

## **РЕЦЕНЗИЯ**

**на дисертационен труд за получаване на научната и образователна степен ”доктор” на тема: Сигнализация при клетки отглеждани в условия на триизмерен матрикс”.**

Автор на дисертационния труд: Ралица Бориславова Скробанска

Рецензент: проф. дбн Елена Владимирова Стефанова

Пролиферативната активност на клетките, растежът, диференцировката и трансформацията са процеси, които са под контрола на ядрения геном и се иницират от различни сигнални пътища. Редица ключови молекули участват в регулацията на тези пътища в норма и патология. Прицелна молекула в тези събития е ДНК, от която зависи съдбата на клетките да предават щафетата на живота или да загинат. Регулирането на клетъчната пролиферация при физиологичните и патологични процеси е обект на усилено изследване в различни моделни системи, особено поради значението и в процесите на туморогенезата и малигнените заболявания.

Като най-широко използвани моделни системи за изследване на механизмите участващи в контрола на клетъчната сигнализация са конвенционалните двуизмерни клетъчни култури. Днес причините за активиране на ендогенната програма, модулираща клетъчните процеси и маркерите за инициране на сигналните каскади в клетъчния цикъл все още не са известни. Именно те определят и стратегията за търсене и прилагане на нови методи и системи, като използването на триизмерни моделни системи, за изследване на широкоспектърния биологичен отговор към различните сигнали, на което е посветен и дисертационният труд. Актуален подход с изключително важно значение за практиката, за диагностиката, терапията на тумори, податливост или резистентност

на клетките към широко използваните днес терапевтични агенти, изследвания доближавачи се до *in vivo* условията на клетъчните отговори.

Дисертационният труд е разгърнат на 135 страници от които: 43 - литературен обзор, 57 - резултати и дискусия, 2 страници обобщени резултати, 1 страница изводи, а цитираната литература е представена от 222 автора на латиница. Илюстриран е с 42 фигури, 13 ефектни схеми и 1 таблица.

Богат, информативен и стегнат литературен обзор, написан много компетентно. От изложението личи, че докторантката познава в детайли съвременната литература по проблема, както и всички известни подходи, приложими за анализ на клетъчната сигнализация и регулиране на клетъчната пролиферация.

Основен акцент в литературния обзор е поставен върху принципите, преобразуващи извънклетъчните сигнали във вътреклетъчни отговори и ролята на киназите в основната сигнална каскада, регулиращи клетъчния цикъл Ras-Raf-ERK1/2. Обоснован е FAK зависимото и независимо активиране на сигналния път Ras-Raf-MEK-ERK и е показана връзката между интегрин-зависимото активиране на семейството Src протеин тирозин кинази. Прецизирани са клетъчно-специфичните механизми, определящи активирането на ERK1/2 сигналната каскада регулираща клетъчния цикъл, както и пътищата контролиращи ядрената транслокация на ERK. Посочена е ролята на Ras белтъците взаимодействащи с различните ефекторни молекули, трансфериращи извънклетъчните сигнали към цитоплазмените сигнални каскади. Много детайлно е дискутирана ролята на холестерола като регулаторна молекула в редица биологични процеси и значението на кавеолина контролиращ холестеролната

хомеостаза. Подчертано е предимството на използване на тъканно-подобни триизмерни моделни системи, чиито характеристики се доближават до тези във физиологични условия. Установени са значителни разлики при използването на такава *in vivo* подобна среда (3Д) върху клетъчната морфология, пролиферацията и сигнализацията, което е свързано с промяна на интегринавата активност и редица ефекторни молекули, в сравнение с тези процеси, протичащи в клетките, отглеждани върху конвенционалните двуизмерни (2Д) субстрати.

Целите и задачите са конкретизирани в 4 пункта, които могат да бъдат формулирани в следните групи: за да се анализират сигналните пътища регулиращи пролиферацията да се изследва: а) приложението на 3Д моделните системи на базата на култивиране в постклетъчен матрикс и на нова моделна система от фибробласти за активиране на Ras/Raf/ERK сигналната каскада и б) определяне на сходствата на моделните системи със здрава съединителна тъкан чрез анализ на пролиферацията и сигнализацията.

В раздела материали и методи са описани в детайли всички методични стъпки за получаване на триизмерни матриксни култури, 3Д нативен матрикс, извънклетъчен матрикс и постклетъчен матрикс, като клетките са анализирани и третирани с различни агенти. Освен оригиналните методични подходи, докторантката използва обогатени фракции от клетъчни мембрани, за определяне количеството на холестерол и на тотални фосфолипиди, а за анализ на белтъците е изолирана детергент разтворима и детергент неразтворима мембранна фракция. Паралелно е проведен електрофоретичен анализ, имуноблотинг, флуорометричен анализ и имунохистохимичен анализ на фракциите от матрикси, както и имунофлуоресцентен анализ за определяне на морфологията и

локализацията на клетките и е направена статистическа обработка на резултатите.

Общо, всички получени от докторантката резултати са с висока научна стойност и са обсъдени много компетентно. Изследванията с въведения за първи път в лабораторията метод за получаване на триизмерни клетъчни култури от различни фибробластни линии, позволяват много бързо да се открият предимствата и недостатъците на различните матриксни структури за анализ на сигналните пътища, регулиращи клетъчната пролиферация.

Приносният характер на резултатите в дисертационния труд от научна гледна точка и важни за клиничната практика ще сумирам в няколко точки:

1. Чрез използване на *in vivo* подобна моделна система от първични човешки фибробласти HFF, култивирани в постклетъчен матрикс е установено, че Src киназата е отговорна за активирането на Ras/Raf/ERK сигналният път. Участието на Src киназата, а не на FAK киназата за активиране на ERK1/2 и клетъчната пролиферация, показва, че в триизмерни условия оперира друг сигнален път, различен от този, в клетките отглеждани в конвенционалните 2Д клетъчни култури. Клетките в тази триизмерна култура наподобяват активирани фибробласти, поради стимулиране на пролиферацията им и синтез на маркерния гладкомускулен  $\alpha$ -актин и следователно са една подходяща моделна система за изследване на възпалителни процеси в организма.

2. Невъзможността на постклетъчната моделна система да поддържа фибробластите в състояние подобно на покой е причина за първи път да се създаде и характеризира в детайли нативна 3Д култура от миши GD25 $\beta$ 1 фибробласти, като нов експериментален подход, която е подходящ еквивалент на здрава *in vivo* тъкан. Получените резултати показват, че:

а) основните хранителни компоненти не са лимитиращ фактор за скоростта на формиране на нативната триизмерна система, а тя е резултат от по-сложен механизъм на регулиране на сигнализацията

б) линейният характер на нарастване на фибробластите в собствено синтезиран матрикс не се дължи на стареене на културата нито на увеличена апоптоза, а понижената пролиферация в 3Д е свързана с подтискане експресията на циклин Д и с увеличено количество на p53, в сравнение с клетките от 2Д култура

в) подтиснатата пролиферация не корелира с намаленото активиране на ERK1/2 а с инхибиране активирането на Ras, което означава, че сигнализацията до ERK1/2 може да е Ras независима

г) изследването на сигналната FAK/Src/ERK каскада за постепенното увеличаване на пролиферацията на фибробласти при пренасянето им от 3Д тъкан в 2Д първична култура, показва правопрпорционална зависимост между увеличеното количество на циклин Д и активността на FAK, като фосфорилирането на Src се поддържа високо паралелно с повишената активност на ERK.

3. Научен принос с важно значение е изясняване на несъответствието между нивото на фосфорилиране на FAK, Src и ERK1/2 киназите и пониженото ниво на експресия на циклин Д в клетките от 3Д нативен матрикс. Направен е обобщен анализ за специфичността на ERK-зависимата сигнализация в GD25β1 фибробласти и е доказано, че намаленото количество на циклин Д в сравнение с клетките от 2Д монослой е резултат от намалената транслокация на ERK1/2 в ядрото и повишената локализация на фосфорилиран ERK по Tyr204 в рафт домените на 3Д нативната система.

4. Проследен е ефекта на ловастатина върху растежния профил на GD25β1 фибробласти в 3Д нативен матрикс, с цел изследване на клетъчната пролиферация след експериментално понижаване на

мембрания холестерол. Получени са интересни резултати, които показват, че:

а) пролиферацията, в 3-дневни 3Д матрикси третиран с 2.5  $\mu\text{M}$  ловастатин се повишава значително, а концентрациите на ловастатин от 5  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  не предизвикват промяна в растежния профил, докато в 2Д културите концентрациите от 5  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  имат доказан инхибиращ ефект

б) за първи път е доказано, че определена концентрация на статин 2.5  $\mu\text{M}$  може да доведе до повишаване на клетъчната пролиферация, което е свързано с понижаване на количеството на мембранен холестерол и повишаване на количеството на циклин Д1 приблизително с 30% при третиране на клетките от 3Д матрикси.

в) положителният ефект върху пролиферативната активност на клетките от 3Д нативен матрикс не се обуславя от повишеното фосфорилиране на ERK1/2, а от изместване на фосфорилирания ERK1/2 от рафт домените и включването му в сигналната FAK/Src/ERK каскада.

5. От проведения прецизен анализ, свързан с регулиране на клетъчната пролиферация в условия на култивиране на фибробласти от триизмерен нативен матрикс в 2Д условия е установено, че:

а) за разлика от фибробластите отглеждани в монослой, които имат експоненциален растеж, клетките отглеждани в 3Д условия след прехвърлянето им в монослойна култура възстановяват пролиферацията си и навлизат в експоненциален растеж едва на 3-ия ден

б) изследването на количеството фосфорилиран ERK1/2 след прехвърляне на GD25 $\beta$ 1 фибробластите от триизмерна в двуизмерна система за култивиране показва, че възстановяването на експоненциалния растеж на 3-ия ден се инициира от промяна в локализацията на ERK1/2 чрез изтеглянето на тази фосфорилирана киназа от мембранните рафт домени.

Всички резултати са подплатени от една широко разгърната и компетентна дискусия, в която е очертана ролята на различни белтъци със структурна, транскрипционна или рецепторна функция, в модулирането на сигналните пътища.

В дисертацията са допуснати грешки които по-скоро са от технически характер, но по-съществени забележки нямам.

Авторефератът съответства по съдържание на дисертацията. Резултатите са публикувани в 2 научни труда, 1 от които в реномираното международно списание, Cell Biol Internacional, с ИФ 1.8 (по citation index за 2010 година), докладвани са в 2 международни научни конференции и са отбелязани 4 цитата.

В заключение: считам, че дисертационният труд на Ралица Скробанска представлява едно много комплексно и модерно изследване, в една перспективна област каквато е клетъчната сигнализация, с най-съвременни методи, някои от които приложени за първи път в нашата страна. Оригиналните подходи, актуалността и възможностите за приложение на резултатите в медицинската практика и съвременните медико-биологични изследвания, са основателен аргумент да препоръчам на почитаемото жури, да присъди на Ралица Скробанска научната и образователна степен “доктор”.

17.07.2011

Рецензент:

/проф., дбн Е. Стефанова/