

## РЕЦЕНЗИЯ

От чл. кор. проф. Румен Георгиев Панков дбн, катедра „Цитология, хистология и ембриология, Биологически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски”

на дисертационен труд на тема: **„Изследване на взаимодействието на белтъка бестрофин-1 с моделни мембранни структури и поведението му в еукариотни клетки”** от асистент Кирилка Стефанова Младенова за получаването на образователната и научна степен „Доктор”

Научни ръководители: член кор. проф. Здравко Лалчев, дбн и доц. д-р Йордан Думанов

### 1. Съвременно състояние на научния проблем и актуалност на дисертационната тема

Бестрофинопатиите обобщават група от дегенеративни наследствени заболявания, дължащи се на мутации в гена *BEST1*. Продуктът на този ген - мембранный белтък бестрофин 1 е разположен по базалната мембрана на ретиналните пигментно-епителни клетки, където участва в преноса на йони. Освен тази основна функция има съобщения за значението му при провеждане на сигнали (в нервната система), при транспорт на някои молекули (като  $\gamma$ -аминобутирилова киселина (GABA) и глутамат), както и участието му в развитието на окото. Макар и сравнително редки, бестрофинопатиите водят до прогресивна загуба на зрението, което е свързано със силно снижаване качеството на живот при засегнатите пациенти. Това определя и нарастващия интерес към този вид генетични заболявания. До момента са описани над 200 мутации в *BEST1*, като повечето от тях са точкови и са съсредоточени на няколко „предпочитани“ места в белтъка. Въпреки интензивните проучвания на установените мутации, патогенният механизъм на много от тях е все още неясен. Това се дължи на все още липсващите данни за структурата на бестрофин 1, биохимчните му характеристики, точното му мембранно разположение, както и на детайлните му функции. Предложената ми за рецензиране дисертационна работа цели попълването на част от тези липсващи данни и поради това мога да я определя като актуална и значима както от фундаментална, така и от практическа гледна точка.

## 2. Оценка на структурата, задачите и тяхното съответствие с поставения научен проблем

Дисертационният труд е структуриран по общоприетия начин, като е спазен добър баланс между отделните раздели. Представени са частите „Увод” (2 стр.); „Литературен отбор” (30 стр.); „Цел и задачи” (1 стр.); „Материали и методи” (12 стр.) и „Резултати и дискусия” (39 стр.). От извършената експериментална работа са направени 8 основни извода и са изведени 4 оригинални приноса. За разработването на труда са използвани и цитирани 209 актуални литературни източника, всички от които са на латиница. Представени са и научните публикации, отразяващи резултатите от изследването, съобщенията на научните форуми и забележителните цитати.

Основната цел на труда – „...да се изследва връзката между структура и функция на hBest1...” очертава основната насока на изследването и макар и пространно, е добре прецизирана чрез последващо изброяване на конкретните въпроси, подлежащи на проучване. Формулираните пет конкретни задачи напълно съответстват на поставения научен проблем и ясно очертават периметъра на планираните изследвания

## 3. Оценка на съответствието на методичните подходи с поставените цели

В дисертацията са използвани широк набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на набелязаните задачи. Тук трябва да отбележа доброто впечатление, което прави интердисциплинарността на използваните методични подходи. В експерименталната работа са приложени методи от областта на биохимията (афинитетна и молекулно-ситова хроматографии, FPLC, SDS-PAAGE, Western blotting др.), физикохимията (измерване на хистерезисни  $\pi/A$  изотерми на свиване и разширяване, Брюстеръглова микроскопия, атомно-силова микроскопия, инфрачервена спектроскопия и др.) и клетъчната биология (клетъчно култивиране, трансфекция, имунофлуоресценция, МТТ тест, измерване на трансепителна резистентност и др.). За по-специфичните методи е представено и общо описание на същността на метода, както и онагледяване с пет подходящи схеми. Това улеснява четящия и демонстрира доброто познаване на методите от докторантката. Техниките са описани ясно и подробно, могат да бъдат възпроизведени без използването на други източници. Адекватността на използваните методи е добра гаранция за постигане на поставените цели.

#### 4. Оценка на съответствието на теоретичната обосновка с експерименталните решения, резултатите и изводите

##### *Литературен обзор*

Прегледът на литературата е представен в седем основни раздела. Те са посветени на устройството на човешкото око, характеризирание на различните видове бестрофинопатии, описание на структурата на гена *BEST1* и клетъчната поляризация. Логично, най-голямата част от обзора (три раздела) е свързана с описание на известната информация за белтъка бестрофин 1, като са представени най-съвременните данни за структурата, функциите и регулацията на белтъка. Голямото количество информация е добре систематизирано, обобщено и онагледено с 9 подходящи фигури. От представянето на обзора е видно, че докторантката познава много добре научната литература, може да си служи компетентно с нея и да я представи на ясен и добър български език. Този раздел е в добра логическа връзка и въвежда удачно читателя към изложените експериментални резултати и обсъждането им.

##### *Резултати, дискусия и изводи и приноси*

Извършените експерименти, получените резултати и направените изводи могат да бъдат обобщени в четири основни групи, които отговарят и на направените приноси.

Първата включва разработване на методи за получаване на пречистен човешки бестрофин 1 от стабилно трансфектираната линия MDCK-hBest1. Тази линия е разработена и охарактеризирана от докторантката в рамките на дипломната ѝ работа. Коректното функциониране на трансфектирания белтък, прави тази линия удобен източник за изолиране на бестрофин 1. Използвайки този факт и прилагайки последователно афинитетна и молекулно-ситова хроматографии докторантката получава достатъчни количества пречистен бестрофин 1, необходим за последващите изследвания.

Втората група включва резултати свързани с определяне на елементите на вторичната структура на hBest1 и ролята на  $Ca^{2+}$  при тяхното формиране. Чрез използването на инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация е показано, че вторичните структурни елементи на hBest1 включват 51.1% спирални участъци:  $3_{10}$ -спирали (27.2%) и  $\alpha$ - и къси спирали (23.9% общо). След добавянето на калциеви йони общото количество спирални участъци се увеличава до 59.2%, като причина за това е основно нарастването на съдържанието на  $\alpha$ -спирали. Получените резултати за човешкия бестрофин 1 са оригинални, ясно демонстрират чувствителността на белтъка

към  $\text{Ca}^{2+}$  и добре корелират с публикуваните данни за бактериалния и пилешкия аналози на този белтък.

Третата група резултати обобщава изследвания на повърхностните физикохимични характеристики и морфология на Лангмюири монослоеве и Лангмюир-Блоджетови филми от пречистен hBest1 със или без участието на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA. Чрез измерване на хистерезисни  $\pi/A$  изотерми на свиване и разширяване и при използване на Брюстеръглова микроскопия и атомно-силова микроскопия са получени оригинални данни, като от тях бих искал да открия тези, свързани с взаимодействието на бестрофин 1 с 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) в ЛБ филми. Резултатите показват, че включването на hBest1 в субфазата на монослоя не води до дълбочинно проникване на протеина, а по-скоро взаимодействието се извършва в зоната на главите на липидния монослой. Демонстрираните способности на белтъка да индуцира реорганизация в латералната структура на монослоя най-вероятно е важна предпоставка за взаимодействията на бестрофина с мембранните фосфолипиди в условия ин vivo.

Последната, четвърта група резултати описват създаването и охарактеризирането на клетъчна линия, произлизаща от ретинален епител, която стабилно експресира hBest1. Получената линия показва снижена пролиферативна активност, но по-бързо достига максимални стойности на трансепителна резистентност от родителските нетрансфектирани клетки. Считаю, че след пълното характеризирание на трансфектираните клетки, линията може да се превърне в много подходяща моделна система, аналог на нативните ретинални пигментно епителни клетки. Използването на подобна моделна система, каквато липсва в момента, ще създаде възможности за по-прецизни бъдещи изследвания на функциите на човешкия бестрофин 1.

От проведените експерименти са направени осем извода и са формулирани четири приноса, които са подкрепени от представените експериментални данни и с които съм напълно съгласен.

## 5. Техническо оформление и въпроси

Технически дисертацията е оформена прегледно, написана е на много добър и приятен за четене български език и е онагледена с подходящ илюстративен материал – 41 фигури (от които 26 илюстриращи резултатите) и три таблици.

Авторефератът правилно отразява основните резултати на дисертационния труд.

Към докторантката имам следните въпроси:

1. Възможно ли е снижената пролиферация на трансфектираните RPE клетки да се дължи на повишено отмиране на клетките. Имате ли данни за нивата на апоптоза при тези клетки?

2. В дискусиата изказвате предположение, че трансфектирания hBest1 може да повлияе върху пролиферативната активност на клетките. Може ли да спекулирате, какъв е възможният молекулярен механизъм по който може да се осъществи този ефект?

#### 6. Наукометрични показатели

Резултатите от дисертацията са публикувани в три научни статии (две от които с общ импакт фактор 4,91) и са представени на три научни конференции. Въпреки скорошното публикуване на статиите вече има забелязани две цитирания, което още веднъж показва високата научна стойност на извършените изследвания. Постигнатите наукометрични показатели напълно покриват и дори надхвърлят изискванията на ЗРАСРБ и препоръчителните критерии на Биологически факултет при СУ „Св. Климент Охридски“.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основните постижения в дисертацията на асистент Кирилка Стефанова Младенова са оригинални и с приносен характер. Представеният труд, без съмнение характеризира своята авторка като компетентен и изграден изследовател, който има знанията, уменията и компетентностите да решава самостоятелно научни проблеми в областта на молекулярната биология. Имайки предвид интердисциплинарния подход, стойността, актуалността и международният отзвук на научните резултати напълно убедено давам своята положителна оценка и препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури, да присъди на ас. Кирилка Младенова образователната и научна степен ”Доктор” по научната специалност „Молекулярна биология”.

01.02.2017 г.

София

Рецензент:

(чл. кор. проф. дбн Румен Панков)