

## РЕЦЕНЗИЯ

**От доцент Милена Сергеева Мурджева-Андонова,**

секция „Молекулярна имунология”,

Институт по биология и имунология на размножаването, БАН

член на научно жури във връзка със защита на дисертационен труд, съгласно заповед № Р038-323/26.06.2014 на ректора на Софийски университет „Св. Климент Охридски“

**Тема на дисертационния труд:** „Функционален анализ на болест-предизвикващи мутации в потенциални сортиращи мотиви на белтъка бестрофин-1 (best1)” , за получаването на образователната и научна степен „Доктор” в област на висше образование 4. Природни науки, професионално направление 4.3 Биологически науки (Клетъчна биология)

**Докторант:** Гл. ас. Веселина Светославова Москова-Думанова

**Научен консултант:** проф. д.б.н. Румен Панков, Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е посветен на изследвания на мутантни форми на белтъка бестрофин – best1. Мутациите в гена за бестрофин-1 (BEST1) са отговорни за наследствени дегенеративни очни заболявания при човека - „бестрофинопатии”, които водят до прогресивна загуба на зрението. Бестрофина се експресира по базалната мембрана на клетките на ретиналния пигментен епител. Функцията му се свързва с преноса на йони през мембраната на клетките на ретиналния пигментен епител и свързаното с това поддържане на хомеостазата на ретината и фоторецепторите. В настоящата дисертация се прави анализ на няколко мутации в потенциални сортиращи домени в молекулата на белтъка бестрофин-1, с оглед на влиянието им върху локализацията на белтъка и промените в клетъчната хомеостаза.

Дисертационния труд е написан на 126 страници, последвани от 13 страници литературна справка и е структуриран по стандартния начин, състоящ се от разделите: Увод, Литературен обзор - обхващащ 45 страници, „Цели и задачи”, „Материали и методи” на 9 страници, „Резултати”- на 50 страници и „Дискусия”- 14 страници. Резултатите са представени в 42 фигури, а библиографията обхваща 250 заглавия.

Литературният обзор обхваща четири глави - Биология на зрението и роля на ретиналния пигментен епител, Бестрофинопатии, Генът BEST1 и белтъкът бестрофин/Best1 и Клетъчна поляризация и белтъчно сортиране. Информацията от повече от 230 литературни източника е структурирана логично и последователно и е онагледена много добре с фигури и схеми от съвременни литературни източници. Въпреки че, според мен, тази част от дисертацията е прекалено подробна, и липсва обобщаващ завършек, който да насочи вниманието пряко към целта и задачите на работата, обзорът е написан много леко за четене и информира достъпно за всички важни страни на проблема – и клиничната картина на бестрофинопатиите и молекулярно-биологичната характеристика на гена и белтъка best, както и спецификите на клетъчната поляризация. Към тази част от работата имам следния въпрос – с какво се обяснява проявата на моногенно генетично заболяване на различна възраст при различните пациенти?

Поставените цели и задачи са формулирани ясно и конкретно. За тяхното изпълнение са използвани съвременни високотехнологични молекулярно биологични, биохимични, клетъчно биологични и имунологични методи като: мутагенеза, Real-Time PCR, трансфекции, създаване на стабилна клетъчна линия MDCK, експресираща Best1, биотинилиране за маркиране на домен-специфични белтъци на клетъчната повърхност, имунопреципитация, SDS-PAGE, имуноблотинг, имуофлуоресцентно оцветяване и микроскопски анализ, измерване на трансепителна резистентност. Методичната част впечатлява със своята мултидисциплинарност и дава представа за широката професионална подготовка на докторанта. Въпреки това, смятам, че тази част от дисертацията би спечелила от едно допълнително разясняване на част от методите, особено тези за обработка на данните от микроскопския анализ със схеми или фигури.

В РЕЗУЛТАТИ е проследена експресията на бестрофин-1 в различни епителни клетъчни линии – MDCK (бъбречен епител от куче), RPE-J (ретинален пигментен епител от плъх), RPE-1 (човешки ретинален пигментен епител), Hela (човешки епител от рак на шийката на матката) и HEK293 (човешки ембрионален бъбречен епител). Както прекрасно е визуализирано на фиг. 15 и е коментирано от автора: *«в нито една от тези линии посредством използваните от нас антители не беше детектиран сигнал за белтъка бестрофин с очакваната молекулна маса от 68kDa. Но във всички клетъчни линии беше наблюдавана по-високо разположена ивица с молекулна маса от около 70 kDa. Тя се приема като неспецифична положителна реакция, и е описана в*

*RPE-J* клетки и човешки клетки от ретинален пигментен епител, при използването на същото анти тяло». Но остава недостатъчно изяснено с какво се обяснява този неспецифичен положителен банд?

За да бъде подбрана подходяща за основните експерименти клетъчна линия е сравнена експресията на Best в преходно трансфектирани RPE-1 (човешка клетъчна линия) – която е отхвърлена поради недостатъчна височина на клетките и припокриване на апикалните части на съседни клетки и RPE-J (плъша клетъчна линия). Посредством конфокална микроскопия е проследена локализацията на дивия тип бестрофин-1, както и на мутантите p.Y227N, p.Y85H, p.Q96R и p.L207I, като е направена и колокализация с маркера за плътни контакти ZO-1, както и с базолатералния маркер  $\beta$ -катенин. Наблюдавано е перинуклеарно струпване на различните мутантни белтъци в клетките от линията RPE-J. С цел да се изясни дали това струпване се дължи на неправилното процесирание на мутантните форми и задържане в Апарата на Голджи, е изследвана колокализацията на Best1 с маркера за транс-АГ GM130. Установено е, че малка част от белтъка best колокализира с АГ, но въпреки това, според автора, RPE-J клетките не са подходяща моделна система за такъв тип изследвания, защото тези клетки са недостатъчно и ненапълно поляризирани и като моделна система са използвани клетки от линията MDCK (бъбречен епител от куче), които са добре известен и широко използван модел на полярни епителни клетки. MDCK, според автора, експресират много ниско ниво BEST1-иРНК, но не синтезират белтъка Best1; трансфектирани с човешки BEST1 експресират белтъка Best1 с очаквания размер от 68 kDa и базолатерална локализация в същото съотношение, както и базолатералния маркер  $\beta$ -catenin. След което е изследвано дали шест патогенни мутации в предполагаеми сортиращи мотиви, повлияват локализацията на Best1 като е проследена поляризираната експресия на различни конструкции в MDCK клетки. Показано е, че мутациите p.Y85H, p.Q96R, p.L100R и p.Y227N имат повишена апикална експресия, в сравнение с нормалните, не-мутантни молекули, докато p.L207I има поляризирано разпределение на мутантния белтък, аналогично на това на нормалния Best1. Авторът показва, че няма повишаване на количеството мутантен белтък в АГ в сравнение с дивия тип, от което тя заключава, че намаляването на апикалната експресия на мутантните белтъци не се дължи на задържането им във вътрешността на клетката. За потвърждаване на резултатите за повишената апикална експресия е

анализирана колокализацията на мутантите p.Y85H и p.Q96R (показали най-големи отклонения в локализацията си, в сравнение с дивия тип белтък) със ZO-1- маркер за плътен контакт и WGA (wheat germ agglutinin – аглутинин от пшеничен зародиш) - екстрацелуларен апикален маркер, както и клетъчно-повърхностно биотинилиране. Тези тестове потвърждават апикалната локализация на мутантите.

Авторът изследва вероятността тирозиновият остатък в позиция 227 (Y227) да е важен за базолатералното сортиране, към това я насочва фактът, че мутацията p.Y227N води до повишаване на апикалната експресия на белтъка. Псевдо-фосфорилирането на тирозин 227 е постигнато чрез заместване на тирозиновия остатък с глутаминова киселина, а възможността за фосфорилиране по тирозин е блокирана чрез мутиране на тирозиновия остатък във фенилаланинов. Резултати показват, че конститутивно фосфорилирания Best1 (Y227E) се насочва частично към апикалната мембрана в по-голяма степен, в сравнение с нормалния и нефосфорилиран белтък (Y227F). Неактивният p.Y227F показва базолатерално оцветяване, както и пик в базолатералната част на кривата, аналогично на нормалния Best1 белтък. Чрез тези резултати е показана ролята на нефосфорилирания тирозинов остатък 227 за правилното базолатерално сортиране.

Изследвана е и мутацията p.R25W, която е в близост до последователност от три левцинови мотива - също потенциални сортиращи детерминанти. Показано е повишаване на апикалната експресия на белтъка в сравнение с дивия тип белтък.

Нарушената локализация на белтъка и апикалната му поява биха нарушили ролята му в подържането на потенциалната разлика от двете страни на клетките на ретиналния пигментен епител. За да бъде потвърдена тази хипотеза е изследвано влиянието на Best1 върху трансепителната резистентност на стабилно трансфектиран best в MDCK клетки, като мярка за проводимостта на йони през мембраната.

В раздел ДИСКУСИЯ критично са обсъдени получените данни. Коментирани са връзката между възникнали при пациенти мутации и описаната локализация на мутантните форми, както и функционалните промени в ретиналния пигментен епител. Формулирани са четири ясни и логични извода и четири приноса, които напълно приемам. За особено удачно намирам формулирането на заключение, което оформя компактно и достъпно основните данни, получени в резултат на работата.

Във връзка с дисертацията са публикувани 4 научни труда, от които 3 статии са с импакт фактор (Biotechnology and biotechnological equipment 2012, Int J Mol Sci. 2013, Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, 2014). В 3 от публикациите Веселина Москова-Думанова е първи автор. Общият импакт фактор на статиите е близо 3,5. Въпреки, че статиите са публикувани съвсем наскоро, вече са забелязани цитирания на публикациите свързани с дисертационния труд, макар и част от тях автоцитирания, това показва мястото на работата в общото развитие на темата. Материали от дисертацията са представени и на четири научни форума – три в България и един в Турция.

**Заключение:** Дисертационният труд на Веселина Москова-Думанова я характеризира като много добре подготвен в теоретично и практическо отношение учен, който може да решава самостоятелно научни проблеми в областта на клетъчната биология. Забележителното качество и прецизност на микрофотографиите прави много добро впечатление. Заслужава да се отбележи и оригиналният подход за оценка и анализ на изображенията.

Считам, че Веселина Москова-Думанова е изграден изследовател с висока компетентност и много добри перспективи за развитие в областта на клетъчната биология. Нейните разработки са актуални, изпълнени са на много добро експериментално ниво и са публикувани в реномирани научни списания. Всичко това ми дава основание да дам своета положителна оценка и да препоръчам убедено на членовете на научно жури във връзка със защита на дисертационен труд, съгласно заповед № P038-323/26.06.2014 на ректора на Софийски университет, да гласуват за присъждане на образователната и научна степен „Доктор” по професионално направление 4.3. „Биологични науки” на Веселина Москова-Думанова

29. 09. 2014

Рецензент:

Доц. Милена Мурджева