 476 досега не е идентифицирана при нито един от видовете рак при човека. Уникален характер има и установената, макар и с ниска честота в екзон 1б на CHEK2 гена, silent мутация GLU79GLU, която също досега не е асоциирана със злокачествена трансформация. Несинонимната замяна в екзон 13 също липсва в съответната база данни. Оценката на клиничния потенциал на мутантния CHEK2 статус показва, че статистически значима зависимост има само по отношение на хистологичния тип на карцинома, като се наблюдава и снижаване на общата преживяемост. Както и при АТМ, профилът на метилиране на промоторната област на CHEK2 при туморните и контролните проби остава постоянна величина.

Значимо място в експериментално отношение заемат и изследванията на антитуморния потенциал на тоталния екстракт и сапониновата фракция от българското лечебно растение *Tribulus terrestris* L. върху раковата клетъчна линия MCF-7. Тази клетъчна линия е много подходящ модел за изследвания на рака на млечната жлеза *in vitro*, тъй като запазва някои от характеристиките на диференцирания епител на млечните жлези, включително процесването на естроген чрез съответните рецептори в цитоплазмата. Получените резултати показват, че водно-алкохолният екстракт на *Tribulus terrestris* L. притежава изразен дозово-зависим ефект върху преживяемостта на клетките от линия MCF-7, докато при контролната линия тази тенденция липсва, като прилагането на пречистената сапонинова фракция от екстракта води до още по-ясно изразен антитуморен ефект. Що се отнася до данните от анализа на апоптотичния потенциал на тоталния екстракт и сапониновата фракция, характерната за апоптозата фрагментация на ДНК е по-ясно изразена при туморната линия. Тези данни се потвърждават и от флуоресцентно-микроскопските изследвания, визуализиращи

пропорционално нарастване на честотата на туморните клетки с апоптотична морфология в различна фаза след третиране с екстракта. Като цяло илюстративният материал е с високо качество, но с някои пропуски при информативността на някои от фигурите, касаеща например молекулната маса на амплификационните продукти.

Получените в дисертационния труд резултати имат на първо място значим принос за теорията на канцерогенетичните механизми, обуславящи РМЖ. Проучена е ролята на два сравнително малко-изследвани туморно-супресорни гени АТМ и СНЕК2 за етиологията на това заболяване, като данните относно мутационния им профил и статуса на промоторно метилиране са пионерни за българската популация, което е един от основните приноси на дисертацията. Установената мутационна честота в АТМ е характерна и за други проучвани популации, докато мутационният спектър на СНЕК2 включва три нерегистрирани досега мутации с голям прогностичен потенциал. В контекста на противоречивите литературни данни относно ролята на аберантното промоторно метилиране като епигеничен фактор за инактивирането на туморно-супресорните гени, липсата на такъв феномен и при двата изследвани туморно-супресорни гена логично дава основание на дисертантката да предположи ограничена роля на такова метилиране в патогенезата на РМЖ и превес на генетичните механизми. Въпреки, че този проблем е дискутиран в дисертацията, бих искал да поставя отново въпроса как дисертантката оценява относителната роля и значението на генетичните и епигенетични фактори за етиологията на РМЖ и канцерогенезата като цяло.

Друго значимо достойнство на дисертацията е съвместяването на молекулярно-генетичната характеристика на двата изследвани гена с клиничните показатели, преживяемостта и риска от летален изход при българската популация болни от РМЖ. Установената корелация с някои от класическите клиничко-патологични показатели има неоспорим прогностичен потенциал и е основа за бъдещи още по-мощни изследвания. Не на последно място бих искал да отбележа също, че получените в дисертацията данни относно антитуморната активност на лечебното растение *Tribulus terrestris* L. е принос в едно от актуалните направления на съвременната антитуморна терапия, базираща се на очаквания цитотоксичен и антипролиферативен потенциал на фармакологично-активни природни продукти и лечебни растения. Всичко това ми дава основание да оценя високо приносите на дисертацията за теорията и практиката на канцерогенезата и по-конкретно за диагностиката и терапията на един такъв значим медико-социален проблем като РМЖ. В тази връзка съм принципно съгласен и с основните изводи и приноси, формулирани в дисертацията. Прочитът на публикациите

във връзка с дисертационния труд - три статии в международни списания с общ IF над 4, получили добра цитируемост в престижни чуждестранни издания в областта на канцерогенеза, в които С. Ангелова е първи или водещ автор, значителният брой доклади и постери са доказателство, както за неоспоримия личен принос на дисертантката, така и за международното признание на получените резултати. Запознат съм с автореферата на дисертацията, който е изготвен съгласно изискванията и отразява най-важните научни и научно-приложни приноси.

Заключение:

Представената дисертационна разработка отговаря напълно на изискванията на ЗРАСРБ и на Правилника за приложението му, както и на изискванията и критериите на съответните правилници на БАН и ИФРГ. Въз основа на изложеното във връзка с дисертацията, както и нейният иновативен, приносен и перспективен характер за онкологичната теория и практика, убедено препоръчвам на Уважаемото Научно жури да присъди научната и образователна степен „Доктор” на гл. ас. Светла Ангелова, професионално направление „Биологични науки” ш. 4.3., научна специалност „Генетика”.

12.11.2012г.

/Проф. д-р Л. Стоилов/