

РЕЦЕНЗИЯ

Върху дисертационен труд за придобиване на образователната и научната степен Доктор по професионалното направление 4.3. Биологически науки на Георги Георгиев Антов от ИФРГ на БАН на тема **„Мутационен скрининг на гените BRCA1, BRCA2 и STK11 при пациенти от българска популация с рак на млечната жлеза“**

Рецензент: проф., дбн Севдалин Георгиев, Катедра Генетика на СУ „Св. Кл. Охридски“, гр. София -пенсионер: e’mail georgievs@biofac.uni-sofia.bg

Биографични данни

Георги Георгиев Антов е роден на 26.07.1981г., в гр. София. През 2009 година завършва висшето си образование в Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“, като молекулярен биолог. От месец януари 2009г., е на работа в Института по Генетика на БАН като биолог, а по-късно е докторант. От месец февруари 2016г., асистент в ИФРГ на БАН, секция Молекулярна Генетика.

Злокачествените заболявания са социално-значими заболявания, които се характеризират със значителна хетерогенност и сложна многофакторна етиология. Проучване на генетичните изменения при злокачествените заболявания напоследък се развиват интензивно на различни нива – организмово, клетъчно, биохимично и молекулно. Определено се счита, че ракът се развива в резултат на динамично акумулиране на мутации в човешкия геном. През 1990г., бе идентифициран първия ген асоцииран с рак на гърдата BRCA1, локализиран в хромозома 17q21. Този ген съдържа 24 екзона и са отбелязани повече от 600 мутации, които се унаследяват по автозомно-доминантен тип. През 1994г., бе открит друг един ген BRCA2 с локализация в 13q12.3 и 27 екзона и повече от 450 мутации, които се унаследяват също по автозомно-доминантен тип. Ето защо в докторската дисертация на Георги Антов, се поставя един изключително актуален и важен проблем свързан с откриването на нови мутации обуславящи това тежко заболяване РМЖ. Както отбелязва докторантът, определянето на индивидуалната роля на всяка една мутация представлява сериозно предизвикателство. До момента изследванията на раковите заболявания, са фокусирани предимно върху мутациите, които

променят кодиращите последователности, макар че, те са около 2% от човешкия геном. Ракът на млечната жлеза /РМЖ/ е една от честите форми на злокачествени заболявания и е сред водещите причини за смъртност сред жените, както в световен мащаб, така и за България. По данни на „Националния раков регистър“ за 2013 година, броят на новодиагностицираните пациенти с РМЖ възлиза на 3997, а на смъртните -1274.

През последните години със секвенирането на човешкия геном се даде силен тласък за идентифицирането на генетичните варианти свързани с етиологията на раковите заболявания. В дисертационния труд докторанта си поставя като цел идентифицирането на генетичните варианти в неизследваната българската популация, които предразполагат към развитието на това тежко раково заболяване /РМЖ/.

Целта и задачите са ясни и много добре формулирани. Докторантът използва богат арсенал от съвременни методи: екзомно секвениране на BRCA1 и BRCA2 на Illumina MiSTK11 платформа, PCR за STK11, Секвениране по Сангер на STK11, Топене с висока разрешителна способност (HRM), Биоинформатичен (In Silico) анализ.

Добрия стил и метод на изложение на фактите на докторанта, личи и при анализране, съпоставяне на данните и установяване на контраверзни резултати от предишни изследвания, което му дава основание за по-нататъшно провеждане на задълбочени изследвания. От детайлния литературен обзор става ясно, че етиологията на това тежко заболяване все още не е изцяло изяснена. Основна роля за развитието на това заболяване играят наследствените фактори и такива на средата. Идентифицирането на гените отговорни за развитието на заболяването се явява от първостепенна важност за постигане на една по-точна диагностика и по-ефективно лечение, както и за разширяване на клиничните аспекти на това заболяване, но не-по малко значение напоследък се оказва, че имат и натрупването на мутационни изменения в генома.

Дисертационният труд е написан на 233 страници и структурно е построен по традиционно възприетата схема: въведение 2 стр., литературен обзор 34 стр., цел и задачи 1 стр., материал и методи 21 стр., резултати 110 стр., обсъждане 16 стр., заключение 2 стр. изводи 1 стр., приноси 1стр., 67 фигури и 36 таблици. Уеб Базирани Източници и Софтуерни Приложения 4стр.

Литературната справка включва 218 заглавия всички на латиница

по-голямата част от които са публикувани през последните 10 години в реномирани чуждестранни издания. **Като цяло, тази част от дисертацията заслужава много висока оценка.** Тук проличава умението на докторанта при боравенето със специалната терминология, стреми се критично да анализира данните от литературата, да представя и публикации с контраверзни резултати с което обуславя необходимостта от по-нататъшно провеждане на задълбочени изследвания. От детайлния литературен обзор става ясно, че етиологията на това тежко заболяване не е напълно изяснена. Основна роля за развитието на това заболяване играят наследствените фактори и такива на средата.

Като клиничен материал са изследвани **24** пациентки /средна възраст 35+10/ с фамилен РМЖ, кръвни проби от **71** клинично здрави лица които се явяват като отрицателна контрола, **73** жени със спорадичен рак на млечната жлеза на възраст между 29 и 78 години, провели хирургично лечение в Мамологично отделение в СБАЛО гр. София. Кръвни проби от **22** пациента със спорадичен РМЖ са използвани като контроли. За всички пациенти е поискано информирано съгласие.

Следващите два раздела се отнасят до резултати и обсъждане. В тези два раздела докторантът получава много ценна информация относно етиологията и факторите, които обуславят РМЖ в българската популация. Г. Антов критично анализира и съпоставя получените от него резултати с тези на други автори. Основният акцент, който докторанта поставя е свързан с Молекулярно-генетичния анализ относно наличието на мутационни изменения в двата основни гена **-BRCA1 и BRCA2.**

Генетичните промени в гените BRAC1 и BRAC2, са свързани с приблизително 15-20% от фамилените случаи на рак на млечната жлеза /РМЖ/. Голяма част от генетичните варианти, приблизително 70% за BRAC1 и 90% за BRAC2, са представени от еднонуклеотидни **инсерции, делеции, нонсенс и миссенс** промени. В по-малка степен промените в BRAC гените е свързана с големи пренареждания , **делеции и дупликации на повече от 500 килобази.**

С цел получаване на нови данни относно броя и честотата на генетичните варианти при лица с фамилен рак на млечната жлеза и клинично здрави лица без фамилен обремененост от българската популация, докторантът умело въвежда метода на за таргетното секвениране от ново поколение (NOS), извършен на Illumina

платформа. NOS стартира с молекулярно-генетичния анализ на гените BRCA1 и BRCA2 при 24 пациентки с фамилен РМЖ и 71 в клинично здрави лица без фамилна обремененост. Резултатите получени от докторанте, ясно показват висока възпроизводимост по отношение на обема и качеството на генерираните секвенции. От установените 104 BRCA1/2 варианта с различна клинична значимост, 47 варианта са установени при BRCA1 гена /29.8% екзоните, 53.2% в интроните и 17.02% в 3' и 5' UTR/, 57 в BRCA2 (40.35% в екзоните, 22.8% в интроните и 31.6% в 3' и 5'UTR, както и 5.3% изменения намиращи се извън рамките на гена.

Въвеждането на Биоинформатичния (In silico) анализ и класификацията на вариантите на BRCA1 BRCA2 при пациенти с фамилен РМЖ и техните кнтроли, значително разширяват възможностите за подобряване на диагнозата, прогнозата и персонализиране на терапията на раковите заболявания в България.

В резултат на анализите които прави докторанта, се установяват три варианта с патологичен ефект: един при пациент с фамилен РМЖ /4.2%/ и два варианта в ДНК проби на клинично здрави лица /2.8%/.

Установената патологична транзция на Г в А, във втория интрон на BRCA2 при пациент с фамилен РМЖ, дава основание на докторанта да предприеме биоинформатичен анализ чрез HSF (Human Splicing Finder), с цел изясняване ролята на транзцията върху протичането на нормалния сплайсинг на този ген. В резултат на проведеня анализ докторантът установява загуба на стартовия кодон (ATG) в екзон 2 на BRAC2, както и скъсяване на N-терминалния край на BRAC2 с 123 аминокиселини, в сравнение с дивия тип. Към тази група с патогенен ефект, се отнася и една твърде интересна транзция на Г в А в интрон 21 на BRCA2. Тук отново чрез HSF анализ докторанта се натъква на едно интересно от фундаментален аспект явление на т.н., **"exon extended"**, когато от интрон 21, 46 нуклеотида се задържат между екзон 21 и екзон 22. Това води до преждевременно формиране на стоп кодон в позиция chr13:32950938-32950940 и отпадане на 499 аминокиселинни остатъка от BRAC2. Получените резултати поради своя патологичен характер определено представляват интерес за клиничната практика, но трябва да подчертаем, че те имат потвърдителен характер тъй като са описани и от други автори преди това (Brandao et al., 2011; Colombo et al., 2013).

Наред с това докторанта установява четири вероятно патологични изменения в гените BRCA1/2 (с.5062_5064delGTT, с.302-29A>G в

BRCA1 и с.47A>T, с.9508 G>T в BRCA2) от които три са нови.

Една друга група варианти, която проучва докторанта е с вероятен патологичен характер и се отнасят до мутации които допринасят за възникването на конкретен тип заболяване. Подобна мутация е отбелязана при пациент с фамилен РМЖ /4.16%/ и тя е свързана с хетерозиготна делеция на валин (p.Vall688del) в екзон 17 на BRCA1 гена. И макар че, интерпретацията на ефекта както отбелязва докторанта е силно противоречив, той отива по-нататък към провеждане на *in silico* анализ, ProtParam и Swiss-model програмите, което показва че и двете структури – мутантаната и дивия тип са много близки по своите биофизични и биохимични параметри, макар че, формирането на комплекса на BRCA1/BACH1 най-вероятно, както отбелязва докторанта, възпрепятства репарацията на възникналите увреждания в ДНК. По рано италиански автори (Malacrida et al., 2008; De Nicolo et., 2009), също отбелязват патологичния ефект на BRCA1 делецията. Макар че тези резултати които получава докторанта, са с потвърдителен характер, те имат своето клинично предназначение за диагноза на рак на млечната жлеза и яйчниците за българската популация.

Към тази част на дисертацията имам следните въпроси: 1. Какво представляват изоформите могат ли да имат подобни, различни или антагонистични функции?, 2. В кои случаи можем да говорим за *cis* и за *trans* регулаторни фактори или *cis-acting protein*?, 3. Каква е функцията на т.н., адапторни протеини?

Нов за базата данни кодиращ вариант, се оказва, че е разположен в 26 екзон на BRAC2 гена. Този тип промени е наблюдаван единствено в пациенти с рак на млечната жлеза с честота 4.2%. Дисертанта установява чрез Swiss-model програмата, че тази промяна се дължи на трансверзия на Г в Т, която води до една мисенс мутация с замяна на аспарагиновата киселина (GAC) с тирозин (TAC).

Независимо от постигнатия напредък по отношение на молекулярните механизми стоящи в основата на раковите заболявания, трябва да отбележим, че този проблем като цяло не е решен. Секвенционния анализ от ново поколение Illumina NGS дава възможност на докторанта, да установи един друг често срещан полиморфен вариант разположен в 5'UTR на промоторния регион на BRAC2 гена. Интересен е и подхода, чрез RNAfold анализ които докторанта използва при проучването на вторичната структура и стабилността на 5'UTR, в резултат на което се установява пълна промяна във вторичната структура на мутантната 5'UTR BRAC1

форма на мРНК. Изменения са установени също така и в 3'UTR на BRAC1 гена. Тези данни са с потвърдителен характер.

Определен интерес представляват даните по отношение на проучване на мутационния скрининг на STK11 гена. Необходимо е да отбележим, че до този момент данните относно участието на този ген при проявлението на фамилната и спорадична форма на РМЖ, в литературата са силно ограничени, а за **България изобщо липсват**. След проведените молекулярно-генетични изследвания докторантът установява четири точкови мутации в STK11 при 7 от пациентите със спорадичен РМЖ. Две от установените изменения при пациенти със спорадичен РМЖ, са разположени в екзон 2 и 3 на STK11. И двете мутации са свързани със субституции на бази, като едната от тях А>Т, води до възникването на преждевременен стоп кодон – р.К108Stop. Тази мутация се описва за първи път литературата от докторанта. Както справедливо отбелязва докторантът, макар че в базата данни (COSMIC, VarSome и ECGene), това изменение е прието за патологично без функционална обосновка, очевидно са необходими по-нататъшни изследвания. Като цяло нито един от екзонните варианти, не беше установен в изследваната контролна група. Генетични изменения в STK11 на пациентите с фамилен рак на млечната жлеза не бяха установени.

В последните два раздела резултати и обсъждане, докторантът получава много ценна информация и резултати относно етиологията и факторите които обуславят РМЖ в българската популация, поради това моята оценка за тези раздели е много добра.

Нямам възражения относно достоверността на направените в дисертацията изводи, макар че биха могли да бъдат по-конкретни.

Научните достижения на дисертационния труд на Георги Антоу, могат да се резюмират в няколко основни приноса с оригинален характер:

>За първи път докторанта прави цялостен анализ чрез съвременни молекулярно-генетични методи /ДНК секвенционен анализ така наречения „златен стандарт“ от ново поколение Illumina NGS, HRM-топене с висока разрешителна способност/ на двата гена BRCA1/2 при пациенти с фамилен РМЖ.

>За първи път е анализиран генетичния статус и е установена мутационната честота на гена STK11 при пациенти с фамилен и спорадичен РМЖ в част от българската популация.

>Установения нисък процент /1,37%/ патологични мутации в

STK11 гена предполага недостатъчна ангажираност в патогенезата на РМЖ.

>С въвеждането на Биоинформатичен (InSilico) анализ и класификацията на BRCA1/2 при пациенти фамилен РМЖ и техните контроли, значително се разширяват възможностите за подобряване на диагнозата, прогнозата и персонализираната терапия на раковите заболявания в България.

> Към фундаменталните приноси бихме могли да отнесем и т.н., “exon extended” случаи които води до преждевременно формиране на стоп кодон в BRCA2 гена.

По съществените резултати от дисертационните изследвания са представени в 2 статии. Едната е публикувана в международно списание Mol Clin Oncol., 2014, и Genetika, 2017. Във връзка с дисертационния труд, са забелязани 7 цитирания от чужди автори.

Докторантът е взел участие в 6 научни форуми, 3 от които в чужбина – Гърция, Испания и САЩ и 3 в България. Взел е участие в 1 проект в България.

Редакционното и техническо оформление на дисертационния труд на Георги Анто е извършено на високо ниво с качествени фигури и таблици.

Все пак ще си позволя да отбележа и някои пропуски и неточности: макар и не често докторанта използва думи които не са типично български като: детектиране, стадиране, локатор на BRCA1/2 /стр. 72/, думи с не ясно съдържание като дълбок интронен вариант /стр. 130/, сумоилация /стр. 70/. На стр. 92, фиг. 29 се нуждае от корекция в текста.

Приложеният към документацията проект за автореферат, е подготвен съгласно изискванията и отразява обективно структура и съдържание на дисертационния труд.

Заклучение: въз основа на представените в рецензията анализи, оценката на дисертационния труд по отношение на актуалността на тематиката, съвременните методи, научната значимост на получените резултати с фундаментално и клинично значение, считам, че дисертационния труд напълно отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България. Към тези аргументи трябва да изтъкнем и факта, че в процеса на обучението докторанта е изграден специалист, способен да решава самостоятелно на съвременно научно равнище проблемите на

молекулярната генетика. Ето защо убедено ще препоръчам на уважаемото Научно жури да гласува за присъждането на образователната и научната степен „ДОКТОР“ по професионалното направление 4.3 Биологически науки, на **Георги Георгиев Антов**.

27. 11.2017г.

Гр. София

Рецензент:

/проф. дбн С. Георгиев/