

РЕЦЕНЗИЯ

от чл.кор. Евдокия Пашева, д.б.н.

на дисертационен труд на тема: „Роля на HMGB1 в епително-мезенхимния преход (EMT) и метастазирането в 2D и 3D модели на рак на млечната жлеза“ за присъждане на образователно-научна степен „Доктор“ по научна специалност 4.3 Биологически науки, Молекулярна биология.

Актуалност на дисертационния труд: Борбата със злокачествените заболявания, които представляват не само здравен, но и социално-икономически проблем в днешното общество, изисква прилагането на нови и по-ефективни терапевтични стратегии. Това налага детайлното изследване на клетъчните механизми свързани с метастазиране на туморните клетки, както и идентифициране на таргетни фактори, които могат да бъдат обект на анти туморни агенти. Считаю, че механизъмът на епително-мезенхимният преход (EMT) е много удачно избран, тъй като играе ключова роля в процеса на метастазиране. Обектът на изследване е ракът на млечната жлеза, който е най-често диагностициран сред жените и на второ място в света след този на белия дроб.

Литературен обзор: Литературният обзор е много добре структуриран. Разгледани са детайлно всички аспекти, които са свързани с резултатите от изследванията на дисертантката като са цитирани най-новите постижения в тази област. Ясно са разграничени няколко раздела: рак на млечната жлеза и известни терапевтични подходи, EMT и връзката му с онкогенезата като са разгледани съвременните теории за сигналните пътища на процеса, актуални данни за ролята на HMGB1 и скъсената му форма при онкогенезата, функции на метформинът и взаимодействие с HMGB1. Обзорът е илюстриран с множество схеми, което допринася за лесното му и гладко прочитане и оставя впечатлението, че дисертантката е отлично запозната с литературата. Въпреки натрупаните литературни данни за връзката на HMGB1 с епително-мезенхимния процес, дисертантката е успяла да формулира някои от неизяснените аспекти свързани с механизмите, чрез които структурните вариации на HMGB1 модулират тези процеси. Имайки предвид и свойствата на метформина, дисертантката ясно и конкретно формулира целите и задачи на настоящия дисертационен труд.

Материали и методи. Материалите и методите са описани много подробно. Това показва, че дисертантката е усвоила едни от най-съвременните техники в молекулярната биология. Адмиравам този начин на представяне на извършената експериментална работа, тъй като това би улеснило възпроизвеждането на методиките да става по-лесно и безпроблемно при бъдещото им прилагане в лаборатория.

Резултати: Молекулярните характеристики на рака на млечната жлеза са ключови за ефективен избор на терапия. Ето защо е важно да се подбере правилният обект на изследване, за да се направят и адекватните заключения.

2D резултати. Изследвана е миграционната активност на три вида линии на рак на млечната жлеза, представителни на три различни молекулярни подтипа – MDA-MB-231 (тройно негативен, с изразен мезенхимен фенотип), MCF-7 (ER+/PR+ епителен карцином) и SK-BR-3 (HER2-обогатен карцином). Резултатът е получен по метода „wound healing assay“. Изследвани са рекомбинантни HMGB1, HMGB1ΔC и TGF-β като положителна контрола. При клетъчната линия MDA-MB-231 максимален ефект се наблюдава при 100 ng/mL HMGB1, при което миграцията се увеличава с 73,9% спрямо контролната стойност ($p < 0,01$). При третиране с HMGB1ΔC се предизвика по-слаб миграционен отговор в сравнение с HMGB1. Максимално увеличение се наблюдава при 300 ng/mL – 55% спрямо контролата ($p < 0,01$). При клетъчната линия MCF-7 отговорът към стимулите е ограничен. В обобщение, SK-BR-3, подобно на MCF-7 клетките, показват минимален миграционен потенциал. На практика HMGB1 и HMGB1ΔC имат способността да модулират клетъчната миграция само при MDA-MB-231. За да се подбере правилният обект на изследване е направен анализ на експресията на маркерите на EMT N-cadherin и Vimentin в трите клетъчни линии на рак на млечната жлеза в присъствие на HMGB1 и HMGB1ΔC. При MCF-7 и SK-BR-3 не се забелязва статистическа промяна за разлика от MDA-MB-231, при която се регистрира статистическо увеличение и на двата маркера. За прецизност е направена и оценка на базовата експресия на NF-κB (p65), фосфорилиран NF-κB (phospho-p65), RAGE и HMGB1 в немалигна клетъчна линия (MCF10A), MDA-MB-231, MCF7 и SKBR3. Резултатите показват, че MDA-MB-231 има най-висока базова експресия на всички три белтъка в сравнение с MCF10A и MCF-7, което съответства на функционалната чувствителност на тази линия към третиране с HMGB1, HMGB1ΔC и TGF-β. Логично

следващите експерименти са насочени към използването само на клетъчна линия MDA-MB-231.

3D резултати. Един подход наподобяващ *in vivo* условия е да се оцени ролята на HMGB1, HMGB1ΔC и TGF-β при инвазия на MDA-MB-231 клетки в триизмерна (3D) среда. В случая са оптимизирани експерименталните условия при използването на сфероиди. За разлика от 2D експериментите оптималната концентрация наблюдавана при HMGB1 (700ng/mL), бе по-висока от тази на HMGB1ΔC, който индуцира максимална инвазия при по-ниска концентрация от 500 ng/mL (91%) . TGF-β предизвика най-изразен ефект върху инвазията, като при концентрация 1ng/mL - 97% инвазия спрямо контролната група.

RAGE медириран сигнален път. Един от възможните сигнални пътища, наложил се в литературата, индуциран от HMGB1, е чрез участието на клетъчния рецептор RAGE. Логично дисертантката избира този подход да изследва ефекта на HMGB1 и HMGB1ΔC върху миграцията, инвазията и експресията на EMT маркери в MDA-MB-231 включващ участието на рецептора RAGE. При 80% заглушаване на рецептора се оказва, че при третиране с оптималната концентрация на HMGB1, клетките с подтисната експресия на RAGE демонстрират значително намаление на клетъчната подвижност (2D), на инвазията (3D) и на експресията на Vimentin в сравнение с контролата. Заглушаването на RAGE не оказва съществено влияние върху миграцията, инвазията и експресията на Vimentin при третиране с HMGB1ΔC. Ефектът е обратен при проведеното изследване на транслокация на фосфорилиран p65NF-κB в ядрото. HMGB1ΔC индуцира по-силна ядрена транслокация на активирания NF-κB в сравнение с HMGB1 при използване на оптималните концентрации.

Метформин. Дискутираните подробно свойства на метформина в литературния обзор и връзката му с HMGB1 мотивират дисертантката да проведе гореописаните експерименти и в присъствие на метформин. Метформин демонстрира дозозависимо инхибиране на клетъчната миграция. При провеждане на **2D** изследвания се оказва, че при третиране с 100 ng/mL HMGB1 най-силно инхибиране на клетъчната подвижност се наблюдава при комбинирано приложение на метформин в концентрация IC30 и 100 ng/mL HMGB1, за разлика от HMGB1ΔC, където не се наблюдава инхибиране на клетъчната подвижност при нито една от тестваните концентрации на метформин. Подобен резултат се получава и при определяне нивото на EMT маркерите: при

комбинирано третиране с метформин и 100 ng/mL HMGB1 се наблюдава значително намаление в експресията на N-cadherin и Vimentin, докато при HMGB1ΔC 300 ng/mL подобен ефект отсъства. Тази тенденция се наблюдава и при транслокацията на p65 NF-κB в ядрото на MDA-MB-231 клетки в присъствие на метформин и вариантите на белтъка. При **3D** експериментите метформинът не показва самостоятелно инхибиране на инвазията. Комбинацията с установените оптимални стойности на HMGB1 (700 ng) и HMGB1ΔC (500ng) при третиране на сфероиди има инхибиращ ефект само при цялата молекула. *Искам да обърна внимание, че в текста описващ този експеримент оптималните концентрации са сгрешени, но на фиг.55 са вярно представени.* Тези резултати показват по-голяма чувствителност на HMGB1 към метформин в сравнение със скъсената форма.

Влиянието на метформина върху взаимодействието на HMGB1 и RAGE е изследвано с метода на ко-имунопреципитацията. Добавянето на IC30 метформин води до 87,5% намаление на образуването на комплекс HMGB1/RAGE. Вариантът HMGB1ΔC не образува измеримо взаимодействие с RAGE, което потвърждава, че липсата на C-крайния домен елиминира свързването му с рецептора и предполага, че биологичните ефекти на HMGB1ΔC се осъществяват чрез RAGE независими механизми.

Дискусия. Дискусията на получените резултати е аналитична и се базира на литературни данни, но са изказани и собствени хипотези. Дисертантката се е концентрирала основно върху тълкуването на основните разлики между HMGB1 белтъка и скъсената му форма HMGB1ΔC като акцентът е сложен върху ролята на C-края в EMT прехода. Отстраняването му позволява по-силно взаимодействие с рецепторите, което води до по-мощен EMT и инвазивен ефект. Дисертантката предлага едно възможно обяснение, а именно: ако HMGB1ΔC се свързва с рецепторите по-силно или за по-дълго време чрез повишен афинитет, клъстеризация или по-бавно дисоцииране, резултатът е усилен и продължителна NF-κB сигнализация, водеща до по-силна индукция на EMT гени. Особено внимание е обърнато и на метформина като инхибитор на HMGB1-RAGE сигналния път, което може да бъде перспективна терапевтична стратегия за ограничаване на метастазите при рак на млечната жлеза.

Много добро впечатление прави фактът, че дисертантката е проявила критичност и е формулирала пет ограничения на проведеното изследване, което дава и правилни насоки за бъдещото продължаване на тематиката. Очертани са и възможните перспективи за бъдещите изследвания на рецептори, с които HMGB1ΔC взаимодейства

и последващото активиране на сигнални пътища. Предложено е също да се направи оценка на влиянието на HMGB1ΔC върху ремоделирането на извънклетъчния матрикс.

Изводите и приносите са формулирани кратко и ясно.

Препоръки. В голяма част от проведените експерименти за сравнение на ефектите са използвани т.н. оптимални концентрации на HMGB1 и HMGB1ΔC. При определяне на ролята на един белтък в даден процес това е логично. При сравнение на влиянието на два и повече белтъка е добре сравнението да става при равни концентрации. Например при стимулиране на експресията на N-cadherin и Vimentin (фиг.25) в присъствие на двете белтъчни форми при една и съща концентрация от 100ng, HMGB1 индуцира най-високата експресия на мезенхималните маркери, но при същата концентрация HMGB1ΔC реално няма ефект. Той се проявява при 3 пъти по-висока концентрация (300ng). Би било добре това да се дискутира като се отбележи и високото ниво на ендогенен HMGB1 в клетката в сравнение със скъсената му форма.

Заключение. Представеният ми за рецензия дисертационен труд третира една много актуална и социално значима тематика, а именно детайлното изследване на молекулярните характеристики на рака на млечната жлеза като ключови фактори за правилния избор на терапия. Дисертантката Десислава Владимирова е обобщила аналитично големия обем от литература в тази област, което демонстрира всестранно познаване на проблема. Усвоила е съвременни молекулярно биологични техники, описани много подробно, което позволява безпроблемното им възпроизвеждане. Резултатите са представени ясно и следват поставените цели и задачи, съпроводени са с прецизен доказателствен материал като снимки, графики и схеми, което ги прави убедителни. Дискусията е задълбочена като изказаните хипотези са много добре мотивирани. Формулирани са предизвикателствата и бъдещите насоки за развитие на тематиката. Дисертантката е представила четири публикации свързани с дисертацията с общ ИФ. 8.1, от които тя е първи автор в три. Десислава Владимирова е представила документ за липса на плагиатство.

Отразените постижения, факти и аргументи в рецензията ми дават пълното основание да предложа убедително на уважаемото Научно жури да гласува положително за присъждане на образователна-научна степен „доктор“ на Десислава Владимирова, научна специалност 4.3 Биологически науки, молекулярна биология.