

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. дбн Росица Конакчиева,

Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“

Върху дисертационен труд на тема: „Функционален анализ на болест-предизвикващи мутации в потенциални сортиращи мотиви на белтъка бестрофин-1 (Best1)“ на гл. асистент Веселина Светославова Московска-Думанова за придобиване на академичната степен "Доктор" в научно направление 4.3. Биологически науки (Клетъчна биология)

Рецензирането на материалите, представени в настоящата процедура, се основава на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилниците за неговото приложение, на Заповед № РД 38-323/26.06.2014 год. на Ректора на СУ „Св. Кл. Охридски“ за назначаване на Научно жури, и е съобразено с препоръчителните изисквания, приети от Академичния съвет на СУ“ Св. Кл. Охридски“ за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности.

Веселина Московска-Думанова е представила за процедурата по защитата всички необходими материали, справки и документи. Декларирам, че нямам конфликт на интереси, вкл. съавторство в публикациите на кандидатката.

Биографични данни

Веселина Московска-Думанова родена през 1975г. в гр. Варна и е завършила успешно висшето си образование в Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ през 1999г. като магистър по биология със специализация по клетъчна биология и биология на развитието. През същата година се е дипломирала и с втора специалност като учител по биология. От 2012г. е зачислена за докторант в самостоятелна форма на обучение към катедра „Цитология, хистология и ембриология“, Биологически факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“. Темата на дисертацията е: „Функционален анализ на болест -предизвикващи мутации в потенциални сортиращи мотиви на белтъка бестрофин-1 (Best1)“, а научен ръководител – проф. дбн Румен Панков. През 2014г. докторантката е отчислена с право на защита на разширен катедрен съвет. От 1999г. до момента Веселина Московска заема последователно позиции като асистент, старши асистент и главен асистент към Катедра „Цитология, хистология и ембриология“, където води интензивна преподавателска дейност. В периода 2008 – 2010г.

кандидатката е работила като изследовател в Департамента по генетика, Институт по зрението, Университет „Пиер и Мария Кюри“, Париж, Франция. Изследванията в настоящата дисертация са изработени в сътрудничество с Департамента по генетика и са били финансирани от Фонд Научни изследвания чрез Договор ДДВУ 02/10. По темата на дисертационния труд са публикувани четири статии (три в списания с импакт фактор) и са докладвани съобщения на четири научни форума. Не е представена справка за общ списък на публикациите, както и за участието в научни проекти, но и в този вид представените наукометрични показатели надхвърлят препоръчителните критерии на СУ.

Актуалност на разработвания проблем

Разработваният проблем, обект на дисертационния труд, е актуален от медицинска гледна точка, и подлага на изследване интересни молекулни модели с фундаментално и научно-приложно значение за клетъчната биология. Дисертацията е оригинален и мащабен по обем на обработения материал научно-експериментален труд, изпълнен с най-съвременни методи и генериращ ясно очертани научни приноси. Тя представлява един добър пример за важната роля на фундаменталния научен подход към молекулната основа на медицински заболявания, като утвърждава за сетен път потенциала на тези изследвания в намирането на индивидуални терапевтични подходи. Авторката е насочила вниманието си към категория наследствени дегенеративни заболявания на зрението под общото наименование *бестрофинопатии*. Проблемът има социално – значими измерения, тъй като въпреки сравнително ниската си честота, тази група заболявания води до прогресивна загуба на зрението при човека, което е свързано със силно понижаване качеството на живот на засегнатите индивиди. Всички бестрофинопатии се дължат на установени мутации в гена *BEST1*, който е отговорен за кодирането на интегралния базално-мембранен белтък бестрофин 1 в клетките на ретиналния пигментен епител. До момента са описани над 200 различни мутации в молекулата на белтъка, като функционалните изследвания върху тях са насочени основно към промените във функциите на белтъка като йонен канал, но не и към това, как тези мутации повлияват клетъчната му локализация. Тези нерешени проблеми са ангажирали вниманието на авторката на настоящия дисертационен труд.

Обща характеристика на дисертационния труд

Представената работа е организирана по възприетата схема, като е спазен добър баланс между отделните части. Трудът е написан на 140 стр., като е основно структуриран както следва: Съдържание и списък на съкращения - 3 стр, Въведение -

1 стр., Литературен обзор – 45 стр., Цел и задачи - 1 стр., Материал и методи - 9 стр., Резултати - 51 стр., Дискусия -15 стр., Изводи и приноси - 2 стр.; Библиография - 11 стр., списък на собствени публикации и участия в конгреси – 2 стр. Онагледена е с 57 фигури, в това число 14 илюстриращи схеми, 33 панела с голям брой собствени микрофотографии, 9 смесени фигури представляващи графики и резултати от експресионни анализи допълнени със снимков материал. Трябва да се отбележи високото качество на включените конфокални микроснимки, които са не само убедителен илюстративен материал, но и затвърждават общото впечатление за прецизно извършена изследователска работа. Литературната справка включва 250 източника, като преобладават автори след 2000 година, публикувани в реномирани медицински и биологични издания. Авторефератът е изготвен старателно на 18 страници и отговаря на изискванията, като съдържа въведение в проблема, основните моменти от методичната част, резюмирано описание на получените резултати и илюстрация на най-важните от тях, дискусия и приноси.

Оценка на литературния обзор

Литературният обзор обхваща четири раздела, последвателно въвеждащи в биологията на зрението и физиологичната роля на ретиналния пигментен епител, основните заболявания характеризирани като бестрофинопатии, подробна и насочена характеристика на гена *best1* и информация за установените функции на неговия продукт – белтъка бестрофин 1. На последно, но не по значение място за извеждане мотивите на дисертационния труд, са разгледани основните механизми, отговорни за поддържане на клетъчната поляризация, сигналните пътища и модели за апикалното и базолатералното сортиране на трансмембранните белтъци в полярните клетки. Информацията е изложена компетентно и в достатъчен обем, като показва добра теоретична осведоменост по темата на дисертацията.

Цел и задачи на дисертационния труд

Проучванията, предприети в дисертационния труд са насочени към значението на няколко мутации, описани при пациенти с един вид заболяване - Вителиформна макулна дегенерация на Бест (BVMD), които засягат потенциални сортиращи домени в молекулата на бестрофин 1. Подходът е оригинален и засяга непроучен аспект от функциите на бестрофина, което е свидетелство за задълбочена теоретична подготовка и способност за самостоятелно научно търсене. На верифициране е подложена хипотезата, че неправилното насочване и локализиране на бестрофин 1 извън базолатералната област на клетъчните мембрани, е причина за увреждане във функциите на клетките на ретиналния пигментен епител и води до появата на

патологични състояния. Съгласно тази хипотеза е дефинирана ясно и целта на изследването, а именно – да се извърши функционален анализ на различни мутантни форми на белтъка Best1, носещ мутации, установени при пациенти с Вителиформна макулна дистрофия на Бест, и засягащи предполагаеми сортиращи домени на белтъка. Като специфична цел, свързана с получаването на резултати, авторката е определила създаването на молекулярен модел за участието на тези мутации в патогенезата на заболяването.

Съгласно ясно формулираната цел са посочени шест задачи, които са правилно подбрани и очертават последователен научно-експериментален подход за постигане на поставената цел, а именно:

1. Да се подбере подходящ вектор и да се създаде набор от конструкти, експресиращи човешки BEST1 и различни мутантни форми на белтъка.
2. Да се установи подходяща клетъчна линия като моделна система за експресия на Best1, като тя се характеризира по отношение на:
 - ендогенна експресия на иРНК и белтъка Best1;
 - сортиращите механизми и клетъчната поляризация.
3. Да се създадат преходно трансфектирани клетъчни линии от избраната моделна система, като се докаже експресията на нормалния и мутантните белтъци в тях, както и клетъчната им локализация.
4. Да се създаде метод за количествен анализ на получените резултати.
5. Да се определи влиянието на фосфорилирането на Best1 върху неговата клетъчна локализация.
6. Да се определи влиянието на Best1 върху клетъчната йонна пропускливост и транс-епителния потенциал.

Оценка на глава Материал и методи

Разделът е изложен върху девет страници и отразява изработването на значителен по обем и богат в методично отношение експериментален материал. Методите са описани добросъвестно и подробно, което позволява тяхното възпроизвеждане и включват набор от съвременни техники. Свободното боравене с терминологията и подробното описание на методите говорят за натрупания от дисертантката богат експериментален и методичен опит. Наред с по-често използваните методи за клетъчно култивиране, имунопреципитация и имноблотинг,

измерване на трансепителна резистентност и микроскопски анализи, особени достойнства на работата придават използваните методи за ДНК секвениране на човешкия BEST1 ген и клониране на различните мутантни форми във вектор pReceiver, стабилна трансфекция на клетки, експресионен анализ посредством Real-Time PCR и конфокална микроскопия, с референтни маркери за плътни контакти ZO-1 и базолатерален маркер β -catenin. За различните експерименти са използвани голям брой клетъчни култури на следните клетъчните линии: RPE-1 (човешка, с произход от РПЕ), RPE-J (плъша, с произход от РПЕ), MDCK (бъбречен епител от куче), HeLa (човешки цервикален карцином) и HEK293 (ембрионален човешки бъбрек), подходящо подбрани за постигане на експерименталните цели.

Оценка на получените резултати

Резултатите от дисертационния труд са изложени обстойно върху 51 страници и следват адекватно поставените задачи. По-важните от тях могат да бъдат обобщени по следния начин:

1. Чрез сравнителни изследвания върху няколко клетъчни линии е установено, че епителната линия MDCK е най-подходяща като моделна система за изследване на клетъчната поляризация и сортиране на белтъка бестрофин1 и негови мутантни форми.
2. Чрез конфокална имунофлуоресцентна микроскопия и морфометричен анализ е изследвана локализацията на BVMD – свързани мутантни форми на Бест-1 (Y85H, Q96R, L100R, L207I, Y227N, R25W). Чрез сравнително използване на маркери за клетъчна поляризация само в случая на мутантния белтък p.L207I е установено поляризирано разпределение, аналогично на това на нормалния бестрофин. Конфокалната микроскопия в направление X-Z на отделните клетки показва повишен сигнал на апикалната повърхност за мутантите p.Y85H, p.Q96R, p.L100R и p.Y227N, в сравнение с нормалния Best1. В резултат на тези експерименти е доказано, че мутации в предполагаемите сортиращи мотиви повлияват базолатералната локализация на Best1 в поляризирани MDCK клетки, което потвърждава хипотезата на авторката.
3. Достойнство на дисертацията е разработването на оригинален метод за количествена оценка на апикалната експресия на изследваните мутантни белтъци на базата на конфокални образи и пикселивия интензитет на флуоресцентно оцветяване, който потвърждава с математически израз наблюденията от конфокалната микроскопия.

4. Чрез комбинация от споменатите вече методи е установено, че за правилната мембранна локализация на бестрофин1 е необходимо белтъка да не е фосфорилиран по тирозин в позиция 227.
5. В стабилно трансфектирани MDCK клетки Best1 повлиява трансепителната резистентност, което потвърждава неговата роля като йонен канал и тези експерименти са своеобразна положителна контрола на проведеното проучване.

Оценка на раздел Дискусия

Дискусията на получените резултати е представена върху 14 страници и свидетелства за способността на дисертантката да анализира критично собствените си данни, съпоставяйки ги с публикувани от други автори съобщения. Приятно впечатление прави подробната сравнителна интерпретация на характеристиките и локализацията на мутантните форми на протеина свързани с BVMD. Получените резултати са дискутирани в светлината на съществуващите модели за мембранната локализация и топология на бестрофин 1 и подкрепят поставената хипотеза, че нарушеното сортиране и локализация на белтъка Best1 в поляризирани епителни клетки може да е фактор в патогенезата на Вителиформната макулна дегенерация на Бест. Въз основа на богатия експериментален материал са изведени четири извода с оригинален характер, които коректно отразяват получените резултати и приемам по същество.

Заклучение

Рецензираният дисертационен труд отразява задълбочена самостоятелна научна разработка, реализирана с широк арсенал от методи на клетъчната и молекулярната биология, които са позволили реализирането на научни приноси чрез получаването на информация на най-съвременно научно ниво. Използвайки последователен и целенасочен подход изследванията са довели до получаването на оригинални научни данни с фундаментално и медико-приложно значение. Имайки предвид професионалните качества на дисертантката и научните постижения в настоящия труд, в съответствие с критериите на Биологически факултет при СУ „Св. Климент Охридски“, изразявам своята положителна оценка за представения дисертационен труд и убедено препоръчвам на членовете на Научно жури, назначено със заповед № РД 38-323/26.06.2014 год. на Ректора на СУ да присъдят на гл. ас. Веселина Московска-Думанова научната и образователна степен "Доктор".

*Дисертация за академична степен „Доктор“
на Веселина Москова, БФ –СУ „Св. Кл. Охридски“*

Рецензия от проф. дбн Росица Конакчиева

03.10.2014 год.

Рецензент:

проф. дбн Росица Конакчиева