

СТАНОВИЩЕ

ОТНОСНО: Дисертационния труд на гл. ас. Веселина Светославова Москова-Думанова на тема: „Функционален анализ на болест-предизвикващи мутации в потенциални сортиращи мотиви на белтъка бестрофин-1 (Best1)“ за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“

от проф., д-р Румяна Силвиева Миронова, ИМБ „Академик Румен Цанев“, БАН

Бестрофинопатиите са дегеративни очни заболявания, свързани с мутации в белтъка бестрофин-1 (Best1). Този белтък се синтезира основно в клетките на ретиналния пигментен епител (РЕП), като функцията му не е напълно изяснена. Предположенията са за ролята му на хлорен канал, инхибитор на вътреклетъчни калциеви канали, както и на канал за транспорт на хидрогенкарбонатни аниони. При редица бестрофинопатии е наблюдавано нарушено клетъчно разпределение на мутантните бестрофини. В пациент с вителIFORMна макулна дистрофия на Бест (BVMD), носител на мутация Y227N в Best1, е наблюдавана завишена апикална локализация на белтъка, който в норма е базолатерално разположен в клетките на РЕП. Това клинично наблюдение води до предположението за съществуването на връзка между нарушеното клетъчно разпределение на белтъка и патогенезата на заболяването. Мутация Y227N е локализирана в потенциален тирозинов сортиращ домен, отговорен за правилното клетъчно насочване на белтъка. За пациенти с BVMD са описани и други мутации в потенциални тирозинови и дилевцинови сортиращи домени, поради което докторантката си поставя за цел да изследва конкретно значението на тези домени за правилното клетъчно разпределение на белтъка и нормалното функциониране на РЕП. Значението на дисертацията се определя както от ненапълно изяснените функции на Best1, така и от неясните механизми на патогенезата на BVMD.

Оценката ми за цялостния дисертационен труд е, че той е написан професионално и с ерудиция като се позовава на голям брой (250) литературни източници. Във връзка с литературата имам следната забележка: В автореферата липсва списък на цитираната литература, поради което не винаги става ясно дали се представят собствени или чужди данни. Дисертационният труд е добре балансиран като най-обемната част от него е глава „Резултати“ (50 стр.). Литературният обзор е изчерпателен и задълбочен, подкрепен с подходящ илюстративен материал, което улеснява читателя. Методите са съвременни и адекватни на поставените цели. Използвана е подходяща статистическа обработка на количествените данни. Целите са точно формулирани, а резултатите сбито и ясно представени текстово и чрез 43 фигури. Дискусията е обективно направена в светлината на съществуващата литература и завършва с модел за патогенезата на BVMD в пациенти с мутации в сортиращите домени на Best1.

Докторантката е генерирала общо 8 точкови мутации в потенциални сортиращи домени на Best1, водещи до аминокиселинни замени в белтъка, които са описани за пациенти с BVMD. Една от мутациите (Q96R) е открита от авторския колектив, а мутация R25W е по-скоро в съседство, отколкото точно локализирана в дилевцинов сортиращ мотив на Best1. Единствено за тази мутация на Фиг. 33 не са представени данни за експресията на белтъка в MDCK клетки. Разбира се от имунофлуоресценцията става ясно, че белтъкът се синтезира в тези клетки, но въпросът ми е защо на имуноблотинга от Фиг. 33 това не е представено просто за пълнота и за лишаване на рецензентите от възможността да задават маловажни въпроси? Във връзка с изследваните мутации в Best1 имам още следния въпрос: Мутации Q96R и L100R са в съседство с остатък Y97 в един от потенциалните тирозинови

сортиращи мотиви. Защо не сте мутирали белтъка в позиция 97? Означва ли това, че няма описани мутации за Y97 в Best1 от пациенти с BVMD?

Противно на очакванията РПЕ клетъчни линии от човек и плъх се оказват неподходящ модел за изследване на клетъчното разпределение на Best1 и неговите мутантни форми. Като по-подходяща линия експериментите сочат MDCK-клетъчната линия, която е също епителна с бъбречен произход. Изследванията показват, че всички мутантни форми на Best1 с изключение на замената L207I проявяват по-голяма тенденция към апикална локализация в сравнение с дивия тип белтък като вариацията е с 6% до 16%. Измерванията са направени с количествен вариант на конфокалната микроскопия и са статистически достоверни съгласно *t*-теста на Стюдънт. Наблюдава се тенденция мутации в Best1, които са в отдалечени от мембраната домени на белтъка, да проявяват по-слаба тенденция към апикална локализация. От двата модела, предложени в литературата за структурата на Best1, тези данни подкрепят модела на Миленкович.

Интересни резултати са получени с трите мутанта на Best1 в позиция Y227. Освен замената на тирозина в тази позиция с аспарагин, която е наблюдавана в пациенти с BVMD, са изследвани още две замени - с глутаминова киселина и фенилаланин. Докато замената на тирозина с хидрофобния фенилаланин не променя нормалната базолатерална локализация на Best1 в РПЕ-клетки, то замената с отрицателно заредената глутаминова киселина и полярния (хидрофилен) аргинин водят до апикално изместване на белтъка. От това докторантката прави извода, че тирозин 227 трябва да бъде нефосфорилиран за правилна локализация на белтъка, тъй като най-вероятно отрицателният глутамат имитира фосфорилиране. Бих била по-предпазлива с формулирането на извод 3 и принос 2. Доколкото не са представени преки данни за ефекта от фосфорилирането на Y227, за мен е по-приемливо да се каже, че тирозинът в тази позиция трябва да бъде немодифициран. Възможно е не точно и не само фосфорилирането, но други пост-транслационни модификации (напр. сулфатиране) да контролират базолатаералната локализация на белтъка. Иначе приемам всички направени изводи и самооценката на докторантката за направените от нея научни приноси, както и предложения модел за патогенезата на BVMD.

Резултатите от дисертацията са публикувани в две международни списания с импакт-фактор (общ IF 3.224) и в две български научни издания като в 3 от публикациите докторантката е първи автор. Тя е представила своите изследвания на общо 4 научни форума с три постера и един устен доклад.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гл. ас. Веселина Москова-Думанова ни представя един ерудиран научен труд с безспорен принос към фундаменталната наука и клинична практика. Този труд е изпълнил своята образователна мисия и е намерил адекватно популяризиране в научните среди, отговарящо на изискванията на ЗРАСРБ и на допълнителните и препоръчителни критерии на БФ към СУ „Св. Климент Охридски“. Ето защо категоричното ми становище е, че Научното Жури има всички основания да присъди на гл. ас. д-р Веселина Светославова Москова-Думанова образователната и научна степен „Доктор“.

23 септември, 2014 г.

проф. Р. Миронова