

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. д.б.н. Диана Христова Петкова

Член на Научно жури съгласно Заповед № РД 38-595/31.10.2023 г. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ на дисертационния труд на проф. д-р Йордан Атанасов Думанов

„ Самоорганизация и повърхностни свойства на hBest1 в модели на биологични мембрани“

представен за присъждане на научната степен „ Доктор на науките“ в Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, Професионално направление 4.3. Биологически науки (Молекулярна биология)

Кратки биографични данни

Проф д-р Йордан Атанасов Думанов е роден през 1973 г. в г.Банско . През 1999 г. завършва Софийския Университет „ Св. Климент Охридски” специалност Биология със специализации – Клетъчна биология и биология на размножаването и Учител по биология. От 2001г. е докторант в университета Хохенхайм, Щутгард, Германия, където успешно защитава дисертация на тема „ Идентифициране на базолатералния сортиращ сигнал в цитоплазмения домен на интерлевкин-6 сигналния преносител gp130” през 2006 г. След защитата на дисертацията си постъпва на работа в катедрата по Биохимия, СУ „ Св. Климент Охридски“ като асистент през 2007 г. От 2015 г. е доцент, а от 2021 г.- професор в същата катедра. Проф. Й. Думанов е бил неколккратно в чужбина на специализации във водещи лаборатории в областта на биохимията и молекулярната биология в Германия, Франция и Испания, което се е отразило положително на неговата научна квалификация. Понастоящем проф. Й. Думанов е преподавател към Катедрата по Биохимия към Биологически факултет , СУ“Св. Климент Охридски“ . Чете лекции по основни курсове не само към Биологически факултет, но към Физически факултет на Университета. Проф. Й.Думанов е участвал в Държавни изпитни комисии при защити на дипломни работи, към катедрата по Биохимия, бил е член на журита за избор на гл. асистенти към СУ, МУ- Варна, ИМБ-БАН, както и рецензент на международно списание. Член е на Съвета на специалностите ЕООС (Биологически ф-т) и Оптометрия (Физически факултет), както и член на Управителния съвет на НИС (СУ) . До сега проф. Думанов е публикувал 64 научни статии с общ ИФ 157.06 , които са цитирани 183 пъти в световната научна литература. Участник е в 20 научни проекта като на 6 от тях е ръководител. Под неговото ръководство са защитили 9 дипломни работи на 7 от които е ръководител. Съръководител е на 4 докторанта, от които 3 са успешно защитили, а 1 е отчислен с право на защита. Част от тези дисертации са свързани с темата на представения му труд за доктор на науките.

Информация за документацията свързана с дисертационния труд и автореферата.

Всички документите свързани с процедурата по защитата, както и дисертацията и автореферата отговарят напълно на изискванията на ЗРАСПБ и Правилника за неговото приложение. Дисертацията обхваща 196 страници, цитирани са 294 литературни източници. Получените резултати са представени чрез 3 таблици, 54 фигури и 30 приложения. Дисертацията обхваща следните раздели: Въведение, Литературен обзор, Цели и задачи, Материали и методи, Резултати и дискусия, Изводи, Приноси и Използвана литература. Резултатите по дисертацията са публикувани в 16 статии в списания с ИФ (9 Q1; 3 Q2; 2 Q3 и 2 Q4) и в две в списания без ИФ. Общият ИФ на публикуваните статии е 62.303, за които са установени 44 цитирания в световната литература. Проф. Думанов е участвал със своите резултати в няколко научни форума. Авторефератът на дисертационния труд е 63 стр. и напълно отговаря на структурата и съдържанието на дисертацията като отразява основните резултати. При направената справка за съответствие с минималните национални изисквания на научната степен „доктор на науките“ в дадената област се установява, че по групите показатели проф. Думанов покрива изискуемите точки по показатели А, Б и Г, а по показатели в група Д надхвърля необходимите точки - при необходимости 100 т. те са над 160.

Актуалност на проблема

Зрението е едно от основните сетива, чрез които хората възприемат околния свят. Светлината се приема от ретината на окото, която е изградена от различни видове клетки, които приемат светлината от околния свят, преработват я и изпращат в мозъка за да може организма да отговори адекватно на настъпилите промени. Едни от клиничните патологии при нарушения на зрението са свързани с мутации на гена *BEST1* наречени „бестрофинопатии“. Тези промени водят до патологични дегеративни състояния на макулата. Пациентите с такива патологии са с нарушено зрение като далекогледство, кривогледство, деформация на очната ябълка и глаукома. Тези патологии са с много голям социален ефект и изясняването на причините за дегеративните състояния на макулата са много актуални и с голяма социална значимост. Ето защо считам, че представената дисертация се отличава с оригиналност на темата, на методите с които са проведени изследванията и със своята актуалност. Дисертацията се основава на голям брой генетични, биохимични, биофизични, физикохимични и молекулярно-биологични изследвания за изясняване на връзката между структурата и функцията на каналния белтък hBest1 и тяхното патофизиологично значение.

Основните резултати в дисертацията според мен са следните:

1. Изследвани са няколко вида клетъчни линии за да се докаже експресията на белтъка и възможността за сортирането на hBest1 и е установено, че най-удачния модел е клетъчната линия MDCK II. При тази клетъчна линия лесно може да се разграничат апикалните и базолатералните домени, което е от съществено значение за бъдещите изследвания и е доказано, че hBest1 е преференциално локализиран на базолатералната мембрана на клетките.

За да се определят причините за локализация на белтъка в базолатералната мембрана са генерирани hBest1 мутанти чрез място-специфична мутагенеза при базолатералните тирозинови и дилевцинови сортиращи мотиви, тъй като такива мутации са наблюдавани при пациенти с дегенеративни състояния на макулата. Получените мутантни клетки показват промяна на локализация на белтъка в посока на апикалните домени. Чрез тези изследвания е доказано кой е на-важния мотив за правилната локализация на белтъка, което е от значение за неговото правилно функциониране. Процесите на фосфорилиране имат съществено значение за правилната локализация на протеина като нефосфорилирания тирозин в изследваните мотиви е един от основните фактори.

За да се продължат изследванията е създадена клетъчна линия MDCK II стабилно трансфектирана с hBest1. Получената клетъчна линия се характеризира със силен сигнал за hBest1, правилно локализиран белтък в клетъчната мембрана, който не променя растежния профил и морфологията на клетките в сравнение с изходната клетъчна линия, както и времето на поляризация. При проследяване на промените на трансепителната резистентност (TEP) при процесите на поляризация са наблюдавани близки стойности с изходната клетъчна линия, която се е понижавала след четвъртия ден на култивиране. След седмия ден на култивиране трансепителната резистентност се е повишавала в сравнение с изходната клетъчна линия. Тези промени са обяснени с промяната на потоците на йони в извънклетъчното пространство дължащо се на наличието на голямо количество белтък hBest1 в плазмената мембрана. Повишените нива на белтъка обясняват и промените в резистентността на клетките, тъй като се променят плътните контакти от изменените нива на йонната проводимост. Поради влиянието на Glu, GABA и АТР върху функционалната активност на hBest1 е изследвана TEP при MDCK II-hBest1 в присъствие на тези съединения. При третиране на новата клетъчна линия с Glu и GABA са установени по-високи стойности на TEP поради намаление активността на hBest1, докато АТР активира белтъка и това води до намаление на TEP.

2. За да се проследи влиянието на реорганизацията на мембранния бислои върху ролята на hBest1 за трансепителната резистентност изходната и трансфектираната клетъчна линия са третирани с sPLA₂. Резултатите от това изследване показват силно въздействие на фосфолипазата върху нетрансфектираните клетки, което води

до понижаване на TEP, докато при трансфектираните клетки се наблюдават много слаби промени. sPLA₂ предизвиква промени във фазовото състояние на клетъчните мембрани, което от своя страна повлиява структурата и функцията на hBest1 в посока инхибиране на каналната му активност и повишение на TEP.

3. Тъй като е известно, че функцията на трансмембранните белтъци зависи от липидното обкръжение е проучен липидния състав на клетъчните мембрани на двата вида клетки. Установено са повишени количества на фосфатидилинозитол, фосфатидна киселина, кардиолипин, лизофосфатидилхолин и лизофосфатидилетаноламин в сравнение с нетрансфектираните клетки. При нетрансфектираните клетки са наблюдавани завишени количества на неутрални липиди, фосфатидилхолин и фосфатидилсерин. Тези данни изясняват по-голямата устойчивост на трансфектираните клетки към действието на sPLA₂. Може да се предположи, че експресията на hBest1 е свързана с повишено съдържание на неламерарни липиди в мембраните и евентуалната роля на мутантните форми за ремоделиране на мембраните при патологичните състояния. Изследването на структурата на клетъчните мембрани на двата вида клетки доказва, че нивото на Ld домените при трансфектираните клетки е повишено в сравнение с нетрансфектираните, което е доказателство за по-голямата флуидност на мембраните при трансфектираните клетки. Това корелира с промяната на установения липиден състав при трансфектираните клетки. Чрез имунофлуоресценция е доказана локализацията на белтъка главно в Ld домените и активирането на белтъка се извършва преимуществено в по-неподредената фаза на мембраните.
4. Изследвана е експресията и локализацията на различни мутантни форми на hBest1 предизвикващи BVMD в MDCK II. Доказано, че тяхната локализация е нарушена в сравнение с нормалния белтък. При изследване на апоптозата клетките трансфектирани с дивия тип белтък показват по-висока преживяемост, докато при мутантните форми се повишава ранната и късна апоптоза. Установена е и промяна на локализацията на мутантните форми в клетъчната мембрана, което води до изменение в транспорта на йони и хомеостаза на клетките. Предположено е, че това се дължи на промяна в липидния състав на мембраните. Въз основа на тези изследвания е създадена и охарактеризирана нов вид стабилна клетъчна линия MDCK II- hBest1 експресираща дивия тип hBest1, която е използвана в следващите изследвания.
5. За да се проследи поведението на hBest1 в моделни мембрани белтъка е изолиран и пречистен от новополучената клетъчната линия MDCK II- hBest1. Установено е, че най-удачния метод е молекулно-ситовата хроматография в комбинация с афинитетна хроматография. Тъй като в литературата не съществуват данни за вторичната структура на белтъка след получаване на чистия белтък са анализирани елементите на вторичната структура на човешки белтък hBest1 чрез инфрачервена

спектроскопия с Фурие-трансформация. Тези изследвания доказват, че вторичната структура на белтък се състои предимно от спирални структурни елементи-главни и къси α -спирали, както и 3_{10} -спирали. След добавяне на Ca^{2+} са наблюдавани конформационни промени в посока увеличение на α -спиралните структури, което определя функционалната активност на белтъка.

6. Едни от моделите на мембранныя бислой са Лангмюировите монослое и Лагмюир-Блоджетовите филми. За да се определят повърхностните свойства на hBest1, както и влиянието на Ca^{2+} , Glu и GABA върху структурните и повърхностни свойства на белтъка е проследено поведението на белтъка в Лангмюировите монослое при физиологични условия. Установено е, че добавянето на Ca^{2+} , Glu и GABA води до промени в средната площ на молекулата. Определянето на най-ниската възможна площ, която може да заеме молекулата е доказало, че площта не се променя при наличие на Glu и GABA, докато наличието на Ca^{2+} води до значително намаление на площта. Това може да се обясни с промяна на молекулните електростатични взаимодействия, плътността на опаковане на молекулите, конформацията и ориентирането на молекулите на белтъка на фазовата граница буфер/въздух. Разликите в площта на молекулата при добавянето на различни агенти е доказателство, че белтъка променя организацията си, както и плътността на опаковане, което води до промени в неговата физиологичната активност. За да се изследват по-детайлно молекулните взаимодействия е проследен и хистерезисът на компресия-декомпресия на π/A изотермите. Тези изследвания доказват, че потъването на белтъка в субфазата е обратим процес и се дължи на преориентация и реорганизация на белтъчната молекула на повърхността на монослоя. Получените изображения с БАМ на монослоеве от чист белтък и в присъствие на Ca^{2+} , Glu и GABA доказват различия в плътността и опаковането, което се дължи на промяна на белтъчната конформация, белтък-белтъчните взаимодействия и самоорганизацията на фазовата граница въздух/буфер. За да се определят нанометричните промени в размерите, структурата и организацията на белтъчната молекула след третиране с Ca^{2+} , Glu и GABA е използвана атомна-силова микроскопия. Установени са: овална форма на молекулата на белтъка, латералните размери и височината на молекулата. Добавянето на Ca^{2+} води до промяна на вторичната структура и появата на стабилни пентамерни кристали. При добавяне на Glu и GABA не се наблюдава агрегиране на белтъчните молекули и те запазват първоначалната си форма. Това са първите такива изследвания в литературата за структурата и поведението на hBest1.
7. За да се проследи влиянието на фосфолипидите върху взаимодействието на белтъка с Ca^{2+} , Glu и GABA са проведени изследвания върху смесени монослое. Доказано е, че белтъка не се смесва с POPC на границата въздух/буфер. При компресия на монослоеве белтъчните молекули се предвижват към водната фаза, докато на повърхността остават основно липидните. Установен е и флуидизиращ

ефект на белтъчните молекули върху POPC монослоеве и повишена еластичност на смесените монослоеве. За да се избегне екструдирането на белтъка във водната субфаза изследванията са проведени при определени стойности на хистерезиса на двукомпонентните монослоеве. При добавяне на Ca^{2+} , Glu и GABA при тези условия не са наблюдавани статистически значими промени, което е индикация, че POPC елиминира ефектите на тези компоненти и всички промени в чисти монослоеве от изследвания белтък се дължат само на конформационни промени в белтъчната молекула. При изследване на смесваемостта на белтъка и фосфолипида е доказано, че белтъка не се смесва с POPC на повърхността на субфазата. Чрез AFM е проследена повърхностната морфология на смесените монослоеве. Установени са множество празнини и малки овални домени с по-висока плътност, които са равномерно разпределени в околния хомогенен филм. При добавяне на Ca^{2+} , Glu и GABA монослоя става напълно хомогенен, но се наблюдават равномерно разпределени ярки домени с различен размер, които вероятно се дължат на плътно опаковани молекули на POPC. Изследванията на чисти POPC монослоеве доказва, че присъствие на Ca^{2+} води до образуване на домени, докато такива образувания не се наблюдават при чистите монослоеве от белтък. Чрез AFM е установено промяна във формата и размерите на белтъчната молекула в смесени монослоеве, което предполага наличието на гранични липиди, които покриват хидрофобната повърхност на белтъка. Добавянето на Ca^{2+} , Glu и GABA в чисти монослоеве от белтък променят неговите повърхностни характеристики и размери, докато фосфолипида неутрализира действието им. Чрез BAM и AFM е доказано, че липид-липид и белтък-белтък взаимодействия са много по-силни от взаимодействията липид-белтък. От тези резултати може да се заключи, че Ca^{2+} , Glu, GABA и POPC повлияват не само каналните функции на hBest1, но и взаимодействието му с други мембранни компоненти и по този начин участват в поддържане на клетъчната хомеостаза.

Тъй като в клетъчните мембрани съществуват фосфолипиди, които повлияват физикохимичните свойства на мембрания бислой в друга посока за разлика от POPC са проведени изследвания на смесени монослоеве белтък / сфингомиелин. Смесените монослоеве са в същите отношения липид:белтък, както при тези с POPC. Доказано е, че двукомпонентните монослоеве не претърпяват фазов преход, и стойностите на π_{tr} не се променят при добавяне на Ca^{2+} , Glu и GABA. Добавянето на белтък води до флуидизиране на монослоя от SM. При компресия на филма се наблюдава екструзия на белтъка. Доказано е, че взаимодействията между SM и белтъка са много по-силни отколкото hBest1- hBest1 и SM- SM. При наличието на Ca^{2+} междумолекулните взаимодействия hBest1- SM се изравняват с тези на hBest1- hBest1 и SM- SM, което говори за пълно смесване или пълно фазово разделяне. Добавянето на GABA води до разделяне на белтъчните и липидните молекули, но този ефект намалява с увеличение на повърхностното налягане.

Предположено е, че Glu и GABA взаимодействат с полярната глава на SM, което води до отблъскване между молекулите на hBest1 и SM или до включване на Glu и GABA в бинарните слоеве. Доказано е, че общата свободна енергия на смесване на липида с белтъка не се влияе от добавянето на Ca^{2+} , Glu и GABA. Наблюдаваните разлики при взаимодействието на белтъка с SM или с POPC се дължат на различните структури на двата фосфолипида. Изводът е, че при смесените монослоеви белтък/SM съществуват силни белтък-липидни взаимодействия. Морфологията на бинарните монослоеви доказва компактни хомогенни структури на филмите. Добавянето на GABA не променя морфологията, докато Ca^{2+} води до частично разделяне на hBest1 и SM. Добавянето на Glu влияе много по-слабо на морфологията на монослоя. Ca^{2+} индуцира много по-силни белтък-белтъчни взаимодействия и промени в конформацията на белтъка при смесени монослоеви hBest1/POPC от колкото в hBest1/SM монослоеви. Всички тези резултати са доказателство за спонтанното смесване на белтъка и SM, което е свързано с афинитета между белтъка и SM в клетъчните мембрани.

8. За да се провери влиянието на кондензиращия ефект на холестерола върху поведението на белтъка са проведени експерименти с монослоеви с различен състав. При наличие на Ca^{2+} кондензиращия ефект на холестерола е по-ясно изразен като ефекта на Ca^{2+} е по-силен при смесените монослоеви от POPC/Chol. Чрез комбинация от експериментални и теоретични изследвания е доказано, че добавянето на Ca^{2+} не променя формата на изотермите, а ги измества в посока на по-ниска средна молекулна площ. Допълнителни изследвания са доказали, че действието на йоните върху смесените монослоеви се дължи основно на действието им върху молекулите на холестерола. Модулите на еластичност на монослоевите SM/Chol доказват, че те са в течно-кондензирана фаза. Наличието на Ca^{2+} леко дестабилизира монослоя. Чистите монослоеви от SM претърпяват преход LE-LC, но такъв преход не се наблюдава при смесените монослоеви от SM/Chol, което говори за добре смесване на двата липида и промяна на фазовото състояние от LE към LC. При смесени монослоеви от hBest1/Chol при промяна на налягането изотермите са близки до тези наблюдавани при монослоеви от чист белтък, докато повишение на налягането се доближава до тази на чистия холестерол. При добавяне на белтък към холестеролови монослоеви е наблюдавано намаление на подредеността на монослоя. Ca^{2+} и холестерола предизвикват повишение на подредеността на монослоевите от белтък, докато добавянето на белтък към холестеролови монослоеви води до намаление на подредеността на молекулите.
9. За да се проучи взаимодействието на белтъчната молекула с различни по физикохимични свойства мембранни домени са проведени изследвания върху трикомпонентни смеси от hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol. Доказано е, че при трикомпонентните монослоеви hBest1/POPC/Chol се наблюдава много добро смесване на компонентите и се запазва LE фазовото състояние. При hBest1/

SM/Chol монослоевете Ca^{2+} проявява кондензиращ и стабилизиращ ефект. Чистият монослой от SM претърпява LE-LC фазов преход, но при добавяне на белтък или Chol и белтък този фазов преход изчезва, което е доказателство за доброто смесване на фазите. Определена е степента на смесваемостта и фазовото разделяне при трикомпонентните системи. Въз основа на тези изследвания е доказано, че взаимодействията между белтъка и липидите са много по-силни от межумолекулните взаимодействия белтък – белтък или липид-липид при наличие на POPC. При добавяне на Ca^{2+} се наблюдава разделяне на отделните фази. Чрез метода на Гудрич е доказано, че смесването на белтъка и липидните молекули е спонтанно и термодинамично изгодно. Доказано, че наличието на холестерол подобрява смесваемостта и стабилността на смесените монослоевете в присъствие на POPC, тъй като намалява фазовото разделяне между белтъка и POPC, докато наличието на SM не променя смесваемостта и стабилността на монослоя. Стабилизирането на смесваемостта на белтъка / фазовото разделяне между белтъка и липидната фаза при наличие на холестерол оказва пряк ефект върху асоциацията и локализацията на белтъка в липидния бислой на клетъчните мембрани.

Заклучение

Представеният от проф. Йордан Думанов дисертационен труд и научните публикации към него, които са доказателство за оригиналността на представените резултати отговарят на изискванията на ЗРАСПБ, Правилника за приложението му, както и Правилника на СУ „Св.Климент Охридски“ за придобиване на научната степен „доктор на науките“. Този труд е плод на почти десетгодишна изследователска дейност свързана с проучване на структурата, взаимодействието и локализацията на белтъка hBest1 в мембранныя бислой с цел изясняване причините за промяна на неговата функция при патологични състояния. Изследванията имат интердисциплинарен характер, което е позволило на автора детайлно да проучи поставените си цели. Дисертационният труд се отличава с оригиналност на използваните методи – молекулярно-биологични и физикохимични. Считаю, че едно от най-големите постижения на автора е получаването и охарактеризиране на чист белтък hBest1, както и създаването на стабилна клетъчна линия експресираща белтъка. Без тези резултати не биха били възможни следващите проучвания представени в дисертацията. Въз основа на част от резултатите са защитени 4 дипломни работи и 3 дисертационни труда за научната и образователна степен „доктор“. Публикуваните статии в международни научни списания са намерили широк отзвук сред международната научна общност. Ето защо считаю, че представената дисертация е един завършен научен труд с оригинални научни резултати, които са уникални по своята същност и убедено предлагам на членовете на уважаемото научно жури да допусне до защита този дисертационен труд и да присъди научната степен „Доктор на

науките“ на проф. д-р Йордан Думанов в Област на висше образование 4,
Професионално направление 4.3. Биологически науки (Молекулярна биология).

14.12.2023 г.

Рецензент:

Проф. Диана Петкова