

Бз. № 16 / 16. 11. 2018.

СТАНОВИЩЕ

на дисертационния труд на ас. Силвия Георгиева Календерова-Вълкова,
на тема: „Роля на Ca^{2+} /калмодулин зависимата протеин киназа II в
пролиферацията и апоптозата на нормални и малигнени човешки епидермални
кератиноцити“

представен за присъждане на научно-образователна степен “ДОКТОР”,
по Научна специалност „Биохимия“

Професионално направление 4.3. „Биологически науки“

Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“

изготвена от проф. Татяна Иванова Влайкова, д.б.

Катедра Химия и Биохимия, Медицински факултет,

Тракийски Университет, Стара Загора,

тел: 0888 002438, e-mail: tvlaykov@mf.uni-sz.bg

1. Биографични данни за кандидата

Силвия Георгиева Календерова-Вълкова учи в Руска езикова гимназия, София, придобива образователна степен „профессионален бакалавър“ като Медицински лаборант в Медицински колеж на МУ, София, а през 1998 - магистърска степен в специалност „Молекулярен биолог“, в БФ на СУ „Св. Кл. Охридски“.

Професионалното и развитие в Катедрата по Биохимия на МУ-София преминава през всички етапи – от специалист до главен асистент.

През 2006 придобива специалност „Бохимия“ в системата на СДО към МНЗ.

Владее на високо ниво руски и английски език.

2. Актуалност на дисертационния труд

Безспорна е сложната природа на клетъчната сигнализация, включваща голямо разнообразие от молекули, въвлечени в преплитащи се и взаимно свързани сигнални пътища, регулиращи практически всички клетъчни и метаболитни процеси. Обект на изследване в настоящата дисертация е една от тези сигнални молекули, Ca^{2+} /калмодулин зависимата протеин киназа II. CaMKII е от групата на Ca^{2+} /калмодулин зависими Сер/Гре протеин кинази с широка субстратна специфичност и притежава уникалната способност да отговаря не само на силата на сигнала за активиране, но и на неговата честота. В редица клетъчни типове е доказано, че CaMKII играе критична роля в провеждането на вътреклетъчните калциеви сигнали при регулирането на генната транскрипция, клетъчната пролиферация, апоптоза, реорганизация на цитоскелета, в процеса на учене и запаметяване.

В дисертацията Силвия Календерова и нейният научен ръководител са насочили усилия в разкриване на неизяснявани механизми на влияние на тази мултифункционална протеин киназа, CaMKII, в сигнализацията на пролиферацията и апоптозата в нормални и малигнени човешки епидермални кератиноцити. До стартирането на изследванията в този дисертационен труд не е имало никакви данни за участието на CaMKII, PI3-K и JAK2/STAT трансдукционните пътища в процеса на пролиферация и УВ-индицирана апоптоза на нормални и малигнени епидермални кератиноцити. Това неоспоримо доказва значимостта на проблема, актуалността на темата и оригиналността на резултатите и техния еврестичен характер. Получените резултати допринасят не само за изясняване на закономерностите, на които се подчинява кератиноцитната пролиферация в норма, но дават и солидна научна основа за разработването на нови терапевтични стратегии и средства за лечение на хиперпролиферативните заболявания на епидермиса, например чрез прилагане на селективни инхибитори на CaMKII или на други от изучаваните кинази.

Целта и задачите на дисертационния труд са конкретно и точно дефинирани и свидетелстват за едно задълбочено планиране на проучването. Прави много добро впечатление логичната последователност и цялостта в разработването на дисертационния труд.

Оценка на литературния обзор

Литературният обзор на дисертационния труд е стегнат, аналитичен, но едновременно с това информативен и образователен. С необходимата изчерпателност и критичност, Силвия Календерова обобщава научната литература относно структурата, субстратната специфичност, механизмите на регулация и ролята в клетъчните процеси на Ca^{2+} /калмодулин зависимите протеин кинази, и по-подробно за CaMKII и нейните изоензими. Специално внимание е обърнато на участието на CaMKII в процесите на пролиферация и в програмираната клетъчна смърт.

За онагледяване са използвани подходящи схеми и фигури, с които се допълва информацията и се облекчава възприемето на тази трудна материя, клетъчната сигнализация. Направеният литературен обзор показва задълбочените знания и многостранна информираност на докторанта и способността критично да анализира научната литература, да извлича най-съществената информация и да я представя разбираемо с добър научен стил и на правилен литературен български език.

Материали и методи

Разделът «Материали и методи» заема почти $\frac{1}{4}$ от текста на дисертацията (19 стр.) и е изключително изчерпателен. Всички методики са представени с протоколна точност, представени са принципите на използваните методи, а реактивите и използваните разтвори са дефинирани в детайли, което дава възможност за възпроизвеждане на методиките. От друга страна, тази изчерпателност показва личния принос и участие на докторанта в разработването и изпълнението на експериментите.

За провеждане на експериментите са подбрани два клетъчни модела, които са напълно подходящи за реализиране на поставените задачи. При изследване ролята на CaMKII и протеин кинази от други сигнални пътища (PI3K, JAK2/STAT и MAPK) в процеса на пролиферация на нормални кератиноцити е избран модела на автокринно пролифериращи човешки епидермални кератиноцити, който много сполучливо наподобява делящите се кератиноцити от базалния слой на епидермиса *in vivo*. При проучване на ролята на протеин киназите в УВ-стимулираната апоптоза е използвана епидермоидна карциномна клетъчна линия A431. Възлов елемент за разграничаване еfectите на проучваните протеин кинази е използването на специфични инхибитори на изследваните протеин кинази, както и трансфекция с CaMKII β антисенс- и сенс-олигонуклеотиди.

В дисертацията са приложени впечатляващо разнообразие от съвременни биохимични методи и такива на молекулярната и клетъчна биология, които са напълно адекватни за решаване на поставените задачи.

Оценка на резултати, изводите и приносите

Резултатите, са представени в логична последователност и показват задълбочеността, с която са планирани изследванията за постигане на поставената цел. Илюстрирани са с 12 фигури, включващи графики и снимки на рентгенови филми от авторадиографските и хемилуминисцентните анализи.

Чрез използване на специфични инхибитори на CaMK, PI3K, JAK2 и MAPK, прилагани при култивирането на автокринно пролифериращи човешки епидермални кератиноцити, докторантката установява, че и четирите типа протеин кинази участват, но с различна степен на въздействие, в регулацията на клетъчната пролиферация. Резултатите са **оригинални с приносен характер** и убедително доказват, че

Ca^{2+} /калмодулин зависимите протеин кинази (СаМК) са важни медиатори в клетъчната пролиферация като тези ензими активират МАРК каскада и свързването на с-Myc/Max/Mad хетеродимерите към ДНК, докато JAK/STAT сигналният път на регулация на клетъчния цикъл е независим от МАР киназната сигнализация. **Значимостта** на получените резултати се доказва от забелязаните досега 27 цитирания на публикацията, включваща тези резултати.

Чрез транзиторна трансфекция на нормални човешки епидермални кератиноцити с СаМКII δ антисенс-олигонуклеотид, докторантката установява, значително инхибиране (50%) на клетъчната пролиферация, понижение на фосфорилирането на EPK1/2 МАР киназите, на Тре 58 /Сер 62 фосфорилирането на с-Myc и на свързвашата му активност в този вид клетки. Тези резултати са основа за извеждането на едни от най-съществените **оригинални изводи** на дисертационния труд отнасящи се за ролята на СаМКII в регулацията на клетъчния цикъл в нормалните човешки епидермални кератиноцити.

Експериментите, проведени с епидермоидната карциномна клетъчна линия A431, водят до **оригинални резултати**, доказващи УВ-стимулирано фосфорилиране на Тре 286 в молекулата на СаМКII и до активиране на каспаза-8 и последващо активиране на каспаза-3. Тези резултати дават основание на докторантката да направи извода, че СаМКII участва в процеса на UV-стимулирана апоптоза, активирайки първо каспаза-8 и след това ефекторната каспаза-3. Експеримент с УВ облъчване на клетки, трансфектирани с СаМКII δ антисенс- и сенс-олигонуклеотиди би допринесъл за уточняване непосредствената роля на СаМКII при активирането на двете каспази от каскадата на програмираната клетъчна смърт в този вид клетки.

Резултатите представени в дисертацията са обсъдени от Силвия Календерова компетентно, задълбочено и критично в светлината на литературни данни. Познаването в дълбочина на механизмите на клетъчната сигнализация и компетентното интерпретиране на резултатите от изследванията, дават възможност на Силвия да изгради хипотези за механизмите, чрез които СаМКII участва в пролиферацията и апоптозата на нормални и малигнени човешки епидермални кератиноцити (представени в две схеми).

Въз основа на задълбочения и критичен анализ на резултатите, Силвия Календерова извежда 6 изводи, които са формулирани кратко и точно. Тези изводи очертават **4 оригинални приноси с научно-теоретичен характер**, които приемам без никакви забележки.

Приемам начина, по който е оформлен *авторефератът*, който отговаря напълно на съдържанието на дисертационната работа и отразява точно резултатите и фактите в нея.

Оценка на публикационната активност

Резултатите от дисертацията са публикувани в 4 научни труда, като един от тях е в списание с ИФ (**Общ ИФ=2.148**). Забелязани 27 цитирания на тази статия, като 15 от тях са в списания, рефериранi в значими международни бази данни. Резултатите са представени още като 2 научни съобщения, на един международен форум в чужбина и един в България. Трябва да се подчертава личният принос на Силвия в разработването на дисертационната работа. Това се доказва от факта, че тя е **първи автор** в три от статиите и на едно от съобщенията и е втори в останалите.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на асистент Силвия Георгиева Календерова-Вълкова съдържа научно-теоретични резултати, които представляват оригинален принос в науката. Дисертационният труд и публикуваните научни статии показват, че докторантът притежава задълбочени теоретични познания и експериментален опит и е

изградила необходимите умения самостоятелно да разработва нови лабораторни методи, да организира и провежда сложни експерименти и да анализира и интерпретира получените научни резултати.

Въз основа на значителните достойства на представения дисертационен труд и на представените наукометрични показатели, си позволявам убедено да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури да присъдят на асистент Силвия Георгиева Календерова-Вълкова научната и образователна степен "Доктор" по научна специалност „Биохимия“ Професионално направление 4.3. „Биологически науки“ Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“

Убедено давам своята **положителна оценка** на проведеното изследване, постигнатите резултати, и научните приноси представени в дисертационния труд, и гласувам с „ДА“ за присъждане на ОНС „доктор“ на Силвия Георгиева Календерова-Вълкова.

12.11.2018.

Рецензент.....

/проф. Татяна Влайкова, дб/