

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. д-р Румяна Цонева

Секция „Липид-белтъчни взаимодействия”

Институт по биофизика и биомедицинско инженерство - БАН

Относно представения дисертационен труд от Никола Йорданов Младенов, докторант в СУ „Св. Климент Охридски” Биологически факултет, Катедра „Биохимия”, по професионално направление 4.3 Биологически науки (Молекулярна биология – Клетъчна поляризация и мембрани) на тема: „**Взаимодействие на hBest1 с мембранни липиди и асоциирането му с детергент резистентни домени от еукариотни клетки**“ за защита.

Представеният проект включва: Увод - 2стр.; Литературен обзор- 35стр.; Цели и задачи - 2стр.; Материали и методи – 8стр., Резултати и дискусия – 52стр.; Изводи – 1 стр.; Приноси – 1стр. и Литературна справка, в която са цитирани 278 източника.

Темата на проекта за дисертация „**Взаимодействие на hBest1 с мембранни липиди и асоциирането му с детергент резистентни домени от еукариотни клетки**“ е актуална и напълно дисертабилна. Целта на дисертационния труд е да се изследват молекулните взаимодействия между hBest1 от една страна и сфингомиелин и холестерол от друга страна, във връзка с асоциацията на hBest1 с домените на клетъчната мембрана, влияещи върху биологичните му функции. Получените данни биха могли да бъдат използвани за изясняване на връзката структура-функция при hBest1 при различни патологични процеси, свързани с мутации в гена му.

Настоящия дисертационен труд е организиран и представен според приетите стандарти.

След кратък **Увод**, който запознава читателя със състоянието на поставения проблем и описва мотивацията за планираните научни изследвания, следва подробен **Литературен обзор**, в който последователно се разглеждат:

1. **Биологични мембрани** – като е обърнато особено внимание на теоретичните постановки за разбирането на структурата на клетъчната мембрана, включително и на съвременните възгледи за съществуване на липидна асиметрия и латерална хетерогенност обуславяща съществуването на подредени и неподредени участъци в

клетъчната мембрана и тяхната биологична роля. Изтъкната е структурната и функционална роля на основните липиди изграждащи предимно подредените участъци в мембраните като холестерол и сфингомиелин.

2. **Биологична роля на липидните рафтове** – тук се разглежда ролята на липидните рафтове в сигналната трансдукция, при взаимодействие на патоген-клетка, при развитието на рака, при белтъчното сортиране и други клетъчни процеси съпътстващи различни патологии като например болестта на Алцхаймер, Паркинсон, и глаукома.
3. **Мембранни белтъци** – разгледана е тяхната роля в различни клетъчни процеси, както и тяхната класификация според разположението им в липидния бислой. Обърнато е внимание на влияние на липидите върху конформацията на мембранните белтъци и на протеин-протеиновите взаимодействия, които от своя страна могат да доведат до различни функционални промени.
4. **Бестрофин и бестрофинопатии** - направен е подробен преглед на структурата, функциите и локализацията на бестрофина. Описани са и патологичните състояния дължащи се на мутации в гена отговорен за бестрофина.
5. **Подходи за анализиране на моделни мембранни системи** – описани предимствата при използването на моделни системи като Лангмюирови монослоеви, Брюнстер-ъглова микроскопия и флуоресцентни сонди при изследване на латералното фазово разделение на липидите.
6. **Подходи за анализиране на биологичните мембрани** – отделено е подобавъчно внимание на методологията използваща детергенти за разделяне на мембранните компоненти в детергент-резистентни и детергент-разтворими фракции, както и на използването на различни флуорофори за оценка на мембранната кондензация.

Литературният обзор е задълбочен, изчерпателен и много добре структуриран. Направен е компетентно, което показва, че авторът е запознат и борави добре със съвременната информация отразяваща изследванията в тази област. За по-голямо онагледяване на изнесената информация и за удобство на читателя в обзора са представени 6 фигури, които са внимателно подбрани и с отлично качество.

В раздела **Цели и задачи** е формулирана целта на настоящата дисертация, а именно:

Да се изследват молекулните взаимодействия между hBest1, сфингомиелин и холестерол, както и асоциацията на hBest1 с домените на клетъчната мембрана, оказващи влияние върху биологичните му функции, като получените данни ще подпомогнат изучаването на връзката структура-функция при hBest1, което от своя страна би допринесло за по-доброто разбиране на възникващите патологични състояния, свързани с мутации в гена му.

За постигането на тази цел логично са поставени и следните задачи:

1. Да се установи ефектът на Ca^{2+} , Glu и GABA върху повърхностната динамика на hBest1, SM и смесени hBest1/SM Лангмюирови монослоеове,
2. Да се определи смесваемостта на hBest1 и сфингомиелин в Лангмюирови монослоеове.
3. Да се установи ефектът на Ca^{2+} , Glu и GABA върху морфологията на hBest1, SM и смесени hBest1/SM Лангмюирови монослоеове.
4. Да се определи кондензиращият ефект на холестерола върху монослоеове от POPC или SM в присъствие или отсъствие на Ca^{2+} йони.
5. Да се установи кондензиращият ефект на холестерола върху монослоеове от hBest1/POPC и hBest1/SM в присъствие или отсъствие на Ca^{2+} йони.
6. Да се определи асоциацията на hBest1 с детергент-резистентните и детергент-разтворимите домени на трансфектирани MDCK-hBest1 клетки.
7. Да се определи разпределението на hBest1 в L_o и L_d регионите в мембраните на трансфектирани MDCK-hBest1 клетки.

В частта **Материали и методи** са описани коректно и подробно използваните методики, както следва: имунофлуоресценция на hBest1, молекулноситова и афинитетна хроматография за пречистване на hBest1, определяне на белтък по метода на Smith, SDS-PAGE, имуноблот, построяване на Лангмюирови слоеве и изчисляване на модула на

свиваемост, смесваемост, средната молекулна площ на компонентите в смесените филми и обща свободна енергия на Гибс, UltraVAM (микроскопия под ъгъл на Брюстер) микроскопия за визуализация на латералната доменна организация и морфология на изградените монослоеове от hBest1, SM и hBest1/SM, изолиране на детергент-резистентни и детергент-разтворими мембранни домени, имунофлуоресценция с Лаурдан, статистически анализ.

Разделът **Резултати и дискусия** включва пет подраздела: **1.** Ефекти на Ca^{2+} , Glu и GABA върху повърхностната динамика на hBest1, SM, и смесени hBest1/SM Лангмюирови монослоеове; **2.** Смесваемост на hBest1 и SM в Лангмюирови монослоеове; **3.** Ефект на Ca^{2+} , Glu и GABA върху морфологията на hBest1, SM, и смесени hBest1/SM Лангмюирови монослоеове; **4.** Кондензиращ ефект на холестерола върху hBest1/SM и hBest1/POPC монослоеове; **5.** Асоцииране на hBest1 с мембранни домени в стабилно трансфектирани MDCKII клетки.

Първият подраздел включва 9 фигури и 3 таблици, които илюстрират резултатите свързани с определяне на молекулната площ, модул на свиваемост и хистерезис на hBest1, SM, и смесени hBest1/SM Лангмюирови монослоеове при добавяне на Ca^{2+} , Glu и GABA. Основните изводи, които се правят от тези експерименти са, че добавянето на Ca^{2+} , Glu и GABA към hBest1 Лангмюирови монослоеове води до намаляване на молекулната площ в посока $A^{\text{NaCl}} > A^{\text{Ca}^{2+}} > A^{\text{Glu}} > A^{\text{GABA}}$, като се изказват предположения, че това може да се дължи на взаимодействие на белтъка с Ca^{2+} , Glu и GABA, които от своя страна могат да доведат до промени в третичната структура на hBest1 и/или до промени в самоорганизирането на молекулата на hBest1 на фазовата граница въздух/вода. Модулът на свиваемост не се променя за Лангмюирови монослоеове изградени от hBest1 при наличие на допълнителни субстанции като Ca^{2+} , Glu и GABA, докато изучаването на хистерезиса на монослоя показва наличие на необратима преориентация на молекулите на hBest1 в интерфазата въздух/вода и необратими промени в структурата на слоя когато към него са добавени NaCl и GABA.

Ефекти при Лангмюирови монослоеове от сфингомиелин. Отчетено е, че в присъствие на Ca^{2+} в Лангмюирови монослоеове от SM фазов преход LE-LC се наблюдава при

относително високо повърхностно налягане, докато в присъствие на Glu или GABA, SM монослоевете претърпяват колапс при по-ниско повърхностно налягане от това за фазов преход и затова те се намират само в LE състояние. Този факт се обяснява със свързването на Glu и GABA към полярната глава на SM, което води до увеличаване на нейната площ и намаляване на кондензацията на веригите, характерна за LC фазовото състояние. Изучаването на модула на свиваемост на Лангмюиоровите системи потвърждава горното твърдение. **Хистерезисни криви** – индикация за разлика в състоянието на уплътняване, реорганизация, реориентация на монослоевите при свиване и разширяване, но стойностите на началното повърхностно налягане и на крайните стойности след разширение на слоя са еднакви, **което показва обратимост на протичащите реорганизационни процеси.** **Смесени hBest1/SM Лангмюиорови монослоевете** – изотермите на смесените монослоеве показват сходен ход с тези при SM Лангмюиорови слоеве. Висок хистерезис дължащ се вероятно на възникване на необратими конформационни промени в белтъчната молекула. Стойностите на хистерезиса се увеличават в посока Ca^{2+} , NaCl, Glu и GABA (подобен ред се наблюдава при бестрофин). Хистерезисните криви са по-стръмни при монослоеве hBest1 и SM, в сравнение с тези на hBest1 и POPC, като при вторите се елиминира ефекта на Ca^{2+} , Glu и GABA.

Вторият подраздел съдържа 2 фигури, които представят резултатите от смесваемостта и поведението на двукомпонентни hBest1/SM монослоеве. Резултатите сочат за добра смесваемост на двата компонента на монослоя при наличие на Ca^{2+} , NaCl, докато добавянето на Glu и GABA води до молекулно разделяне. Роля в тази връзка играят повърхностното налягане и моларното съотношение на двата основни компонента на монослоя.

Третият раздел съдържа 3 фигури, които илюстрират резултатите от изследвания на морфологията на hBest1, SM, и смесени hBest1/SM Лангмюиорови монослоеве след взаимодействие с Ca^{2+} , Glu и GABA чрез микроскопия под ъгъл на Брюстер. Резултатите сочат различна подреденост на hBest1 монослоя в зависимост от добавените компоненти. Докато при добавен NaCl и GABA монослоят е хомогенен, то при наличие на Ca^{2+} и Glu се наблюдава изразена хетерогенност в монослоя. За SM монослой добавянето на Ca^{2+} , Glu и GABA води до съществена промяна в морфологията само при високи налягания. При

бинарните монослоевете се наблюдава хомогенност в целия диапазон от прилаганите налягания. Добавянето на Ca^{2+} и Glu се наблюдава частично фазово разделяне. **Резултатите от този подраздел потвърждават получените данни при термодинамичните анализи за смесваемостта на hBest1 и SM като демонстрират, че смесването и межумолекулните взаимодействия в бинарните монослоевете се увеличават с нарастване на повърхностното налягане.**

Четвъртият подраздел съдържа 10 фигури и разглежда кондензиращия ефект на холестерола върху hBest1/SM и hBest1/POPC монослоевете, както и поотделно на hBest1, SM и SM монослоевете. Такъв се наблюдава при добавяне на холестерол към POPC монослоевете, като ефекта не се наблюдава при добавяне на Ca^{2+} . За разлика от това при монослоевете от hBest1 не се наблюдава кондензация при отсъствие на Ca^{2+} йони. Кондензация на монослоя настъпва в присъствие на Ca^{2+} . Холестерола не оказва кондензиращ ефект върху SM, но с добавяне на Ca^{2+} възниква слаб кондензиращ ефект. При бинарните монослоевете hBest/SM и hBest1/POPC се наблюдава отчетлив кондензиращ ефект на холестерола. Той изчезва при добавяне на Ca^{2+} . Липсата на кондензиращ ефект на холестерола в бинарните монослоевете в присъствие на Ca^{2+} (калциеви йони) се обяснява с намаляването на концентрацията им в следствие свързването им с hBest1 и като резултат олигомеризирането на hBest1 е една от вероятните причини за липсата на кондензиращ ефект на холестерола.

Последният подраздел съдържа 3 фигури, които илюстрират резултатите от изследванията на асоцииране на hBest1 с мембранни домени в стабилно трансфектирани MDCKII - hBest1 клетки. Мембранната хетерогенност е изследвана чрез витално оцветяване с лаурдан на нетрансфектирани и трансфектирани клетки. **Показано е че, при трансфектираните клетки се наблюдава увеличаване на течено-неподредените домени в сравнение с нетрансфектираните**, като hBest1 се локализира предимно в течено-неподредените домени (65% в течено-неподредената и 35% в течено - подредената фаза на мембраните).

В обобщение, темата на настоящия дисертационен труд е насочена към изясняване на локализацията на hBest1 в клетъчната мембрана, както и взаимодействието му с мембранни липиди с цел изясняване на неговите биологични функции.

Представените резултати от изследванията на Лангмюирови монослоеве, визуализирани на морфологията на монослоеве чрез БАМ и изследванията на клетъчни култури чрез мембранни флуоресцентни маркери сочат за взаимодействие на Ca^{2+} , Glu и GABA със смесени hBest1/SM монослоеве, което вероятно води до: промени в конформацията и структурата на hBest1, както и в повърхностната динамиката на монослоеве; определена смесваемост на hBest1 и SM; кондензиращ ефект на холестерола на hBest1/SM монослоеве и преимущественото разпределение на hBest1 в L_d (65%) домените на трансфектирани MDCK-hBest1 клетки.

Направените **Изводи** и посочените **Приноси** са адекватни и изчерпателни. Акцентира се на възможността на hBest1 да влияе на формирането/моделирането на липидните домени в мембраната, което вероятно е свързано с неговите биологични функции.

В дисертацията следват списък на **Публикации във връзка с дисертационния труд и Участия в научни конференции и семинари**. От изложените списъци е видно, че резултатите от дисертационния труд са публикувани в две статии с импакт фактор (като в едната докторантът е първи автор) и са представени на национални и международни конференции.

Дисертацията завършва със списък на използваната литература, като прави впечатление, че са използвани съвсем нови заглавия включващи актуални изследвания по темата на дисертацията.

Предвид отправената от мен препоръка към докторанта (при представяне на предварителния Отзив по проекта за дисертационен труд) за обособяване на секция «Обобщение», отчитам че това е направено в крайния вариант на дисертационния труд.

От прегледа на представения материал се вижда, че е извършена значителна по обем и качество научно-изследователска работа и той напълно отговаря на изискванията на Закона за научните степени и звания за допускане на докторанта **Никола Йорданов Младенов** до защита за придобиване на научно-образователната степен „ДОКТОР“.

03.11.2020 г.

Проф. д-р Румяна Цонева

Институт по биофизика и биомедицинско инженерство-БАН