

СТАНОВИЩЕ

на доц. д-р Анастас Господинов,

Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, БАН

върху дисертационния труд

„Синергично индуциране на секреция на извънклетъчни везикули и ДНК от автофагични инхибитори и ДНК-увреждащи агенти“, представен за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ от Александър Емилов Александров, докторант в секция „Регулация на генната активност“ при Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, БАН, в научно направление 4.3. Биологични науки.

Представената ми за становище дисертация е с автор Александър Емилов Александров и е изготвена под научното ръководство на доц. д-р Димитър Илиев.

Дисертацията е с обем общо 71 страници и цитира 99 източника, всички на английски език. Трудът е написан по обичайната схема като целта и задачите са изведени най-напред. Литературният обзор е 13 страници, „Материали и методи“ – 5 страници, „Резултати“ от 26 страници и „Дискусия“ от 8 страници. Онагледен е с общо 25 фигури.

Мултиформеният глиобластом остава сред най-трудните за лечение злокачествени заболявания, а резистентността към темозоломид е основната пречка пред терапията му. През последните години извънклетъчните везикули се очертават като важен фактор в туморната биология – те участват в междуклетъчната комуникация и в изграждането на лекарствена резистентност, поради което все по-често се разглеждат като диагностични маркери. Деградиративната автофагия и секрецията на извънклетъчни везикули представляват функционално свързани и до известна степен алтернативни механизми за поддържане на клетъчната хомеостаза. Кръстопът между двата пътя са амфизомите – хибридни органели, образувани при сливането на автофагозоми с мултивезикуларни тела, които могат да бъдат насочени или към лизозомно разграждане, или към сливане с плазмената мембрана и освобождаване на съдържанието им. Поради това блокирането на късната автофагия може да пренасочи натрупващия се клетъчен товар към секреторен път и да увеличи освобождаването на ИКВ и извънклетъчни нуклеинови киселини. Точно този слабо проучен баланс между вътреклетъчното разграждане и извънклетъчното елиминиране (на клетъчен материал) стои в основата на дисертацията, което определя нейната актуалност и практическа стойност.

Целта и задачите са поставени в самото начало на текста, което според мен е предимство. Те са формулирани ясно и конкретно.

Литературният обзор е изграден логично и води читателя от общите свойства на извънклетъчните везикули, през автофагията и взаимовръзката между двата процеса, до мултиформения глиобластом и АТМ киназата. Подбрани са именно темите, необходими за разбирането на експерименталната част, като обзорът не се разлива в излишни

подробности. Стегнатото и вярно изложение представя автора като добре подготвен в теоретично отношение специалист, способен да отсява важното.

Главата „Материали и методи“ е написана прецизно. Авторът владее широк набор от съвременни техники – диференциално центрофугиране и PEG преципитация за изолиране на везикули, имуноблотинг и дот блот, определяне на размерното разпределение чрез динамично разсейване на светлина, флуоресцентна и конфокална микроскопия, проточна цитометрия, алкален кометен анализ. Добро впечатление прави съчетаването на методи от различни области, от класическата клетъчна биология до биофизичните измервания на размера на частиците, което позволява един и същ въпрос да бъде атакуван от няколко независими страни. Включването на подходящи контроли, като проследяването на митохондриалния маркер цитохром C1 за чистотата на пробите, показва зрелия експериментален подход на дисертанта.

Експерименталната логика на работата може да бъде обобщена в две последователни линии. В първата са използвани глиобластомните линии U87-MG, които са чувствителни към темозоломид и не експресират MGMT, и U138-MG, които експресират MGMT и са резистентни към темозоломид. Най-напред е оценена цитотоксичността на темозоломид и хлорохин самостоятелно и в комбинация. При избраните условия хлорохинът сенсibiliзира резистентните U138-MG клетки към темозоломид, но не повишава съществено цитотоксичността му при U87-MG. След това са изолирани големи и малки извънклетъчни везикули и е анализиран техният състав. Комбинацията темозоломид–хлорохин увеличава секрецията на фракции, съдържащи автофагичните маркери LC3B-II и p62, маркерите на извънклетъчни везикули CD63, syntenin-1 и ALIX, както и caveolin-1. Размерите на изолираните частици са изследвани чрез динамично разсейване на светлина. Микроскопските анализи показват натрупване на LC3B в CD63-позитивни амфизомни/автолизозомни структури и колокализация на LC3B с caveolin-1, което подкрепя наличието на пресечна точка между автофагичния и ендозомния път. Увеличаването на секрецията при третиране с хлорохин е проверено с друг инхибитор на късната автофагия - бафиломицин A1 и друг ДНК увреждащ агент - етопозид. Брефелдин А е включен като цитотоксична контрола; при сходна степен на клетъчна смърт Brefeldin A не предизвиква сравнимо повишаване на автофагичните и везикуларните маркери във фракцията на ИКВ. Заедно с отсъствието на митохондриалния маркер CYC-1 в изследваните ИКВ фракции това подкрепя, че наблюдаваният ефект не е резултат от пасивно освобождаване на клетъчни отломки. Допълнително е показано, че хлорохинът усилва предизвикания от темозоломид γ H2AX отговор, без кометният анализ да установи съответно увеличение на общото количество ДНК увреждания.

Втората експериментална линия изследва връзката между АТМ сигнализацията, автофагията и секрецията на ИКВ в HeLa Kyoto клетки. Инхибиторите KU-60019 и KU-55933 инхибират киназата АТМ и предизвикват натрупване на LC3B-II и p62. KU-60019

води и до натрупване и уголемяване на LAMP1-позитивни лизозоми при липса на серум, а използваната концентрация 5 μ M не намалява значимо клетъчната преживяемост при същите условия. Самостоятелното третиране с KU-60019 или KU-55933 индуцира секреция на малки и големи ИКВ, съдържащи LC3B-II и p62, както и CD63 и syntenin-1, без установим СУС-1. Следователно ДНК-увреждащ агент не е необходим за самото повишаване на секрецията. Добавянето на етопозид синергично увеличава индуцираната от KU-60019 секреция на големи и малки ИКВ и на извънклетъчна ДНК. В последната серия експерименти етопозидът намалява натрупването на p62, предизвикано от KU-60019, а KU-60019 намалява убиквитинирането на γ H2AX. Тези данни очертават функционална връзка между АТМ, автофагичния поток, ДНК репарацията и секреторните процеси. Съществен принос на работата е демонстрирането на капацитета на АТМ инхибиторите да индуцират секреция на ИКВ и на усилването на този ефект от генотоксичен стрес.

Дискусията е написана компетентно, като получените резултати са обсъдени в светлината на публикуваното в литературата до момента.

В дисертацията са формулирани десет извода, които съответстват на експерименталните данни, но ключовите заключения могат да бъдат сведени до следното: Инхибирането на деградативната автофагия повишава секрецията на ИКВ и извънклетъчни нуклеинови киселини, а ДНК-увреждащите агенти допълнително усилват този ефект. Наблюдението се възпроизвежда с различни комбинации — TMZ с хлорохин или Vafilomycin A1 и етопозид — което подкрепя общ механизъм, а не специфичен ефект на отделен реагент. Натрупването на LC3B-II и p62, както и локализацията на LC3B в CD63-позитивни структури, показват функционална връзка между автофагичния и ендозомно-везикуларния трафик. Данните подкрепят модел, при който нарушената лизозомна деградация пренасочва част от клетъчния товар към секреторни пътища. АТМ инхибиторите KU-60019 и KU-55933 самостоятелно нарушават късните етапи на автофагията и индуцират секреция на малки и големи ИКВ. Етопозидът допълнително усилва секрецията на ИКВ и извънклетъчна ДНК, което очертава функционална връзка между АТМ сигнализацията, автофагията и клетъчния отговор към ДНК увреждания.

По темата на дисертацията са публикувани две статии, като Александър Александров е първи автор и в двете – ясен знак за водещата му роля в тяхното изработване. Едната е публикувана в *International Journal of Molecular Sciences*, а другата в *European Journal of Biology*. Резултатите са представени на три научни форума, включително с устен доклад.

С проекта на автореферат съм съгласен. Той представя в достатъчна пълнота основните резултати от дисертацията.

Въпрос към дисертанта: Има ли други методологични основания (освен посочените по-ранни работи в дискусията) експериментите с АТМ инхибиторите да бъдат проведени в HeLa Kyoto клетки, а не в използваните в първата част глиобластомни линии U87-MG и

U138-MG, и доколко резултатите могат да бъдат пренесени към биологията на глиобластомата?

Заключение: Дисертационният труд на Александър Александров е цялостно експериментално изследване, изпълнено на високо съвременно техническо ниво. То установява нови взаимодействия между инхибирането на деградативната автофагия и ДНК-увреждащите агенти по отношение на секрецията на извънклетъчни везикули и нуклеинови киселини. Постигнатите резултати показват, че авторът се е изградил като висококвалифициран изследовател с широк методичен профил. Дисертантът отговаря напълно на ЗРАСРБ и подзаконовите актове за придобиване на образователната и научна степен „доктор“. Въз основа на казаното убедено препоръчвам на уважаемото научно жури да оцени високо дисертационния труд на Александър Александров и да му присъди образователната и научна степен „доктор“ в научно направление 4.3. Биологични науки.

ПОДПИС:

/доц. д-р Анастас Господинов/