

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд
за получаване на образователната и научна степен "Доктор"
Професионално направление: 4.3 Биологически науки (Молекулярна биология – Клетъчна
поляризация и сигнализация)

Автор на дисертацията: ас. Павел Веселинов Видев,
задочен докторант към катедра Биохимия на БФ на СУ „Св. Кл. Охридски“

Тема: " *Характеристика и роля на hBest1 и негови мутантни форми в еукариотни клетки и моделни мембранни структури* "

Рецензент: проф. Константин Балашев, д.н.

1. Кратки биографични данни за кандидата.

Павел Видев се дипломира последователно като бакалавър и магистър в Биологическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, съответно през 2015 в бакалавърската специалност „Молекулярна Биология“ и магистърската, „Биология – МП Алгология и Микология“ през 2017 г. От 2018 до настоящем Павел Видев заема академичната длъжност асистент в БФ на СУ и същевременно е зачислен като задочен докторант по специалност Молекулярна Биология с шифър 4.3, към катедра Биохимия, БФ на СУ.

2. Актуалност на проблема на дисертационния труд.

В дисертационния труд на Павел Видев обект на изследване е калциево-активируемият хлорен канал, човешкият бестрофин-1 (hBest1), който регулира ретиналната хомеостаза, невронната възбудимост и синаптичната активност, като акцентът на работата му е върху физико-химичните характеристики и отнасяне на белтъка, в зависимост от структурата на биологичната мембрана. Използван е експериментален подход, при който се търси зависимост на биохимичните му свойства от хетерогенната структура и фазовата сегрегация на плазмената мембрана. Това е една амбициозна научна задача, тъй като изучаването на фазовите преходи в биологичните мембрани с използвания в дисертацията като физикохимичен модел, фосфолипиден монослой на граничната повърхност вода/въздух, в исторически аспект започва да среща подкрепата на научната общност едва през 80-те години на миналия век. Това става едва след откриването и използването на експериментални методи за визуализация и анализ, като епифлуоресцентната и Брюстеровата микроскопии, рентгенова дифракция от малък ъгъл и пр., като въпреки това теоретичните модели в тази област все още са дискуссионни. Избраният от дисертанта подход за изследването на взаимодействията между многокомпонентни моделни мембрани и hBest1 е перспективен и би помогнал за изясняване на

механизмите, по които белтъкът функционира, динамиката на конформационните промени в него, в мембранната топология и структура. От друга страна, получаването на трансфектирани клетки, с мутантни форми на hBest1, определянето на характеристиките на мутантните белтъци и тяхното въздействие върху еукариотни клетки са от съществено значение за изясняване на механизмите на възникването на патологичните състояния, отговорни за развитието на дегенерации на очната макула.

Ето защо, като цяло считам, че темата на дисертацията на Павел Видев е изключително актуална във фундаментален и приложен аспект.

3. Обща характеристика на дисертацията и познаване на състоянието на проблема от докторанта.

Павел Видев е следвал традиционното представяне на такъв тип дисертационни трудове. Дисертацията му е развита в 7 глави. В четири от тях- Увод, Литературен обзор, Материали и методи, Резултати и дискусия, е представен материалът по дисертацията, а трите останали глави са кратки и в тях са формулирани, целите и задачите, изводите и приносите на дисертанта.

След уводната *Глава 1*, в литературния обзор (*Глава 2*) са обяснени и описани човешкият бестрофин-1 (hBest1), експресията и локализацията му, функциите му, модели за разположението му в клетъчната мембрана и пр., а също така са описани и някои бестрофинопатии, които са резултат от мутации в гена BEST1, отговорен за синтеза на hBest1, които са причината за развитието на патологични състояния на очната макула. В тази глава от дисертацията са дискутирани също така биологичните мембрани и мембранните белтъци, с тяхната структура, състав, роля, значението на холестерола, липидна асиметрия и хетерогенната структура на клетъчната мембрана с фазовите преходи в нея и пр., а също така и експерименталните подходи за анализиране на липид-липидни и липид-белтъчни взаимодействия чрез моделни мембранни системи. Литературния обзор е подробен, богато илюстриран с фигури и в 43 страници, представя по един атрактивен и увлекателен за читателя начин общия поглед върху литературата, публикувана по темата на дисертацията, отразявайки, някои от най-цитираните и популярни източници в нея. В *Глава 3* коректно са представени използваните материали и различни експериментални методи. Основния материал по дисертацията е изложен в *Глава 4- Резултати и дискусия*. Дисертационният труд е представен в обем от 114 страници и е илюстриран с 50 фигури. Цитирани са 343 от най-актуалните литературни източници по тематиката. Материалът по дисертацията е оформен добре и прецизно с малки технически неточности и пропуски в него.

По мое мнение дисертантът, отлично познава тематика и литературата по нея, като се е справил отлично с овладяването на различни експериментални методи, начина на обработката и анализ на получените данни, демонстрирайки по този начин отлична теоретична подготовка и експериментални умения на високо научно ниво.

4. Методи на изследване и оценка на достоверността на материала.

Като една от целите на дисертацията си, Павел Видев формулира, определяне на зависимостта структура/функция на hBest1, като се изследват молекулните взаимодействия между hBest1,

фосфатидилхолин (POPC) , сфингомиелин (SM) и холестерол в моделна система на клетъчната мембрана, Лангмюиров монослой. За постигането ѝ са изследвани повърхностните свойства на hBest1 в смесени Лангмюирови монослоеове, от ненаситения фосфолипид POPC, SM и холестерол, в присъствие и отсъствие на калциеви йони. Експерименталните задачи включват измерване на изотермите повърхностно налягане/площ, по които са пресметнати и представени графично модулите на повърхностна еластичност C_s^{-1} като функция на повърхностното налягане, а също така са получени и изображения от Брюстеров микроскопия. Така избрания подход е класически при изучаване на механиката на мономолекулни слоеве на граничната повърхност, макар трудността от постигането на тази амбициозна цел да изисква и евентуалното използване на допълнителни методи, особено такива за визуализация на морфологията на монослоя, като епифлуоресцентна микроскопия или получаването на LB-филми и анализа им с Атомно-силова микроскопия (AFM). Като друга цел на дисертацията е поставено изследването на влиянието на hBest1 върху липидния състав и поляризацията на еукариотни клетки и на негови мутантни форми върху развитието на клетките като за постигането ѝ е сравнен липидния състав и е определено влиянието на Glu, GABA, ATP и PLA2 върху трансепителната резистентност на MDCKII клетки и на такива, експресиращи hBest1, а така също е определено влиянието на мутантни форми на hBest1 в развитието на MDCKII клетки.

5. Основни научни научно-приложни приноси на дисертационния труд.

- Изследвано е влиянието на калций върху повърхностните характеристики на трикомпонентни смесени монослоеове, съдържащи hBest1. Установено, че включването на холестерол в бинарния hBest1/SM монослой води до понижаване на подредеността на монослоя, но не променя подредеността на бинарния hBest1/POPC, изравнява смесваемостта на hBest1 в POPC и SM монослоеове и оказва влияние върху морфологията на hBest1 и hBest1/SM монослоеве (наблюдава се увеличаване на светлите домени с висока плътност), но не повлиява морфологията на hBest1/POPC монослоя. Също така е охарактеризирана смесваемостта на бестрофин-1 в бинарни монослоеове чрез прилагане на метода на Goodrich за намиране на ΔA и ΔG_{mix} на смесени монослоеове от три компонента.
- Изследван е ефекта на реорганизиране на мембраната (чрез третиране с PLA2) в присъствие и отсъствие на hBest1 в клетъчна моделна система и са изследвани промените в липидния състав на MDCKII клетки предизвикани от hBest1. При третирането на MDCKII-hBest1 клетки с PLA₂ не се повлияват значително стойностите на TER в сравнение с нетрансфектираните MDCKII клетки и се наблюдава рязък спад на TER след третиране и бавно възстановяване. Установено е, че експресията на hBest1 в MDCKII клетките води до увеличаване на относителния дял на неламеларни лизолипиди в клетъчния липиден състав, което предполага по-висока степен на флуидизиране на мембраната.
- Установено е, че Glu, GABA и ATP предизвикват по-бързо достигане и повишаване на стойността на TER_{max} при трансфектираните с hBEST1 MDCKII клетки в сравнение с нетрансфектираните. Чрез транзиентна трансфекция е показано, че изследваните мутантни

форми на hBest1 (Y85H, Q96R, R25W и Y227N) водят до ранна и късна апоптоза на MDCKII клетките.

6. Преценка в каква степен дисертационния труд е лично дело на дисертанта.

Резултатите и теоретичните разглеждания в дисертацията са добре организирани и ясно изложени по увлекателен за читателя начин, така че да не оставят съмнения, че научните приноси в голяма степен са лично дело на дисертанта.

7. Публикации по дисертационния труд.

Резултатите от изследванията по дисертацията на Павел Видев са публикувани в 4 публикации (три от тях са посочени в края на дисертацията, а четвъртата е отразена от базата данни Scopus през 2022 г.). Три от статиите са в импактни и реномирани списания в областта- *Molecules, Membranes и Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, като по една от тези статии вече е забелязан и цитат. Четвъртата статия на дисертанта е в сборника от доклади от Националната научна конференция с международно участие „Наука и общество 2019“. Части от дисертационния труд са представени като 4 доклада и 2 постерни презентации на научни форуми, конференции и симпозиуми. Тези наукометрични показатели показват, че дисертационния труд отговаря изцяло на изискванията за образователната и научна степен „доктор“.

8. Приложение на резултатите от дисертационния труд.

Основните резултати и приноси на дисертацията имат не само фундаментален, но и приложен характер, най-вече в областта на офталмологията при евентуалното намиране на ефективно лечение със съответните лекарствени форми на познатите в медицината дегенеративни патологии на очната макула.

9. Критични бележки и препоръки за бъдещи изследвания.

Като цяло дисертацията на Павел Видев е оформена старателно, с малко технически пропуски и фактологични грешки. Като няколко примери мога да посоча следните технически неточности. В главата с материалите съвсем лаконично е отбелязано, че „*всички консумативи и химикали са закупени от Sigma-Aldrich*“, което за статия е допустимо, но тук би следвало да се дадат поне някои данни за използваните фосфолипиди и други съединения, като например техните химични формули, молекулни тегла и пр. Като цяло литературата е оформена технически коректно, но при цитирането на монографии, например [206] и [255], не са посочени страниците. На някои от фигурите, в хартиения вариант на дисертацията, напр. фигури 39 и 40, трудно се четат надписите. Тези примери за технически неточности, обаче, са типични и ни най-малко не омаловажават постигнатите от дисертанта резултати.

Имам и някои конкретни въпроси.

1. Защо е избран фосфолипида POPC, който е с една наситена и една ненаситена въглеводородна опашка, което изисква допълнителни експериментални мерки за провеждането на монослойните измервания, като например инертна газова среда (азотна или аргонова)? В този смисъл, провеждани ли са контролни експерименти във времето за

възпроизводимост, като например измерване на изотермите от POPC. Всъщност, неясно защо, но на никой от фосфолипидите POPC и SM или на холестерола, в дисертацията няма представени изотерми на тези индивидуалните компоненти на смесите, избрани за моделни монослойни системи. Към този въпрос бих попитал и каква е причината да се изберат монослоевете от бинарните смеси POPC/Chol и SM/Chol в молно съотношение 1:1, а не в някакво друго съотношение?

2. На стр. 60, е заявено, без дисертантът да се е аргументирал или да е дал цитат, че *„формата и наклонът на изотермата не се променят, следователно наличието на Ca^{2+} не влияе на фазовото състояние и молекулната организация в този бинарен монослой.“* Защо това е така, след като според цитираната на стр. 33 теория на Harden McConnell, фазовата сегрегация в монослоя е резултат от действието и баланса между молекулните електростатични сили и линейното напрежението, действащо по линията на границата между фазите в монослоя? Ако Ca^{2+} йони можем да приемем, че нямат директен принос в механичната (еластична) компонента на свободната енергия, то едва ли това важи за влиянието им върху електростатичната ѝ компонента.
3. На стр. 67 е отбелязано *“Свързването на Ca йони предизвиква изместване към по-големи молекулни площи при монослоевете hBest1/SM, и към по-малки площи при такива от пречистен hBest1 - при монослой изграден само от hBest1 в присъствие на калций $\pi = 20$ mN/m се достига при $\sim 1000 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$, докато в отсъствие на Ca^{2+} същото π се достига при $\sim 1200 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$ [264]“*. Посочените площи са с порядък по-големи от тези на представените на фигурите изотерми???
4. Интерпретацията на BAM изображенията също предизвикват някои въпроси. На стр. 74 се твърди *„Всички снимки на Фиг. 37 показват съвместното съществуване на газова (черни зони) и кондензирана (сиви зони) фаза, което е типично за Chol, но само при големи молекулни площи и 0 mN/m.“* Каква е стойността на тези „големи молекулни площи“? Какво се разбира тук под „кондензирана фаза“, след като, ако имаме хетерогенност на монослоя, в тази област на изотермата, се очаква тя да между газовата и течната фаза? А още по-объркващо е, че на 75 стр. се твърди за *„допълнителна по-кондензирана фаза, характеризираща се с много ярки домени с овална форма“*?

И накрая, като препоръка за бъдещи изследвания бих дал, провеждането на монослойни измервания с някой от наситените фосфатидилхолини като DPPC, например, при които хетерогенността на смесените им с холестерол монослоевете е сравнително добре изучена и което би улеснило изследването на влиянието на hBest1 върху фазовите преходи в монослоя. Включването на други експериментални методики, като епифлуоресцентна микроскопия или LB-филми охарактеризирани с AFM, също биха били полезни за изясняването на повдигнатите по-горе въпроси.

10. Преценка на автореферата.

Авторефератът на дисертацията като цяло коректно отразява основните резултати и постижения на дисертационния труд.

11. Заключение

Представеният ми за рецензия дисертационен труд на Павел Видев по обем, качество, ниво на изследванията, научните и научно-приложни приноси в областта на биохимичната наука, заедно с публикациите му в научната литература, отговарят на Закона и на всички изисквания заложените в Правилника за научните степени и заемане на академични длъжности на СУ „Св. Климент Охридски“ за присъждане на образователната и научна степен “Доктор”.

На тази база, както и на всичко по-горе изложено, изразявам своята **положителна оценка** и убедено препоръчам на членовете на уважаемото Научно жури да подкрепят присъждането на образователната и научна степен “Доктор” (Направление 4.3 „Биологически науки“, научна специалност „Молекулярна биология – Клетъчна поляризация и сигнализация“) на **Павел Веселинов Видев**.

23 януари 2023 г

(проф. Константин Балашев, дн)