

## С Т А Н О В И Щ Е

за дисертационния труд на асистент Кирилка Стефанова Младенова, Катедра „Биохимия”, Биологически факултет, СУ “Св. Климент Охридски”, на тема “Изследване на взаимодействието на белтъка бестрофин-1 с моделни мембранни структури и поведението му в еукариотни клетки” за присъждане на образователната и научна степен “доктор” по 4.3. Биологически науки (Молекулярна биология)

От доц. д-р Румен Годоров, секция „Повърхности и колоиди” при Институт по физикохимия „Акад. Ростислав Каишев”, БАН

Предложеният дисертационен труд е посветен на биохимични и физикохимични изследвания, свързани с проучване на структурата и функцията на белтъка бестрофин-1, повърхностната динамика на фазова граница въздух/разтвор, конформация и олигомеризация, във връзка с изучаване на функционалната активност на белтъка и молекулярните механизми, водещи до дегенеративни заболявания на ретината. Работата по дисертацията е планирана и изпълнена на високо ниво, при съчетаване на адекватно подбрани методи за трансфекция, култивиране и определяне на трансепителна резистентност на клетъчни култури, изолиране и пречистване на протеини, протеомен анализ чрез електрофореза, имуноблот и инфрачервена спектроскопия с Фурие-трансформация (FTIR). Специално внимание искам да обърна на оригиналното изследване на повърхностната активност на Лангмюрови монослоеви от трансмембрания белтък бестрофин-1 и на взаимодействието на белтъка с моделни мембрани (фосфолипиден монослой) в комбинация с Брюстър-ъглов (BAM) и атомно-силов (AFM) микроскопски анализ.

Дисертацията на ас. Младенова е структурирана в раздели, следващи общоприетата схема – увод, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и дискусия, изводи, приноси и използвана литература. Тя включва 102 страници, 41 фигури, 3 таблица и литература от 209 заглавия на английски език.

В дисертацията са получени редица оригинални резултати, които определят научна й стойност. От тях бих открил:

- Получената е нова стабилна клетъчна линия от ретинални епителни клетки, експресираща човешки бестрофин-1. Определени са морфологичните характеристики и влиянието на експресирането на белтъка върху метаболизма и жизнения цикъл на трансфектираните клетки.
- За първи път е разработен метод за получаване на пречистен човешки бестрофин-1 от стабилно трансфектирана клетъчна линия, което е позволило, чрез FTIR, да бъдат определени елементите на вторичната структура на белтъка и да се опишат регистрираните промени, предизвикани в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  йони.
- Изследвани са повърхностните характеристики на Лангмюрови монослоеви от човешки бестрофин-1 и са определени ефектите в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , глутамат (Glu) и гама-аминобутирилова киселина (GABA), имащи съществена роля при

взаимодействието между белтъка и липидните домени в състава на клетъчната мембрана. Показано е, че прибавянето на  $\text{Ca}^{2+}$  йони към водната фаза води до изместване на изотермите към по-ниски, а на Glu и GABA, съответно към по-високи площи и са установени промени в заеманата от белтъка площ на междуфазовата граница въздух/разтвор.

- Изследвана е морфологията на формираните монослоеве чрез ВАРМ и са регистрирани напълно хомогенни филми от бестрофин-1 и при добавка на GABA във водната подложка, докато в присъствие  $\text{Ca}^{2+}$  и Glu филмите са хетерогенни, съдържащи газова и кондензирана фаза.
- Чрез ВАРМ е установена морфологията на Лангмюирови монослоеве от РОРС (палмитолеил фосфатидилхолин) и смесени бестрофин-1/РОРС филми в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA. Ефектите на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA върху уплътнените РОРС филми водят до поява на множество ярки домени от кондензирана фаза. При смесените липид/протеинни филми след компресия се наблюдава флуидна фаза и липидни домени с по-висока плътност.
- Посредством АФМ е установена топологията на Лангмюир-Блоджетови филми от бестрофин-1 и смесени бестрофин-1/РОРС филми в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA. За протеинния филм са установени размерите и формата на бестрофин-1, които нарастват в присъствие на Glu и GABA, докато при добавяне на  $\text{Ca}^{2+}$  се наблюдава димеризация. При смесените липид/протеинни филми е регистрирано нарастване на размера на бестрофин-1 и незначително влияние на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA, добавени към водната фаза.

В края искам да отбележа, че е налице едно оригинално по идея, добре премислено и извършено научно изследване. Приемам получените резултати и приноси в настоящия труд като напълно достоверни. Основните ми забележки са върху

- отсъствие в литературния обзор на преглед върху изследвания на повърхностните характеристики на протеинни и смесени липид/протеинни монослоеве предвид, че основна част от получените резултати са в тази област;
- лаконичност в интерпретацията на резултатите от монослойните изследвания.

Представената дисертация прави много приятно впечатление с минималния брой печатни грешки, но бих отбелязал, че на титулната страница е останал надписът „Проект за дисертация” и липсва информация, както и в Автореферата, за научното направление на работата.

Във връзка с представените резултати бих искал да задам следните въпроси:

1. Какво предимство дава използването на молекулно-ситова хроматография като втора стъпка за пречистване след афинитетна хроматография?
2. Пробите на стартове 1-9 на Фиг. 17А, кои фракции от Фиг. 16 съдържат?
3. Как ролята на РОРС като „ануларен липид” може да е причина за регистрираните по-големи размери на бестрофин-1 в смесените липид/белтъчни монослоеве и какъв може да е очаквания ефект в липиден бислой?

Получените от ас. Кирилка Младенова резултати представляват принос в изясняване на ролята на структурата и функционалната активност на белтъка бестрофин-1 в изучаване на молекулярните механизми, определящи патогенезата при различни макулни дегенерации. Те са публикувани в три статии, две от които в специализирани международни списания с IF.

Резултатите са докладвани на 3 научни форума у нас и в чужбина. Справка в базите данни ISI Web of Knowledge и Scopus показва, че една от публикациите е цитирана 2 пъти и това ми дава основание да считам, че резултатите от дисертацията са получили и международно признание. Трябва да се отбележи, че представените публикации надхвърлят допълнителните критерии на Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски” за придобиване на образователната и научна степен „доктор”.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представения труд, с използване на многобройни съвременни методи, са получени оригинални и със съществена научна стойност резултати, което ми дава основание да го определя като дисертабилен и напълно отговарящ на изискванията на ЗРАСРБ. Давайки своята положителна оценка, убедено препоръчвам на почитаемото Научно Жури, да присъди на асистент Кирилка Стефанова Младенова образователната и научна степен „доктор” по направление 4.3. Биологически науки (Молекулярна биология).

3.02.2017 г.

София

Член на журито:

/доц. д-р Румен Тодоров/