

СУ „Св. Климент Охридски“

Биологически факултет

Катедра „Биохимия“

СОФИЙСКИ
УНИВЕРСИТЕТ



„СВ. КЛИМЕНТ
ОХРИДСКИ“
ОСНОВАН 1888 г.

**Самоорганизация и повърхностни свойства на
hBest1 в модели на биологични мембрани**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на научната степен
„Доктор на науките“ по професионално направление
4.3. Биологически науки (Молекулярна биология)**

проф. д-р Йордан Атанасов Думанов

София, 2023 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на катедрения съвет на Катедра „Биохимия“ при Биологически факултет на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“ (**протокол № 703 от 05.10.2023 г.**). Дисертационният труд съдържа 196 страници (от които 30 страници приложение), 69 фигури, 3 таблици и са цитирани 294 литературни източника.

Официалната защита ще се състои на:

.....

Научно жури:

Акад. проф. дбн Румен Панков – СУ „Св. Климент Охридски“
Проф. дбн Росица Конакчиева – СУ „Св. Климент Охридски“
Доц. д-р Иванка Цачева – СУ „Св. Климент Охридски“
Акад. проф. дбн Иван Иванов – ИМБ, БАН
Проф. дбн Диана Петкова – ИБФБМИ, БАН
Проф. д-р Албена Александрова – НСА
Проф. д-р Ивайло Димитров – ИП, БАН

Резервни членове:

Доц. д-р Детелин Стефанов – СУ „Св. Климент Охридски“
Доц. д-р Анастас Господинов – ИМБ, БАН

Тази дисертация беше реализирана с финансовата подкрепа на договори:

1. ДДВУ02/10 от 17.12.2010 г. към ФНИ, МОН,
2. КП-06-Н23/7 от 18.12.2018 г. към ФНИ, МОН,
3. Проект Научна Инфраструктура „Клетъчни Технологии в Биомедицината“ НПКНИ (Споразумения ДО1-154/2018, ДО1-275/2019), МОН

както и договори:

1. “Поведение на hBest1 в монослоеве от сфингомиелин с участието на Ca²⁺, Glu и GABA” към ФНИ на СУ „Св. Климент Охридски“,
2. “Визуализиране на Лангмюир-Блоджетови филми от белтъка бестрофин-1” към ФНИ на СУ „Св. Климент Охридски“,
3. „Поведение на белтъка бестрофин-1 в липидни монослоеве“ към ФНИ на СУ „Св. Климент Охридски“.

Списък със съкращения

hBest1 – човешки бестрофин-1

POPC – 1-палмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин

SM, eggSM (CM) – сфингомиелин, яйчен сфингомиелин

Chol - холестерол

РПЕ (RPE) – ретинален пигментен слой, ретинален пигментен епител

Glu – глутамат

GABA – гама-аминобутирилова киселина

ЕРГ – електроретинография

ЕОГ - електроокулография

КрBest – бестрофин-1 от *Klebsiella*

сBest1 (chBest1) – кокоши бестрофин-1

Ап – апикална мембрана

Бл – базолатерална мембрана

АФМ (AFM) – Атомно-силова микроскопия

БАМ (BAM) – Брюстер-ъглова микроскопия

TLC – тънкослойна хроматография

ТЕР (TER) – трансепителна резистентност

СНК (SNAs) – сферични нуклеинови киселини

Въведение

Биохимичните и молекулярни механизми на зрението са забележителни със своето съвършенство при преобразуване на светлината в нервни импулси и химическа работа, чрез последователности от ензимни реакции, които се извършват в окото. Окото приема и фокусира светлината върху централно разположената ретина, която е изградена от фоторецептори, биполарни, амакринни, хоризонтални и ганглийни клетки. Ретината предава релевантната информация от светлината чрез оптичния нерв към средния мозък и таламуса, където се преработва (като визуално възприятие) и изпраща към зрителния кортекс. В зрителния кортекс различната информация (за цвят, форма, големина, движение) се комбинира, което води до усещане за преживяване. Във външната част на ретината са разположени клетките на ретиналния пигментен епител (RPE), които са най-отдалечени от влизащата в окото светлина.

Човешкият бестрофин-1 (hBest1) е Ca^{2+} зависим трансмембранен белтък, който се експресира в ретиналния пигментен епител на окото, като мутации в гена за *BEST1* причиняват дегенерации на ретината, наричани общо „бестрофинопатии“. В настоящата дисертация са описани резултатите от голям брой генетични, биохимични, биофизични, физикохимични и молекулярно-биологични интегрирани изследвания, които са важни за да разберем връзката между структурата и функцията на каналния белтък hBest1 и неговото патофизиологично значение. Тук показваме и дискутираме най-актуалното познание и разбиране за повърхностната организация на hBest1, взаимодействията му с основните мембранни липиди (като POPC, SM и Chol) в модели на биологични мембрани и връзката му с различните микродомени (например липидните рафтове) в клетъчните мембрани. Тези знания са от фундаментално значение за разбирането как се модулира и регулира активността на каналните молекули на hBest1 в клетките. Включени са мащабни изследванията с клетъчни култури за сортирането на hBest1 и негови мутантни форми, които показаха, че най-малко три сортиращи сигнали, както и фосфорилирането, са определящи за правилното насочване на hBest1 към базолатералната мембрана. Показахме, че експресията на hBest1 в клетките води до промяна в липидния метаболизъм, а локализирането на белтъка в плазмената мембрана предизвиква нейното „флуидизиране“ и намаляване на големината на подредените области в нея. Детектираната частична асоциацията (~ 30 %) на hBest1 с липидните рафтове определя основната роля на различните микродомени за повърхностната (само)организация и активността на белтъка.

Създадената стабилна клетъчна линия MDCK II – hBest1, както и създадената оригинална схема за пречистване и изолиране на hBest1, откриха пред нас огромни възможности за изследване на белтъка hBest1. Определихме, че в състава на вторичната структура на hBest1 участват около 51 % спирални структурни елементи, като вторичната структура се променя значително в зависимост от наличието на Ca^{2+} . Чрез атомносилова микроскопия определихме топологията и направихме първите снимки на hBest1, благодарение на което видяхме не само различна конформация на белтъка, но и различна организация

(димеризация, тримеризация) на повърхността на Лангмюир-Блоджетовите филми.

Възможността да получим чист hBest1 ни позволи да го използваме в тензиометричните измервания с Лангмюирови монослоеви и по този начин да определим повърхностното поведение и взаимодействията на белтъчните молекули с рафтови (SM и Chol) и нерафтови (POPC) липиди. Съществено място е отделено на построяването на π/A изотермите при физиологични и динамични условия на компресия и декомпресия, което симулираше динамиката на молекулите в клетъчните мембрани. Установихме, че термодинамичното и изгодно смесване на hBest1 с едни липидни (SM) молекули е в противовес с фазовото разделяне с други (POPC), но холестеролът подобрява и стабилизира смесването между компонентите. Уравновесяването и стабилизирането на смесваемостта/фазовото разделяне между hBest1 и (не)рафтови липиди, оказва пряк ефект върху асоциирането и локализирането на белтъка в различните микродомени, неговата конформация, повърхностна организация и неговите функции. Изследванията проведени с клетъчните култури и тези, показващи взаимодействията на hBest1 с мембранните липиди са предпоставка в търсенето на възможности за интегрирането на hBest1 в нанодискове, полимерни и/или биконтинуални наночастици, както и използването на сферични нуклеинови киселини (SNAs), които да бъдат доставящи системи при бъдещи терапии на бестрофинопатии.

I. Цел и задачи

Цел на дисертационния труд беше да се проследи и изследва ролята на hBest1 в клетката, неговата структура, организация и функции, връзката между структура и функции, както и молекулярните механизми, водещи до бестрофинопатии. Изследванията на структурата и функционалната активност на hBest1 са предизвикателство, защото белтъкът се експресира основно в базолатералната плазмена мембрана на ретинални епителни клетки, които губят неговата трансляция в условия *in vitro*.

За постигането на целта, бяха поставени следните задачи, разделени в две направления:

1. Изследвания с клетъчни култури като моделни системи, които включват: а) създаване на клетъчни линии от трансфектирани с нормални и мутантни форми hBest1 еукариотни клетки; б) доказване експресията на hBest1 белтъците в тях, клетъчната им локализация в полярни клетки и асоциацията им с липидните рафтове; в) определяне на влиянието на hBest1 върху развитието на клетките и техния метаболизъм.

2. Изследвания с модели на биологични мембрани, които са пряко зависими от изолирането и пречистването на hBest1 от стабилно трансфектираните MDCK II - hBest1 клетки и включващи: а) определяне на повърхностните физикохимични характеристики на Лангмюирови монослоеви и Лангмюир-Блоджетови филми от пречистен hBest1; б) определяне на повърхностните физикохимични характеристики от дву- и трикомпонентни Лангмюирови монослоеви и Лангмюир-Блоджетови филми, съдържащи hBest1 и комбинации от основните мембранни липиди фосфатидилхолин, сфингомиелин и холестерол. Описанията на използваните методи са направени в дисертацията.

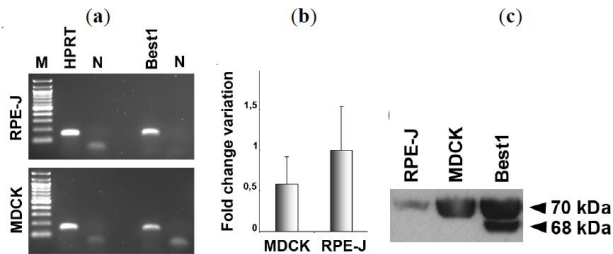
II. Резултати и дискусия

1. Изследвания на hBest1 в клетъчни култури като моделни системи

1.1. Преходна експресия на hBest1 и негови мутантни форми в MDCK II клетки

Нашите изследвания на hBest1 започнаха с доказване на експресията на белтъка в различни клетъчни линии. Липсата на ендегенна трансляция на hBest1 в MDCK II, RPE-J, RPE-1, Hela и HEK293 клетъчни линии показва, че след трансфекция, те могат да се използват за изследване на белтъка, без допълнително заглушаване на ендегенната транскрипция на гена *BEST1*. Поради невъзможността за изследване на **сортирането** на hBest1 в ретиналните клетки от двете линии (RPE-J, RPE-1), ние се насочихме към изследване на поведението на белтъка в клетки от друга линия, а именно - **MDCK II**. Това са един от най-използваните модели на полярни епителни клетки. Поляризацията при тези клетки се развива само за около пет дни на култивиране, няма припокриване на клетките при образуване на монослой, което определя ясното и лесно разграничаване на Бл- и Ап- домени посредством различни маркерни белтъци.

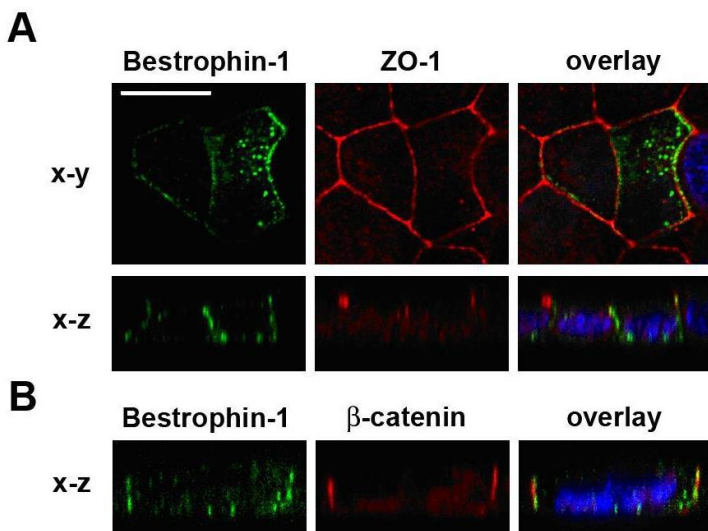
Ендегенната транскрипция на *BEST1* в клетките от линията MDCK II показва наличие на транскрипт, но с много ниско ниво (след 34-ти от 40 цикъла при провеждане на количествен Real-Time PCR), което е около 40% по-ниско от това, наблюдавано в RPE-J клетките (**Фигура 1**). Подобно на клетките, описани по-горе, клетките от линията MDCK II не синтезират белтъка hBest1, докато клетките, трансфектирани с човешки *BEST1* експресират белтъка Best1 с очаквания размер от 68 kDa (**Фигура 1**). Поради тези причини, MDCK II клетките бяха предпочетени от нас за изследване на локализацията на нормалния/дивия тип hBest1.



Фигура 1. Ендегенна експресия на *BEST1* в MDCK клетки. (а) иРНК за *HPRT* и *BEST1* се експресират в MDCK II и RPE-J клетките. М – 100 bp ДНК-ов маркер, N – негативна контрола. (б) Сравняване на нивата на експресия на *BEST1* в MDCK и RPE-J клетките, посредством Real-Time PCR. (в) hBest1 не се синтезира от RPE-J, нито от MDCK II клетките. След трансфекция, MDCK II клетките синтезират hBest1 белтък с молекулна маса 68 kDa. Във всички проби (трансфектирани и нетрансфектирани клетки от двете линии) се наблюдава втори, неспецифичен банд, на белтък с маса 70 kDa (**Doumanov et al., 2013**)*.

*** Всички публикации, цитирани във фигурите и приложенията са оригинални публикации на екипа, свързани с темата на дисертацията, а не статии от глава „Използвана литература“.**

hBest1 е локализиран на базолатералната мембрана на РПЕ, както и на RPE-J клетките. За да установим дали това сортиране е подобно и в MDCK II клетките, направихме преходна трансфекция с конструкт, съдържащ нормалния човешки ген *BEST1*. При всички клетки беше наблюдавана типичната морфология, характерна за поляризираните клетки. Само в трансфектираните клетки, конфокалните срезове показаха базолатерална локализация на hBest1 под равнината, в която се разполага ZO-1, както и базолатерална колокализация с β -катенин (β -catenin), показващи мембраните, които разделят съседните клетки, както и базолатералните им повърхности (**Фигура 2**).



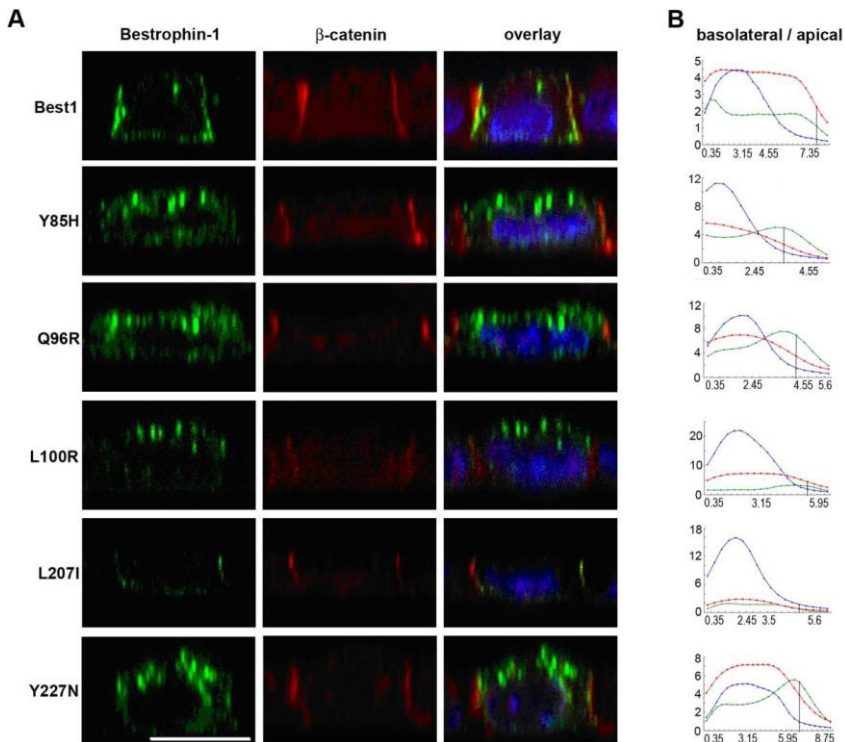
Фигура 2. Базолатерална локализация на hBest1 в MDCK II клетки. Трансфектираните MDCK II клетки експресират hBest1 (зелено) на базолатералната си повърхност, който ко-локализира с (A) маркерът за плътен контакт ZO-1 (червено), което се вижда от конфокалните изображения в X-Y и X-Z равнина и (B) базолатералния маркер β - катенин (catenin) (червено), както е видно от конфокалните образи в X-Z равнината. Клетъчните ядра са оцветени в синьо, бар = 10 μ m (Doumanov et al., 2013).

Количественият анализ на базолатералните и апикалните флуоресцентни сигнали показва сходно разпределение по мембраните на молекулите на hBest1 и β -катенин, съответно 90% и 91% от двата белтъка са преференциално локализиращи на базолатералната мембрана на клетките.

Редица мембранни белтъци (включително и йонни канали) в РПЕ показват обърната локализация (наречена обърната полярност), в сравнение със сортирането им в другите епителни клетки.

Получените от нас данни показват, че MDCK II клетките след трансфекция могат да експресират и процесират белтъка hBest1. Базолатералната локализация на белтъка е подобна на тази в ретиналните клетки, което предполага, че и двата типа клетки интерпретират по **сходен** начин сортиращите сигнали в молекулата на hBest1.

Чрез място-специфична мутагенеза генерирахме **hBest1 мутанти** и направихме анализи, свързани с тяхната синтеза и локализация в преходно трансфектирани MDCK II клетки. Мутациите в конструктите са разположени в различни домени на белтъка, в **предполагаеми базолатерални тирозинови и дилевцинови сортиращи мотиви** (p.Y85VTL, p.Y97ENL, p.L206L207, p.Y227DWI). Тези мутации са описани при пациенти с BVMD (p.R25W, p.Y85H, p.L100R, p.L207I, p.Y227N), включително и новоописаната (по това време, 2009 г.) от нас мутация p.Q96R намираща се до Y97ENL мотив.

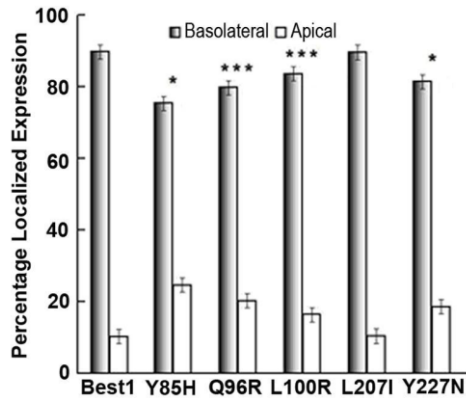


Фигура 3. Мутации в потенциалните сортиращи мотиви повлияват базолатералната локализация на hBest1 в поляризиран MDCK II клетки. **(A)** Конфокални снимки в равнината X-Z на отделни клетки, преходно трансфектирани с различните *BEST1* кДНК конструкции, показващи нарушена локализация на мутантите p.Y85H, p.Q96R, p.L100R и p.Y227N. Клетките са оцветени за hBest1 (зелено), β - catenin (червено), а клетъчните ядра са в синьо. Бар = 10 m. **(B)** Криви, показващи интензивността на сигналите за hBest1 (зелено), β - catenin (червено) и клетъчните ядра (синьо) на Z-сериите за всяка клетка. Черната вертикална линия показва Z-фокалната равнина, избрана като граница между базолатералната и апикалната мембрана. По хоризонталата е нанесено разстоянието в μm , а по вертикалата – пикселната интензивност (Doumanov et al., 2013).

За да изследваме дали тези мутации повлияват сортирането и локализацията на hBest1, ние анализирахме поляризираната експресия на различните мутантни белтъци в MDCK II клетките. Клетъчната поляризация беше установена с образуването на плътни контакти между съседните клетки, флуоресцентно и конфокално визуализирани чрез ZO-1, докато локализацията на мутантите беше определена чрез ко-локализация с базолатералния маркер β -катенин (Фигура 3).

Белтъчните молекули, носещи мутациите p.Y85H, p.Q96R, p.L100R и p.Y227N показаха нарушена локализация и повишена апикална експресия

(повишен зелен флуоресцентен сигнал над нивото на β -катенина в равнината X-Z) в клетките, в сравнение с не-мутантните молекули. Само при p.L207I разпределението в клетката беше базолатерално и се наблюдаваше колокализация с червения сигнал за β -катенин, подобно на това на нормалния hBest1 (Фигура 3). Стойностите на интензитета на сигналите на оцветяване във всяка Z-фокална равнина в една клетка показват различна форма на кривите за мутантните белтъци, в сравнение със стойностите за β -катенин, така и за нормалния hBest1. Максимална интензивност на сигналите за мутантните форми беше изместена към апикалната част на кривите, което съответства на увеличеното апикално оцветяване в клетките (Фигура 3). Количественият анализ за разпределението на hBest1 между Ап и Бл мембрана показва увеличено насочване на белтъка към апикалната мембрана с 15% за p.Y85H ($p = 5.37 \times 10^{-5}$), 10% за p.Q96R ($p = 0.0001$), 6% за p.L100R ($p = 0.0009$) и 9% за p.Y227N ($p = 5.20 \times 10^{-5}$), докато мутантът p.L207I не показва промяна в базолатералната си локализация (Фигура 4).

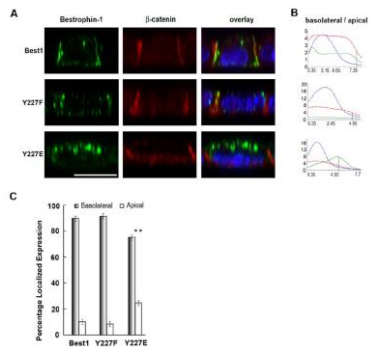


Фигура 4. Графика, показваща количественото разпределение на hBest1 между базолатералния и апикалния домен на клетките, преходно трансфектирани с различните мутанти на hBest1 (mean \pm SEM., $n = 10$, * $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$) (Doumanov et al., 2013).

Непроменената базолатерална локализация на мутанта p.L207I показва, че предполагаемия сортиращ мотив L206L207, който се намира в големия цитоплазмен домен на hBest1, може би не е необходим за базолатералното локализиране. Възможно е обаче, поради сходната структура на аминокиселините L и I, сортерите в клетката да не ги различават, да ги разпознават по един и същ начин и да насочват белтъците базолатерално. Затова патогенния механизъм на тази мутация най-вероятно не е свързан с промени в сортирането на hBest1.

За мутантите p.Y85H и p.Q96R, които показаха най-големи промени в локализацията си, в сравнение с дивия тип белтък, беше направен анализ на колокализацията със ZO-1 и WGA (wheat germ agglutinin – аглутинин от пшеничен зародиш), като екстрацелуларен апикален маркер. Двамата мутанта на белтъка бяха

частично локализиращи над плътните контакти в клетките и частично колокализираща с WGA на апикалната мембрана, каквото не беше наблюдавано при нормалния hBest1. Освен това след биотинилиране на p.Y85H и p.Q96 R на апикалната и базолатералната мембрана беше отново потвърдена увеличената апикална локализация на двете мутантни форми на белтъка. Освен в сортирането, мутацията p.Y85H, която е разположена във втория трансмембранен домен на hBest1 има значение и за правилната топология, и за йонната пропускливост на белтъка, поради замяната на хидрофобна с положително заредена аминокиселина.



Фигура 5. За правилното базолатерално сортиране е необходимо тирозин в позиция 227 да бъде не-фосфорилиран. **(А)** Единично конфокално изображение в посока X-Z, което показва, че конститутивно фосфорилирания hBest1 (Y227E) се насочва частично към апикалната мембрана в по-голяма степен, в сравнение с нормалния и нефосфорилиран белтък (Y227F). hBest1 е в зелено, β -catenin е в червено, а ядрата са в синьо. Бар = 10 μ m. **(В)** Околичествяване на апикалната и базолатерална локализация на трите маркера (hBest1 – зелено, β -catenin – червено, ядра – синьо) в Z-фокалните равнини. Вертикалната линия индикира границата между апикалния и базолатералния домени. По хоризонталата е нанесено разстоянието в μ m, а по вертикалата – пикселната интензивност. **(С)** Графика, показваща количественото разпределение на hBest1 между базолатералния и апикалния домен на клетките (mean \pm SEM., n = 10, ** p < 0.005) (Doumanov et al., 2013).

През 2005 Mullins и колектив съобщават за пациент с BVMD, при който на хистологични срези от око се наблюдава повишено количество hBest1 по апикалната мембрана на РПЕ. Пациентът носи мутацията Y227N, което подсказва за вероятната роля на p.Y227DWI мотива за правилното насочване и функциониране на белтъка. Тази мутация засяга и йонната пропускливост, която е само 28% от тази на нормалния белтък. Ние също потвърдихме, че мутацията p.Y227N води до повишаване на Ап експресия на тези белтъци (виж по-горе) и че Тур в позиция 227 (Y227) е от значение за Бл насочване. Вече е установено, че hBest1 е фосфорилиран. Затова беше поставен въпроса дали фосфорилирането на Y227 повлиява локализацията на белтъка. Тирозин 227 беше заменен с глутамат и фенилаланин в две мутантни форми на белтъка, като тези замени имаха за цел

да „симулират“ фосфорилирането (псевдо-фосфорилиране) или да го блокират. Резултатите, описани на **Фигура 5** показваха, че псевдо-фосфорилираните p.Y227E белтъци се увеличават в апикалната мембрана, докато нефосфорилираните p.Y227F форми запазват базолатералното локализиране, подобно на нормалния белтък hBest1. Тези резултати предполагат важната роля на нефосфорилирания тирозин за базолатерално сортиране, т.е. Y227 трябва да бъде нефосфорилиран, за да бъде разпознат от базолатералните „сортери“ в клетката и белтъкът да бъде правилно локализиран в мембраната.

Последната мутация, която изследвахме е R25W, която се различава от останалите мутантни форми по това, че не „лежи“ в близост до потенциален сортиращ тирозинов мотив, а до потенциален сортиращ левцинов мотив, изграден от три остатъка на аминокиселината левцин (L) – L20LL. Апикалната експресия на R25W мутантите е с 60% повече, в сравнение с нормалните белтъци, което показва, че този левцинов мотив е важен за правилното сортиране на hBest1.

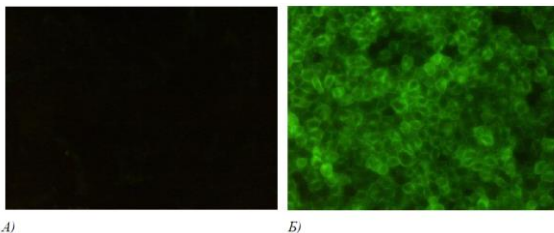
Изследваните мутанти с нарушение в базолатералното сортиране показват между 60% и 150% увеличение в количеството на белтъка по апикалната повърхност на клетките, в сравнение с нормалния hBest. Забелязва се зависимостта, че нарушенията в локализацията на мутантите са пропорционални на отдалечеността на мутацията от клетъчната мембрана: Y85H > Q96R-Y227N > L100R. Вероятно апикалното натрупване на белтъка с течение на времето предизвиква нарушаване на йонната пропускливост в апикалната и базолатералната мембрана на клетките на RPE. Намаляването на количеството на hBest1 на Бл мембрана може да обясни понижаването на светлинния пик на клиничните електроокулограми при пациенти с BVMD. Получените резултати показват, че нарушената локализация на hBest1 мутантите съответства на нарушения в състава и структурата на потенциалните базолатерални сортиращи мотиви Y85VTL, Y97ENL и Y227DWI, които могат да бъдат разпознати от „сортерите“, когато са разположени в цитоплазмената част на белтъка (каквито са тирозиновите мотиви Y97ENL и Y227DWI). В резултатите на нашите изследвания липсва пълно „обръщане“ на локализацията на мутантните белтъци при нарушаване структурата на сортиращите мотиви, затова е вероятно в сортирането да участват няколко мотива, които да оказват **аккумулятивен ефект** върху локализирането на hBest1. Също така, фосфорилирането на тирозин, най-вероятно е част от процеса на сортиране.

1.2. Стабилна експресия на hBest1 в клетки от линията MDCK II

MDCK II клетките, които бяха преходно трансфектирани с hBest1 и негови мутантни форми, губят експресията на белтъците около 72 часа след трансфекцията. Поради тази причина си поставихме задачата да създадем и охарактеризираме стабилно трансфектирана клетъчна линия RPE-1 (въпреки недостатъците на тези клетки описани в дисертацията), експресираща hBest1, което би помогнало в изследването на функцията и структурата на белтъка в ретинални епителни клетки. RPE-1 клетките бяха стабилно трансфектирани с

hBest1, като бяха отчетени относително слаби по интензитета флуоресцентни сигнали за положителна експресия на белтък при почти 100% от клетките.

Получаването на стабилни ретинални клетки от RPE-1 клетъчната линия, експресиращи hBest1, доближава фенотипа на тези клетките до „нативните“ клетки на РПЕ. Въпреки добрите резултати, които получихме със стабилно трансфектираните клетки, тази клетъчна линия не беше използвана в нашите по-нататъчни изследвания поради ниските нива на транслация на hBest1 и разликите в растежните характеристики с нетрансфектираните клетки. Поради тези причини се насочихме към създаването на **нова линия** от епителни MDCK II клетки, стабилно експресиращи hBest1.



А)

Б)

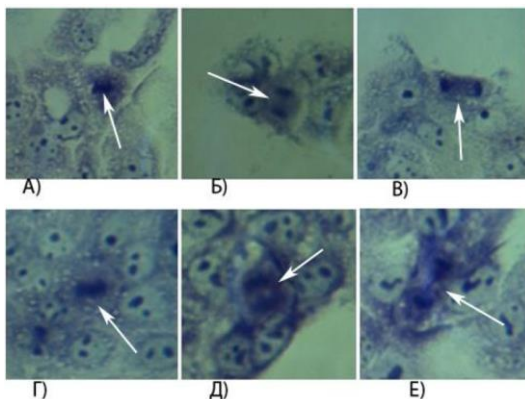
Фигура 6. Имунфлуоресценция на нетрансфектирани и стабилно трансфектирани с hBest1 MDCK II клетки. А) MDCK II клетки, нетрансфектирани с hBest1 (контрол). Не се наблюдава специфичен сигнал за hBest1. Б) MDCK II клетки, стабилно трансфектирани с човешки hBest1. Експресията на hBest1 (зелен цвят) се наблюдава в почти всички клетки.

MDCK II клетките бяха стабилно трансфектирани с ген за hBest1. Ефективността на трансфекцията беше установена чрез имунфлуоресценция (**Фигура 6**).

Около 100% от клетките бяха положителни за експресията на hBest1. Интензитетът на наблюдавания **сигнал за hBest1 беше силен** и правилно локализиран по клетъчната мембрана. Резултатът беше потвърден и биохимично чрез Western blot анализ, при който беше детектиран сигнал, отговарящ на молекулната маса на hBest1 (около 68 kDa) при трансфектираните клетки. Подобни резултати бяха получени дори и след няколко пасажирания, както и след замразяване/размразяване на клетките. По този начин доказахме, че трансфекцията с hBest1 е протекла успешно, като изолираните и стабилизирани клетки дадоха началото на **новата клетъчна линия MDCK II - hBest1**.

След изследване на растежните характеристики на нетрансфектираните MDCK II и MDCK II - hBest1 клетките, установихме, че **hBest1 не променя растежния профил** и не оказва влияние върху растежа на клетките. И при двата типа клетки наблюдавахме еднакви темпове на нарастване на клетъчната популация и не се забеляваше разлика във времето, което е необходимо те да преминат през отделните фази на растеж. Установихме и близки стойности на

МИТОТИЧНИЯ ИНДЕКС, което показва, че **hBest1** не повлиява и скоростта на делене на клетките.



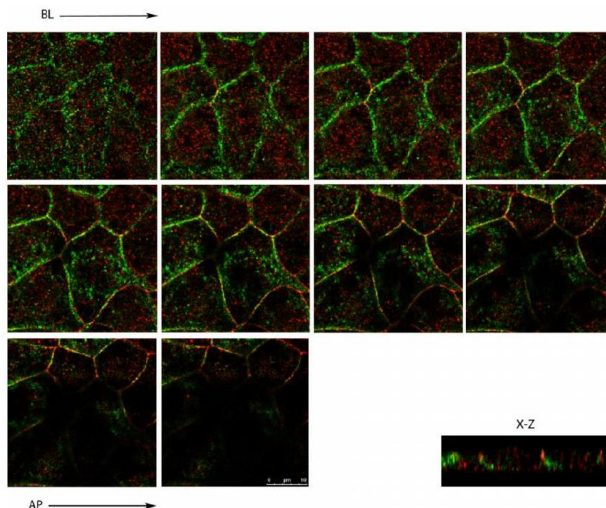
Фигура 7. MDCK II и MDCK II - hBest1 клетки в различни фази на митозата. Нетрансфектирани клетки: А) метафаза; Б) анафаза; В) телофаза. Стабилно трансфектирани MDCK II - hBest1 клетки: Г) метафаза; Д) анафаза; Е) късна телофаза. Делящите се клетки в съответните фази са показани със стрелки.

От направените наблюдения **не беше установена разлика в морфологията** между клетките на двете линии (показаха нормална изодиаметрична форма) (**Фигура 7**). Тези резултати, за разлика от резултатите, получени при трансфектираните RPE-1 клетки показаха, че MDCK II - hBest1 клетките могат да бъдат използвани в нашите последващи изследвания.

1.2.1. Изследване сортирането на hBest1 в поляризирани MDCK II - hBest1 клетки

За установяване на клетъчната локализация на hBest1 при стабилно трансфектираните MDCK II клетки, ние отново сравнихме отнасянето на имунофлуоресцентния сигнал от hBest1 спрямо ZO-1, както и спрямо GM130. Получените резултати показаха, че hBest1 е локализиран **по базолатералната мембрана** в поляризирани за шест дни MDCK II - hBest1 клетки (**Фигура 8**).

Контролните и нетрансфектирани MDCK II клетки, бяха поляризирани за шест дни, като показаха силен сигнал на ZO-1 и не показаха сигнал за ендогенна експресия на hBest1.

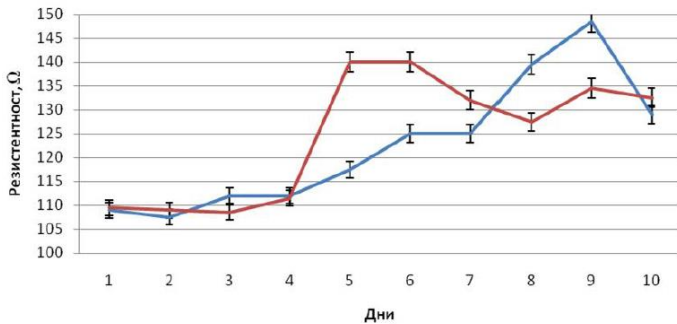


Фигура 8. Конфокални микроскопски снимки на стабилно трансфектираните MDCK II - hBest1 клетки, поляризирани за шест дни. На снимката са дадени последователни срези на клетките в посока от базолатералната страна (Bl) (горе в ляво) към апикалната (Ap) (долу в дясно). Сигналят на hBest1 е в зелено, а на ZO-1 е в червено. Бар = 10 μ m.

Освен Bl насочване на белтъка, установихме и частична ко-локализация на сигналите за hBest1 и GM130, което вероятно се дължи на hBest1 белтъчните молекули, „движещи“ се все още по биосинтетичните пътища на клетката, поради свръхекспресията на белтъка. От получените резултати можем да заключим, че hBest1 **не повлиява времето за поляризацията** на MDCK II клетките, защото нетрансфектираните и стабилно трансфектираните клетки достигат поляризацията приблизително за едно и също време, и че сортиращите сигнали в MDCK II клетките се „интерпретират“ както в ретиналните клетки.

1.2.2. Изследване на трансепителната резистентност при монослоеове от MDCK II - hBest1 клетки

Проследяването на промените в клетъчната резистентност в процеса на поляризиране на трансфектираните и нетрансфектираните MDCK II клетки показаха близки стойности на трансмембранна резистентност през първите дни (първи-четвърти ден) (**Фигура 9**).



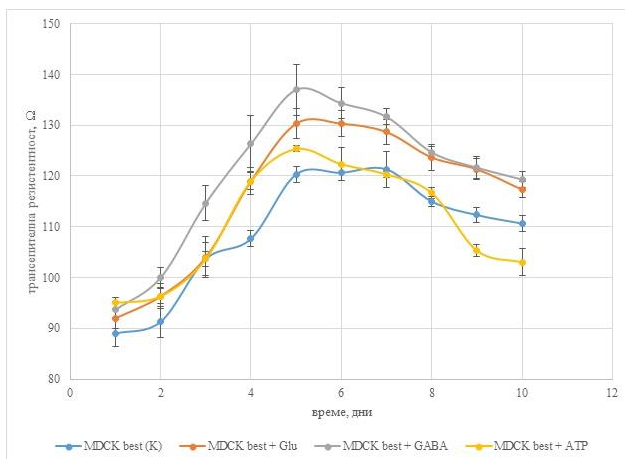
Фигура 9. Трансепителна резистентност на стабилно трансфектирани (в синьо) MDCK II - hBest1 и нетрансфектирани (в червено) MDCK II клетки в продължение на 10 дни (Mladenova et al., 2015 a).

От четвъртия до седмия ден при MDCK II - hBest1 клетките бяха детектирани по-ниски стойности на трансепителна резистентност (115 - 125 Ω) в сравнение с MDCK II клетките (133 - 140 Ω). Това би могло да се обясни с наличието на голямо количество белтък hBest1 в плазмената мембрана и увеличеното преминаване на йони в извънклетъчното пространство. От седмия до десетия ден трансфектираните клетки показват по-висока трансепителна резистентност (140 – 125 Ω), със стойности, подобни на тези от четвърти до седми ден при MDCK II клетките, като повишаването в TEP е възможно да се дължи на намаляването на вътреклетъчния пул от йони (Cl^-) и достигането на равновесие в йонния транспорт с участието на hBest1. Подобно равновесие в йонния транспорт може да обясни и понижението в TEP при MDCK II клетките след тяхното поляризиране.

Понижаването на резистентността при MDCK II - hBest1 клетките, може да се дължи и на непълно формираните или промени в плътните контакти, които да бъдат повлияни от hBest1, чрез калциевите йони, които „засягат“ актиновия цитоскелет. Повишената йонна проводимост, вследствие действието на hBest1, както и неговата вероятна функция на регулатор на калциеви канали, биха могли да повлияят реорганизацията на актина (беше установена подобна реорганизация на актиновия цитоскелет в трансфектираните клетки), който да „придърпа“ ZO-1 и оклудините, разположени в плътните контакти. В резултат на това те ще са леко отворени, така че пространството, образувано между плътните контакти да бъде достатъчно за преминаване на йони. Така TEP би могла да се понижи, докато MDCK II - hBest1 клетките отново не достигнат равновесие в йонния транспорт. От получените резултати следва, че не винаги клетъчната поляризация е свързана с адекватното/синхронното повишаване на трансепителна резистентност.

Амнокиселината Glu, GABA и ATP оказват влияние върху функционалната активност на hBest1, следователно бихме очаквали да въздействат и върху TEP на монослоя от клетки. При MDCK II - hBest1 клетките се наблюдава по-бързо достигане на максимална TEP (между 125 и 138 Ω) при

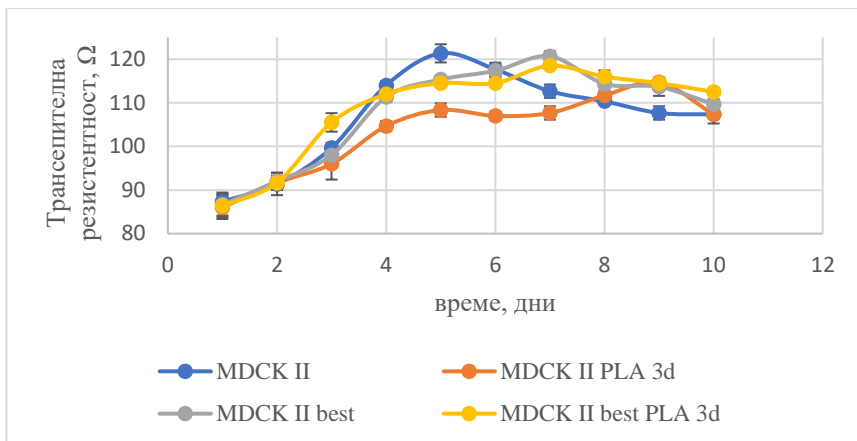
всички експериментални постановки (с участието на тези компоненти) на 5-6 ден, докато при контролата максимална ТЕР (120 Ω) е на 7 ден (**Фигура 10**).



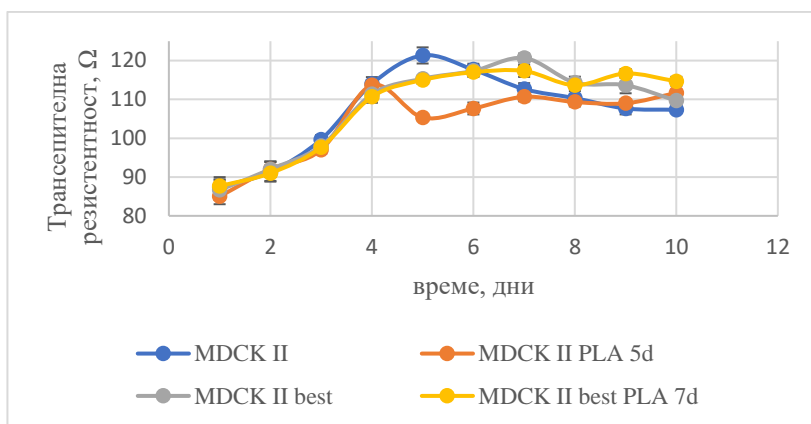
Фигура 10. Промяна на ТЕР при MDCK II - hBest1 клетки, инкубирани с ATP, Glu и GABA за 10 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm SE, n = 3.

Високите стойности на ТЕР, получени при добавянето на Glu и GABA, предполагат намаляване на активността на hBest1 и съответно, повишаване на съпротивлението на клетъчния монослой. Това важи в по-голяма степен за GABA, тъй като за разлика от MDCK II - hBest1, третираните с GABA нетрансфектирани клетки в последните дни от измерването показва стойности на ТЕР близки до контролната серия (около 95 – 100 Ω). Обратно, при клетките третираните с ATP установихме най-ниски стойности на ТЕР (около 100 – 102 Ω) в края на експеримента. Този резултат се дължи най-вероятно на активирането на hBest1, чрез свързването му с ATP и увеличаване потока на йони през клетките на монослой. Инхибирането и активирането на hBest1 (индиректното показано чрез ТЕР) не е неочаквано и се дължи на повишените концентрации на Glu, GABA (които hBest1 транспортира екстрацелуларно през мембраната) и ATP в средата за култивиране.

Биологичните мембрани са силно динамични ламеларни структури, които непрекъснато се реорганизируют и ремоделират от клетъчните фосфолипази. Установено е, че PLA₂ (EC 3.2.1.4) ензимите участват в разграждането на външните сегменти на фоторецепторите, след фагоцитирането им от РІРЕ. Поради това, за да се изследва ролята на hBest1 за трансепителната резистентност при реорганизацията на клетъчната мембрана, трансфектираните с hBest1 и нетрансфектираните MDCK II клетки, образували монослой, бяха подложени на действието на sPLA₂ в два етапа от неговото развитие в рамките на десет дни - при 100% конфлуентност (**Фигура 11**) на клетките и при максимална ТЕР на монослой (**Фигура 12**).



Фигура 11. Промяна на ТЕР (определена за 10 дни) при MDCK II и MDCK II - hBest1 клетки, инкубирани с 2μM sPLA₂ за 15 минути в деня на достигане на 100% конфлуентност (ден 3). Резултатите са представени като средна стойност ± SE, n = 3.

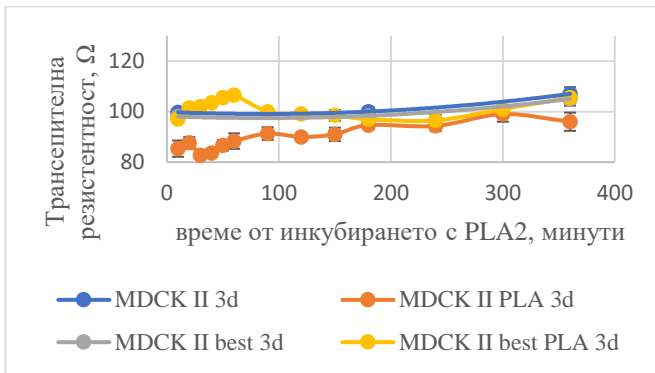


Фигура 12. Промяна на ТЕР (определена за 10 дни) при MDCK II и MDCK II - hBest1 клетки, инкубирани с 2μM sPLA₂ за 15 минути в деня на достигане на ТЕР_{max}. Резултатите са представени като средна стойност ± SE, n = 3.

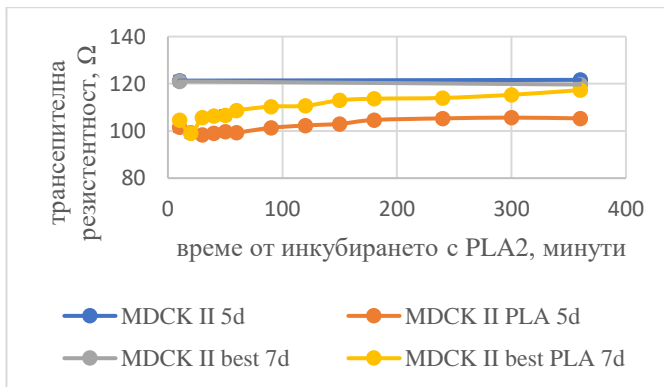
Установихме силно въздействие на sPLA₂ върху нетрансфектираните клетки и понижаване на ТЕР (около 20%) за разлика от ТЕР на монослоеве при MDCK II - hBest1 клетките, където се наблюдаваха минимални промени (под 10%) (Фигури 11 и 12). Подобен ефект наблюдавахме и при проследяване на ТЕР при монослой от нетрансфектираните клетки за шест часа от третирането с sPLA₂ (Фигури 13 и 14).

Този ефект може да се обясни с повишаване пропускливостта за йони, поради нарушения в мембраните, предизвикани от ензимното действие на sPLA₂,

които се възстановяват с течение на времето. При MDCK II - hBest1 клетките обаче (**Фигура 13**), действието на sPLA₂ имаше обратен ефект. TEP се повиши (от 98 до 108 Ω) за първите 60 минути, след което до четвъртия час стойностите се понижиха (до 98 Ω) и в края на експеримента достигнаха тези, измерени при контролните клетки (около 105 Ω). Ензимното действие на sPLA₂ увеличава течно-подредената фаза (което намалява пермеабилитета) и намалява течно-неподредената фаза в мембраните на клетките. Тази промяна и реорганизация във фазовите състояния може да доведе до промяна в структурата и функцията на hBest1 и инхибиране на каналните му функции, което е възможно да се асоциира с повишаването на TEP.



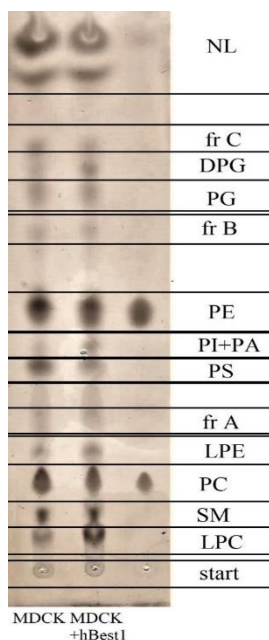
Фигура 13. Промяна на TEP (за 350 минути) при MDCK II и MDCK II - hBest1 клетки, инкубирани с 2μM sPLA₂ за 15 минути в деня на достигане на 100% конфлуентност (3 ден). Резултатите са представени като средна стойност ± SE, n = 3.



Фигура 14. Промяна на TEP (за 350 минути) при MDCK II и MDCK II - hBest1 клетки, инкубирани с 2μM sPLA₂ за 15 минути в деня на достигане на TEP_{max}. Резултатите са представени като средна стойност ± SE, n = 3.

1.2.3. Изследване на липидния състав в биологичните мембрани на MDCK II - hBest1 клетките

Промените в TEP при MDCK II - hBest1 клетките повдигнаха въпроса за липидния състав и хетерогенност в биологичните им мембрани. Структурата и функциите на всеки трансмембранен белтък, какъвто е hBest1, зависи от липидното обкръжение. В трансфектираните MDCK II клетки установихме разлики в няколко ключови фракции от липиди, в сравнение с нетрансфектираните клетки. В MDCK II - hBest1 клетките бяха детектирани по-големи количества от фосфатидилинозитол и фосфатидат (PI+PA, 90% повече) при смесената фракция, кардиолипин (DPG, 75% повече), както и за лизолипидите лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилетаноламин (LPC, 42% повече и LPE, 33% повече) и неопределената фракция A (fr A, 25% повече). В нетрансфектираните клетки бяха наблюдавани по-високи количества на неутралните липиди (NL – 20% повече), фосфатидилсерин (PS, 33% повече), фосфатидилхолин (PC, 13% повече), както и на неизвестната фракция C (fr C, 53% повече) (Фигура 15).

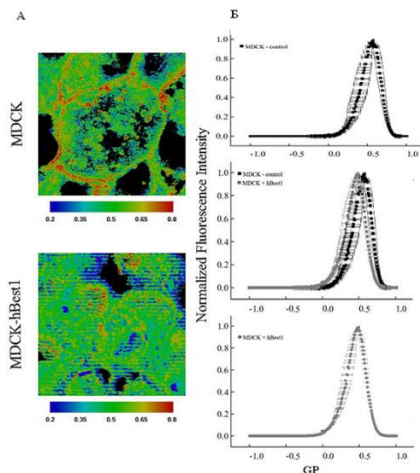


Фигура 15. Тънкослойна хроматография на липидни екстракти от MDCKII и MDCKII-hBest1 клетки. Легенда: NL – неутрални липиди; fr C – неизвестна фракция C; DPG – кардиолипин; PG – фосфатидилглицерол; fr B – неизвестна фракция B; PE – фосфатидилетаноламин; PI – фосфатидилинозитол; PA – фосфатидна киселина; PS – фосфатидилсерин; fr A - неизвестна фракция A; LPE – лизофосфатидилетаноламин; PC – фосфатидилхолин; SM – сфингомиелин; LPC – лизофосфатидилхолин.

Тези данни допълват изследванията на TEP (**Фигури 11, 12, 13, 14**), показващи, че MDCK II - hBest1 клетките са по-устойчиви на ензимното действие на sPLA₂, което може да се дължи на пониженото количество PC и повишеното количество лизолипиди, спрямо които ензимът не проявява или проявява незначителна активност. Подобна разлика в състава на основните фосфолипиди съществува при MDCK II клетките (около 58% PC и 28% PE) и клетките на RPE (в които hBest1 е ендогенно експресирани, около 20% PC и 67% PE). Тези данни повърждават, **че експресията на hBest1 в клетките е свързана с повишеното натрупване и/или биосинтеза на неламентарни липиди в мембраните**, в сравнение с ламеларните липиди. Също така е наблюдавана връзка между промяната на липидната биосинтеза (метаболизъм) и развитието на някаква патология, например с акумулирането на холестерол в RPE при развитие на болестта на Бест. Увеличаването на холестерола може да доведе до ремоделиране на мембраната и до промяна във функциите на мембранните белтъци. Това насочва вниманието към евентуалната роля на мутантни форми на hBest1 в ремоделирането на мембраната, чрез промяна в количествения баланс между ламеларни/неламентарните липиди и (не)образуването на липидни рафтове при отключването и развитието на различни патологични състояния.

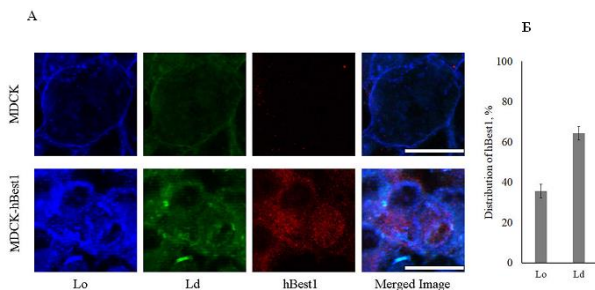
1.2.4. Асоцииране на hBest1 с липидните рафтове в биологичните мембрани на MDCK II - hBest1 клетките

Чрез витално оцветяване с Лаурдан беше демонстрирана разликата в мембранната хетерогенност в нетрансфектирани MDCK II и MDCK II - hBest1 клетки. В мембраните на трансфектираните с hBest1 клетки беше наблюдавано увеличаване на L_d домените в сравнение с L_d домените на нетрансфектирани клетки. GP (Generalised Polarization) изображенията и стойностите на GP, получени от хистограмите, доказаха **по-ниска степен на молекулно подреждане или по-голяма "флуидност" в клетъчните мембрани на MDCK II - hBest1 клетките**. Това е така, защото по-ниската подреденост корелира с по-ниските стойности на GP (0,472) и увеличения зелен сигнал в мембраните на трансфектираните клетки в сравнение с по-високите стойности на GP (0,575) и увеличения жълто-червен сигнал в мембраните на нетрансфектираните MDCK II клетки (**Фигура 16**). Този ефект на hBest1 потвърждава получените резултати за липидния състав в мембраните на MDCK II - hBest1 клетките, в които се наблюдава по-голямо количество неламентарни липиди, водещи до флуидизиране на мембраните и увеличаване на L_d домените в тях.



Фигура 16. GP изображения (А) и хистограми (Б), които показват по-неподредените (L_d в зелено, с по-ниски стойности на GP) и по-подредените (L_o в жълто-червен цвят, с по-високи стойности на GP) региони от клетъчната мембрана на живи MDCK II и MDCK II - hBest1 клетки. Данните са представени като средна стойност \pm SE, $n = 30$, $p < 0.01$. Стойността на p-value е определяна само за максималните стойности на GP за MDCK II и MDCK II - hBest1 клетки (Mladenov et al., 2020).

Имунофлуоресценцията на hBest1 визуализира **преобладаващата му локализация в по-малко подредените L_d области** на клетъчната мембрана (65 %), спрямо 35 % в повече подредените L_o домени (липидни рафтове) (Фигура 17).



Фигура 17. А: Флуоресценция на hBest1 (в червено) и Лаурдан в L_o (в синьо) и L_d (в зелено) региони на мембраните на MDCK II и MDCK II – hBest1 клетки. Б: Разпределение на hBest1 в L_o и L_d региони на клетъчни мембрани на живи MDCK II и MDCK II – hBest1 клетки. Резултатите са представени като средна стойност \pm SE, $n = 6$, $p < 0.001$, Скала= 10 μ m (Mladenov et al., 2020).

Подобна хетерогенност на асоциация беше наблюдавана и при разпределението на hBest1 в DRM (L_o - подобни микродомени) и DSM (L_d -

подобни микродомени) изолирани от MDCK II - hBest1 клетъчни мембрани (след разтваряне с нейонния детергент Triton X-100). Получените данни показаха около 30% локализация на hBest1 в DRM и 70% в DSM, въпреки физикохимичните особености на взаимодействията детергент-мембрана и ограниченията в експерименталната постановка.

Частичното разпределение на hBest1 между L_o и L_d фазите зависи от липидния и белтъчния състав, структурата, физикохимичните и биохимични характеристики на биологичните мембрани. Това разпределение оказва пряк ефект върху структурата, олигомеризацията и функцията на hBest1. Поради асоциирането на около 70% от hBest1 с L_d и DSM, вероятността липидните рафтове да имат по-скоро негативен, отколкото позитивен ефект върху активирането на белтъка е по-голяма, което косвено се потвърждава и от проведените експерименти с въздействието на PLA₂ върху увеличаването на TEP (виж по-горе).

1.3. Влияние на hBest1 мутантните форми Y85H, Q96R, R25W и Y227N при стабилизиране на тяхната експресия върху MDCKII клетките

Мутантните форми на hBest1 Y85H, Q96R, R25W и Y227N, които предизвикват развитието на BVMD, показаха нарушена Бл локализация при преходната им експресия в MDCKII клетките (виж по-горе). Стабилизирането на експресията на тези мутанти в RPE-1 и MDCKII клетките, подобно на нормалния hBest1 се оказва невъзможно, защото клетките отмираха до две седмици след пресяването им в селективна среда (съдържаща G418). Поради тази причина, нашите изследвания се насочиха към анализирани на преживяемостта на MDCKII клетките, трансфектирани с тези мутантни форми на белтъка, чрез изследване на апоптозата. Измерването на нивата на апоптозата на трансфектираните клетки беше извършено в момента на пресяване на клетките в селективната среда (първо измерване) и на третия ден след инкубиране на клетките в селективната среда (второ измерване).

И при двете измервания клетките, трансфектирани с дивия тип белтък показаха най-висока преживяемост (съответно около 75 и 40%). При клетките трансфектирани с мутантните форми в първия времеви момент беше отчетено **повишаване** на ранната (до 28%) и късната (до 38%) апоптоза. При второто измерване (на трети ден) на трансфектираните с мутантни форми клетки, незасегнатите клетки бяха под 30%. Тук отново бяха наблюдавани по-високи нива на ранна (над 50%) и късна (около 15-20%) апоптоза. Едни от най-високите нива на апоптоза бяха установени при клетките трансфектирани с мутантите Y227N, като токсичният им ефект се наблюдаваше веднага след трансфекцията. **Токсичността на тези мутантни форми**, която се прояви още на третия ден от селектирането, ограничи силно получаването и изолирането на стабилни клетъчни линии, които да ги експресират. Освен увеличената Ап локализация на различните мутантни форми на hBest1, промяната в транспорта на йони и хомеостазата на клетките, токсичното им действие може да бъде свързано и с промяната на липидния баланс (дисбаланс) и фазовото състояние, което да

предизвика дисфункция на мембраната (Ап и Бл имат характерен липиден профил). Затова са необходими други, алтернативни подходи за трансфекция, селекция и стабилизиране на трансфектираните клетки с мутанти на hBest1.

1.4. Обобщение на получените резултати от изследванията на hBest1 проведени върху клетъчни култури

Тези изследвания започнаха с подбора на подходяща клетъчна линия и потенциалните базолатерални сортиращи мотиви в молекулата на hBest1. Нашите резултати показаха, че:

- Ретиналните клетки от линиите RPE-1 и RPE-J не са подходящи за изследване сортирането на Best1, поради застъпване на клетките при образуване на монослой в процеса на клетъчната поляризация.

- Епителните клетки от линията MDCK II са добър модел за изследване сортирането на hBest1, поради образуването на типичен монослой с добре дефинирани апикална и базолатерална мембрана в процеса на клетъчната поляризация.

- При преходната трансфекция на нормален hBest1, белтъка се локализира по базолатералната мембрана в полярни MDCK II клетки, подобно на клетките в RPE, т.е. и двата типа клетки интерпретират по сходен начин сортиращите сигнали в молекулата на hBest1.

- **Нарушенията в състава и структурата на потенциалните базолатерални сортиращи мотиви Y85VTL, Y97ENL и Y227DWI, предизвикват увеличаване на апикалната локализация на hBest1 мутантните форми (15% за p.Y85H ($P = 5.37 \times 10^{-5}$), 10% за p.Q96R ($P = 0.0001$), 6% за p.L100R ($P = 0.0009$) и 9% за p.Y227N ($P = 5.20 \times 10^{-5}$).**

- Липсва пълно „обръщане“ в локализацията на мутантните белтъци с нарушени сортиращи мотиви, затова е възможно в сортирането да участват няколко мотива, които да оказват акумулативен ефект върху локализирането на hBest1. Също така, фосфорилирането на тирозин, най-вероятно е част от процеса на сортиране.

Изследванията продължиха със създаването и охарактеризирането на стабилни клетъчни линии експресиращи hBest1.

- Беше създадена стабилната клетъчна линия RPE-1 - hBest1, експресираща дивия тип hBest1, но получения сигнал за транслацията на hBest1 беше много слаб. Клетките от линията показаха понижени стойности в темповете на растеж, митотичен индекс и метаболитна активност, променена морфология (увеличен обем на клетките) и повишена TEP в сравнение с нетрансфектираните клетки. Поради това тази линия не беше използвана в по-нататъшните изследвания.

- Беше създадена новата стабилна клетъчна линия MDCK II - hBest1, експресираща дивия тип hBest1, като получения сигнал за транслацията на hBest1 беше достатъчно силен. Растежните характеристики, метаболитната активност и морфологията на клетките останаха непроменени, аналогични на тези при нетрансфектираните

клетки. Поради тези причини тази линия беше използвана в последващите изследвания. Стабилизирането на експресията на hBest1 мутантните форми Y85H, Q96R, R25W и Y227N винаги предизвикваше апоптоза и отмиране на MDCK II клетките, затова не беше възможно създаването на стабилни клетъчни линии, които да ги експресират. Създаването на новата линия MDCK II - hBest1, беше първата критична стъпка в проучванията на hBest1, което предопредели последвалите изследвания.

- hBest1 се локализираше по базолатералната мембрана в поляризирани за шест дни MDCK II - hBest1 клетки (не променя времето за поляризиране на клетките).

- TER в процеса на поляризиране на MDCK II - hBest1 клетките (между четвъртия и седмия ден) показваше по-ниски стойности на трансмембранна резистентност (115 - 125 Ω) в сравнение с MDCK II клетките (133 - 140 Ω). Максималните стойности на TER бяха достигнати между осмия и деветия ден при трансфектираните (140 – 150 Ω) в сравнение с нетрансфектираните (140 Ω) MDCK II клетки (пети и шести ден). Забавянето в достигане на максималните стойности на TER при MDCK II - hBest1 клетките показва, че не винаги клетъчната поляризация е свързана със синхронното повишаване на трансепителна резистентност.

- Високите стойности на TER, които получихме при добавянето на Glu и GABA и ниските при добавянето на АТФ, предполагат намаляване и съответно увеличаване на активността на hBest1.

- Установихме силно въздействие на sPLA₂ върху нетрансфектираните клетки и понижаване на TER (около 20%) за разлика от TER на монослоя от MDCK II - hBest1 клетките, където се наблюдаваха минимални промени (под 10%). Трансфектираните клетки бяха по-резистентни към ензимното действие на sPLA₂.

- Установихме, че експресията на hBest1 в клетките е свързана с повишеното натрупване и/или биосинтеза на неламеларни липиди в мембраните, в сравнение с ламеларните липиди, което определя и по-силната резистентност към sPLA₂.

- В мембраните на трансфектираните с hBest1 клетки беше наблюдавано увеличаване на L_d домените в сравнение с L_d домените в нетрансфектирани клетки.

- Показвахме, че hBest1 се локализира и самоорганизира в по-малко подредените L_d области на клетъчната мембрана (около 60-65 %), спрямо 30-35 % в повече подредените L_o домени (липидните рафтове).

По какъв начин hBest1 си взаимодейства с отделните липиди в L_o и L_d домените на биологичните мембрани, как се променя неговата конформация, молекулна организация и активност беше обект на допълнителни дискусии и допълнителни изследвания с модели на биологични мембрани (описани в следващите изследвания).

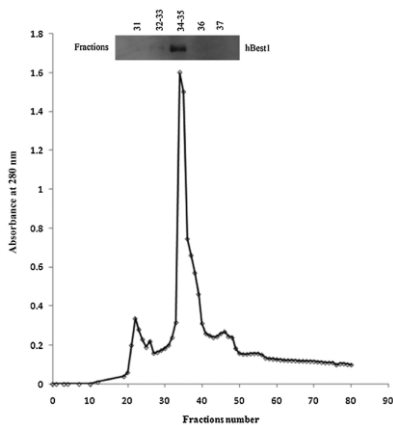
2. Изследвания на hBest1 в модели на биологични мембрани

2.1. Изолиране и пречистване на hBest1 от MDCK II - hBest1 клетките

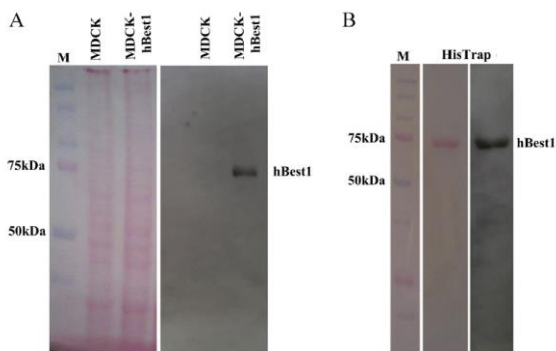
За изолирането на hBest1 бяха използвани клетките от създадената от нас линия MDCK II - hBest1.

Оптимизирането на протокола за пречистване на hBest1 включваше различни комбинации и последователности от методи за пречистване (основно молекулно-ситова и афинитетна хроматографии) и варианти на буфери.

Най-добри резултати бяха получени чрез прилагане на молекулно-ситова хроматография като първа стъпка, непосредствено след клетъчния лизис. След лизиса и всяка стъпка на пречистване, пробите съдържащи hBest1 бяха диализирани срещу съответния елуиращ буфер. Профилът на елуиране от колона Superose 12 беше проследен чрез измерване на абсорбцията при 280 nm (**Фигура 18**). По този начин пробите бяха пречистени от многокомпонентния лизисен буфер и клетъчните белтъци с ниска и висока молекулна маса бяха отстранени (**Фигура 19А**). hBest1 сигнал с очакван размер от 68 kDa беше детектиран във фракции No. 34 и 35, което беше доказано и чрез Уестерн блот анализ (**Фигура 18**). Като втори етап от пречистването беше използвана Афинитетна хроматография - нанасяхме обединените фракции, съдържащи His-свързан hBest1 върху HisTrap колона. Всички фракции, събрани на този етап, бяха анализирани отново чрез Western blot и hBest1 беше визуализиран като единичен сигнал от 68 kDa (**Фигура 19В**). Чрез метода на Смит (Smith) беше установено, че добивът на чистия His-свързан hBest1, изолиран от MDCK II клетки е около 2,8% (на базата на общото белтъчно съдържание, отчетено в тоталните клетъчни лизати). Използването на тази оптимизирана пречистваща схема от две стъпки обезпечи получаването на голямо количество пречистен hBest1, който да се използва в последващите изследвания.



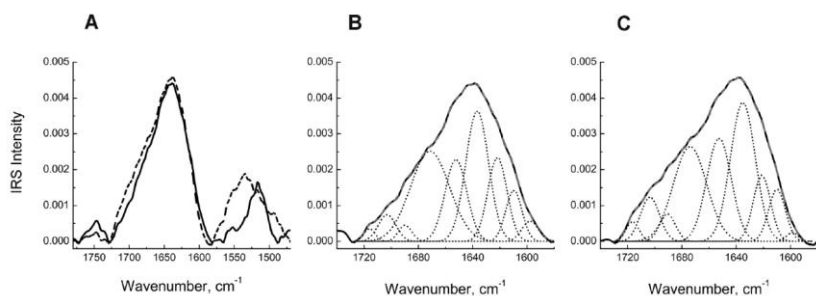
Фигура 18. Пречистване на hBest1 от MDCK II - hBest1 клетки - Superose 12 колона HR 10/30 гел-филтрационна хроматография и имуноблот на фракции, обогатени с hBest1 (Mladenova et al., 2014).



Фигура 19. Ponceau S оцветяване (червено) и имундетектиране на hBest1: **(А)** тотални лизати от MDCK II и MDCK II - hBest1; М (белтъчен маркер); **(В)** пречистен hBest1 след стъпката на афинитетна хроматография чрез HisTrap. hBest1 се открива като ивица от 68 kDa (Mladenova et al. 2014).

2.2 Анализирание на елементите на вторичната структура на белтъка hBest1 чрез инфрачервена спектроскопия с Фурие-трансформация (FTIR spectroscopy)

Поради липсата на данни в литературата за вторичната структура на човешкия Best1, нашите изследвания с модели на биологични мембрани започнаха с определянето на елементите на вторичната му структура (в отсъствие и в присъствие на Ca^{2+}) чрез инфрачервена спектроскопия с трансформация на Фурие. На **Фигура 20А** са показани областите на амид I и амид II абсорбционните ивици във FTIR спектъра на водни разтвори от hBest1 and hBest1^{Ca}.



Фигура 20. **(А)** FTIR спектри на hBest1 (черна крива) и hBest^{Ca} (прекъснатата крива) в областта на амид I (центриран при 1638 cm^{-1}) и амид II (определен при 1534 cm^{-1} за hBest1 и 1517 cm^{-1} за hBest^{Ca}) абсорбционни ивици. Компонентите на разлагане (пунктирани линии) и гаусовите съответствия (Gaussian fits, прекъснати сиви линии) с коефициент на корелация $R \geq 0,9998$, напълно съвпадат с оригиналните IRS-спектри (черни линии) на **(В)** hBest1 и **(С)** hBest1^{Ca} (Mladenova et al., 2017).

Sample	WN, cm ⁻¹	Assignment	Relative content, %
hBest1	1716	COOH group of sidechain-aspartic and glutamic acids (protonated form)	
	1703	COOH group of sidechain-aspartic and glutamic acids (with two hydrogen bonds)	
	1690	anti-parallel β -sheets	2.0
	1671	β -turns and loops	32.2
	1652	α -helix	16.3
	1637	3_{10} -helix	27.2
	1622	aggregated β -sheets	14.7
	1610	short helices	7.6
	1598	Sidechain-tyrosine in deprotonated state	
	1716	COOH group of sidechain-aspartic and glutamic acids (protonated form)	
hBest1 ^{Ca}	1703	COOH group of sidechain-aspartic and glutamic acids (with two hydrogen bonds)	
	1690	anti-parallel β -sheets	3.7
	1674	β -turns and loops	27.2
	1653	α -helix	21.9
	1635	3_{10} -helix	29.8
	1621	aggregated β -sheets	9.9
	1610	short helices	7.5
	1598	Sidechain-tyrosine in deprotonated state	

Таблица 1. Вторични структури на чист hBest1 и в присъствие на Ca²⁺ (Mladenova et al., 2017).

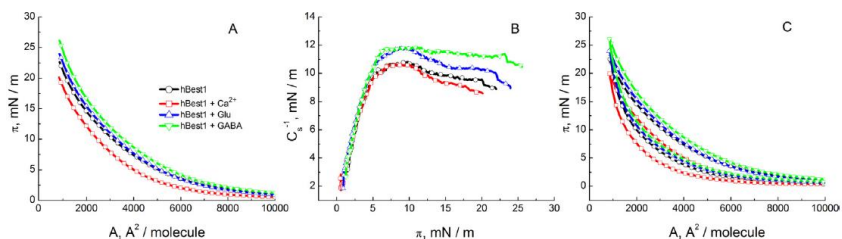
Установихме, че в състава на вторичната структура на hBest1 (Фигура 20В и Таблица 1) се включват предимно спирални структурни елементи (51,1%), включващи главни и къси α -спирали (23,9% общо), и 3_{10} -спирали (27,2%). Добавянето на Ca²⁺ предизвиква конформационни промени, чрез увеличаване на всички спирални структури до 59,2%, дължащи се основно на нарастване на съдържанието на α -спиралите (с 5,6%), докато увеличението на 3_{10} -спиралите и късите спирални участъци остава малко (Фигура 20С и Таблица 1).

FTIR спектрите показват, че вторичната структура hBest1 се променя значително от присъствието на Ca²⁺, изразяващо се в увеличаване на спиралните структури за „сметка“ на късите свързващи участъци. Свързването на Ca²⁺ предизвиква и стабилизира определени конформационни промени в структурата на hBest1, най-вероятно определящи функционалната активност на белтъчните молекули.

2.3. Изследване на повърхностните свойства на hBest1 в Лангмюирови монослоеви и Лангмюир-Блоджетови филми

2.3.1. Влияние на Ca²⁺, Glu и GABA върху π/A изотермите и хистерезисите на Лангмюирови монослоеви от hBest1

Освен Ca²⁺, които предизвикват промени в структурата на hBest1, транспортът на невротрансмитерите (като Glu, GABA, серотонин и др.) през плазмените мембрани на клетките също може да индуцира различни конформационни промени в белтъчните транспортери и самите мембрани. Тези промени определят като ключово физикохимичното разбиране за влиянието на Ca²⁺, Glu и GABA върху структурните и повърхностните свойства на hBest1 за изясняване на неговите функции. Поради това проведехме изследвания за определяне на ефектите на Ca²⁺, Glu и GABA върху повърхностната активност и поведение на hBest1 в Лангмюирови монослоеви при физиологични условия.



Фигура 21. **А)** Изотерми повърхностно налягане/средна молекулна площ (π/A) на монослое от hBest1; **В)** Модули на мембранна еластичност C_s^{-1} като функция на повърхностното налягане (π) и **С)** π/A хистерезисни криви на компресия-декомпресия на монослое от hBest1 на фазовата граница въздух/вода. Подфазите съдържат 150 mM NaCl с допълнително добавяне на Ca^{2+} , Glu и GABA (Andreeva et al., 2018).

Изотермите повърхностно налягане/средна молекулна площ (π/A) позволяват детектиране дори на много малки промени в молекулите като размери, конформация или наличие на двойни връзки, които могат да променят латералната организация на монослоя. На **Фигура 21** са сравнени π/A изотермите на монослое от hBest1, hBest1^{Ca}, hBest1^{Glu} и hBest1^{GABA}. Кривите на всички изотерми имат еднаква гладка форма и са почти успоредни една на друга. Намалването на средната молекулна площ по време на компресията води до повишаване на повърхностното налягане, но без наличие на плата или чупки, които да показват наличието на конформационни и фазови преходи. Началната стойност на повърхностното налягане при разтичане на монослоеве от hBest1 ($\pi_0 = 0,7$ mN/m) се променя при добавяне на различните компоненти - при Ca^{2+} се понижава и е най-ниско ($\pi_0 = 0,4$ mN/m), а при GABA се повишава и е най-високо ($\pi_0 = 1,2$ mN/m). В резултат на това, изотермите на компресия при монослоеве hBest1^{Ca} и hBest1^{GABA} се отместват към по-ниско и съответно по-високо повърхностно налягане при дадена площ за молекула и съответно по-ниска и по-висока площ за молекула при дадено налягане, в сравнение с изотермите на чист hBest1. π/A изотермите показаха, че добавянето на Ca^{2+} , Glu и GABA индуцира промени в средната площ за молекула (A) на hBest1, както следва: $A^{Ca^{2+}} < A^{NaCl} \leq A^{Glu} < A^{GABA}$. Чрез екстраполация на наклона на стръмната част от изотермите, при високи двумерни налягания, към нулево налягане, определихме най-ниската (малката) възможна площ за молекула, A_0 , до която може да се компресира монослоя без да настъпи колапс, която за hBest1^{Glu} и hBest1^{GABA} е подобна като тази на монослоя от hBest1 ($A_0 = 3700$ Å²/мономер) и е значително по-ниска за hBest1^{Ca} ($A_0 = 3360$ Å²/мономер). От кристалографския анализ на Best1-Fab комплексите са получени размери 70×70 Å за един мономер, което определя площ от приблизително 3850 Å²/мономер. Стойностите на граничните площи за hBest1, hBest1^{Glu} и hBest1^{GABA} са близки до тази на chBest1, докато намалването на A_0 в присъствието на Ca^{2+} вероятно е резултат от сложното взаимодействие между няколко фактора, включително промяна на молекулярните електростатични взаимодействия, разлика в плътността на опаковането на

молекулите, конформацията и ориентацията на hBest1 молекулите на фазовата граница буфер/въздух. При монослоеве с и без Glu и GABA граничните площи A_0 са сходни, докато площите при дадено повърхностно налягане се различават, което отново показва различна организация и плътност на опаковане на белтъчните молекули. Добавянето на Ca^{2+} , Glu и GABA към монослой от hBest1 променя площта за молекула A_{20} (при повърхностно налягане 20 mN/m) в реда: $A_{20}^{Ca^{2+}}$ (840 Å²/молекула) < A_{20}^{NaCl} (1130 Å²/молекула) < A_{20}^{Glu} (1300 Å²/молекула) < A_{20}^{GABA} (1490 Å²/молекула). Във всички случаи тези площи са по-ниски от кристалографската площ, вероятно поради екструзия на белтъчните молекули към водната фаза по време на компресия. Подобно поведение е било наблюдавано и за монослоеве на други белтъци, при които с увеличаване концентрацията на солта намалява „потъването“ на молекулите, което позволява да се определи реалната мономерна площ.

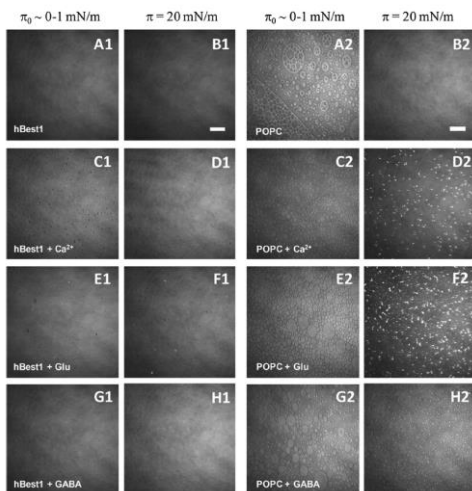
Промените в еластичността и структурата на монослоеве от hBest1 бяха анализирани чрез кривите на модулите на еластичност спрямо повърхностното налягане (C_s^{-1}/π) (Фигура 21B). Установихме, че могат да бъдат разграничени два региона: първи с относително стръмен растеж на C_s^{-1} по време на първоначалното компресиране до ~ 7 mN/m, поради реорганизацията и уплътняването на молекулите; и втори, след достигане на максимум – бавно постепенно намаляване на модулите на еластичност до края на компресията, което предполага преориентиране на белтъчните молекули на повърхността и по-малка стабилност на монослоеве при $\pi > 11$ mN/m. Максималните модули на еластичност ($C_s^{-1}(\max) = 10,7$ mN/m за hBest1 и hBest1^{Ca} и $C_s^{-1}(\max) = 11,8$ mN/m за hBest1^{Glu} и hBest1^{GABA}) са на долната граница на тази характеристика за течно-разтегнати (LE, liquid-expanded) липидни филми (варираща от 12,5 до 50 mN/m).

Допълнителна информация за молекулярните взаимодействия, структурните пренареждания и стабилност в монослоеве дава хистерезисът на компресия-декомпресия на π/A изотермите. Поради това сравнихме π/A хистерезисните бримки на филмите от hBest1 (Фигура 21C). Установихме, че кривите на декомпресия се изместват към по-ниско-молекулни области, което предполага, че филмите са в различни състояния по време на компресия и декомпресия. Разликата в площта между кривите на свиване и разширение, при всяко фиксирано повърхностно налягане, т.е. хистерезисът, ΔA^π , нараства в следния ред: $\Delta A^{Ca^{2+}} < \Delta A^{NaCl} \leq \Delta A^{Glu} < \Delta A^{GABA}$. Данните показаха, че всички изследвани монослоеве имат значителен хистерезис, който намалява с нарастване на π . Само за монослоеве от hBest1^{Ca} хоризонталните π/A участъци на компресия и декомпресия съвпадат, което показва, че крайното състояние на монослоя е същото в края на разширяването и в началото на компресията, т.е. двата процеса са напълно обратими. Предполагаме, че в присъствието на Ca^{2+} , по-хидрофобните hBest1 молекули, които са потънали в подфазата при повишено повърхностно налягане, се връщат обратно по време на декомпресия. Дори измерванията на два последователни цикъла на компресия/декомпресия (данните не са представени) показаха, че те напълно съвпадат, потвърждавайки, че „потъването“ на молекулите от hBest1^{Ca} филма в подфазата е обратим процес. При

останалите монослоеве hBest1, hBest1^{Glu} и hBest1^{GABA} стойностите на повърхностното налягане в края на разширяването е с 0,5 mN/m по-ниско от това в началото на компресията, което предполага или необратими промени в организацията и/или ориентацията на протеиновите молекули, или „невръщане“ (“non-return”) на белтъчни агрегати, образувани по време на компресията, до първоначалното им състояние след декомпресията. При повторение на компресия-декомпресия на монослоя, цикълът започва и завършва при същото π , при което завършва първият. И двата цикъла съвпадат при $\pi > 15$ mN/m, което предполага, че потапянето на hBest1 в субфазата е обратим процес и не е причина за несъответствието между стойностите в начално и крайното повърхностно налягане на първия цикъл, а най-вероятно се дължи на преориентацията и реорганизацията на белтъчните молекули на повърхността на монослоя.

2.3.2. Влияние на Ca²⁺, Glu и GABA върху морфологията на Лангмюирови монослоеве от hBest1

Следващата стъпка в изследването на Лангмюирови монослоеве от hBest1 в присъствие на Ca²⁺, Glu или GABA беше да визуализираме филмите чрез Брюстеръглова микроскопия (при определено π съответстващо на π/A изотермите) и да определим тяхната морфология. Бяха направени ВАМ изображения на hBest1 монослоеве в присъствието и отсъствието на Ca²⁺, Glu и GABA, 30 минути след нанасяне на монослоя, но преди компресия (Фигура 22, 1-ва колона) и при повърхностно налягане 20 mN/m (Фигура 22, 2-ра колона).

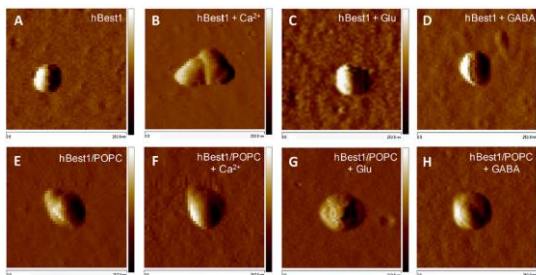


Фигура 22. ВАМ изображения на филми от hBest1 (колони 1 и 2) и POPC (колони 3 и 4) върху водни субстрати, съдържащи 150 mM NaCl (A1, B1, A2, B2) с добавяне на 0,5 M Ca²⁺ (C1, D1, C2, D2), 2 mM Glu (E1, F1, E2, F2) и 100 μ M GABA (G1, H1, G2, H2), направени 30 минути след разстилане на некомпресирани монослоеви и монослоеве при 20 mN/m. Бар = 100 μ m (Andreeva et al., 2018).

Въз основа на ВАМ изображенията и π/A изотермите можем да заявим, че монослоеве от hBest1, hBest1^{Ca}, hBest1^{Glu} и hBest1^{GABA} имат различна плътност на опаковане, произтичаща от промяната в белтъчната конформация, белтък-белтъчните взаимодействия и промяна в белтъчната макро- и самоорганизация на фазовата граница въздух/буфер. Брюстеръгловата микроскопия обаче не позволява разграничаване на точните конформации на белтъчните комплекси от hBest1 преди и след третиране с Ca²⁺, Glu или GABA, затова нашите изследвания продължиха с използването на атомно-силотова микроскопия (AFM), която даде възможност за визуализиране на промените в нанометричните размери, структура и организация на белтъчните молекули.

2.3.3. Влияние на Ca²⁺, Glu и GABA върху топологията на hBest1 Лангмюир-Блоджетови филми

В описаните до тук изследвания показахме, че hBest1 притежава значителна повърхностна активност и образува стабилни Лангмюирови монослоеве на фазовата граница въздух/буфер, което позволи да извършим т. нар. Лангмюир-Блоджетов (Langmuir-Blodgett) трансфер на компактните hBest1 филми от водна (150 mM NaCl, pH 7) към твърда подложка и последваща визуализация чрез AFM. Установихме, че hBest1 молекулите имат овална форма с латерални размери в XY равнината 100 × 160 Å (след деконволюция на върха на острието) и височина 75 Å (**Фигура 23А**) (всички данни са показани в **Таблица 2**), като тези размери на белтъка, надвишават стойностите от 70 × 70 Å и височина 95 Å, които са изчислени за chBest1.



Фигура 23. Типични AFM изображения на hBest1 молекула. Сканираната област е около 250 × 250 nm (Andreeva et al., 2018).

Sample	Lateral dimensions, Å	Height, Å
hBest1	100 × 160 (±20)	75 (±10)
+Ca ²⁺	200 × 670 (±20)	220 (±20)
+Glu	180 × 220 (±20)	80 (±10)
+GABA	180 × 220 (±20)	100 (±10)
hBest1/POPC	230 × 260 (±20)	120 (±10)
+Ca ²⁺	280 × 330 (±20)	120 (±10)
+Glu	220 × 240 (±20)	100 (±10)
+GABA	260 × 310 (±20)	150 (±15)

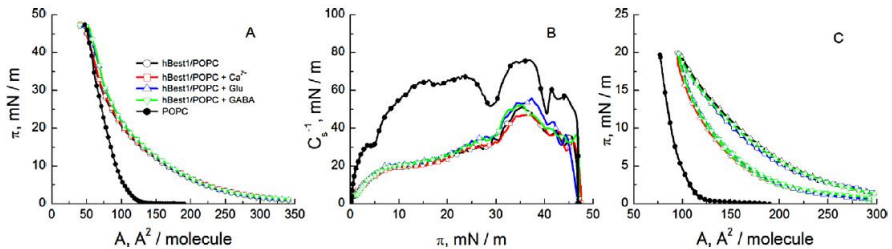
Таблица 2. Латерални размери и височина на hBest1, получени от AFM-изображенията, след деконволюция на върха на острието (±стандартно отклонение) (Andreeva et al., 2018).

Това несъответствие би могло да се дължи както на по-голямата АК-последователност на hBest1 (585 АК за hBest1), така и на спецификите на използваните методи. Добавянето на Ca²⁺ променя вторичната структура на hBest1, причинявайки мощен ефект, при който се индуцира белтъчна агрегация (димеризация и тримеризация) (Фигура 23В и Таблицы 1 и 2). Увеличените размери на hBest1 в присъствието на Ca²⁺ показват съществуването на напълно нова подредена олигомерна структура, дължаща се на индуцираните конформационни промени, а не само на простата сума от отделните молекули. Индуцираното от Ca²⁺ образуване на олигомерни (от по-висок порядък) структури е демонстрирано за хомолози на hBest1 и редица други белтъци. Присъствието на Ca²⁺ води до образуване на стабилни пентамерни кристали, които са докладвани за KpBest и chBest1 в комплекс с Fab- фрагменти на моноклонално антитяло. Олигомеризацията на hBest1 обаче (образуване на димерни, тетрамерни или пентамерни структури), е все още обект на обсъждане. Обратно, не беше наблюдавано агрегиране на молекули след третиране с Glu и GABA. hBest1 запази първоначалната си овална форма и височина, но увеличи до известна степен латералните си размери (180 × 200 Å) в резултат на преориентация и/или промяна на структурата (Фигура 23С, D и Таблица 1).

2.4. Влияние на Ca²⁺, Glu и GABA върху π/А изотермите и хистерезисите на hBest1/POPC Лангмюирови монослое

Изследванията на повърхностните свойства на hBest1 продължиха с построяването на модели на биологични мембрани близки до нативните, каквито са смесените Лангмюирови монослое (многокомпонентните монослое, съдържащи белтъци и липиди). За да изследваме свойствата на **бинарните hBest1/POPC монослое**, ние използвахме такива моделни мембрани, в които съотношението на площта, заета от белтъчните молекули, към тази, заета от околните липиди, е 1:3. При повърхностно налягане 20 mN/m повърхностната площ на една молекула hBest1 ($1150 \pm 20 \text{ \AA}^2$) (Фигура 21А) е 15 пъти по-висока от тази на една POPC молекула ($78 \pm 2 \text{ \AA}^2$) (Фигура 24А), което определи моларното съотношение на двата компонента за бинарните hBest1/POPC Лангмюирови монослое да бъде 1/45. π/А изотермите на двукомпонентните

hBest1/POPC (1:45) монослоеве, в присъствието и в отсъствието на Ca^{2+} , Glu и GABA във водната подфаза, са показани на **Фигура 24А**. За сравнение изотермата на POPC филма също е представена на фигурата и показва, че монослоят е в LE фаза до своя колапс при 46 mN/m. π/A изотермите на POPC, както и изотермите на hBest1/POPC монослоеве в присъствието и отсъствието на Ca^{2+} , Glu и GABA са неразличими една от друга и имат идентичен ход.



Фигура 24. **А)** Изотерми повърхностно налягане/средна молекулна площ (π/A) на POPC и hBest1/POPC (1/45) монослоеве; **В)** Модули на еластичност C_s^{-1} като функция на повърхностното налягане (π) и **С)** π/A хистерезисни криви на компресия-декомпресия на POPC (те съвпадат и са представени като запълнени черни кръгове) и hBest1/POPC монослоеве на фазовата граница въздух/вода. Подфазите съдържат 150 mM NaCl с допълнително добавяне на Ca^{2+} , Glu и GABA (Andreeva et al., 2018).

Известно е, че фазов преход от втори род между две кондензирани състояния на монослоя се извява като чупка в π/A изотермите. Понеже нито един от компонентите на смесените филми не образуваха кондензирани фази, то пречупването, което се наблюдаваше при ~ 31 mN/m (π_{tr}), е приблизително повърхностното налягане в клетъчните мембрани, в π/A изотермите на смесените hBest1/POPC филми показва колапс на един от компонентите. При повърхностно налягане под π_{tr} π/A изотермите на hBest1/POPC филмите силно наподобяваха тези на монослоеве от hBest1 (**Фигура 21А**), въпреки че неговата молна фракция е само 1/45. При $\pi > \pi_{tr}$ (над 35 mN/m) изотермите ставаха по-стръмни и се припокриваха с тези на POPC.

Съгласно правилото на Гибс за фазите, приложено към Лангмюиоровите монослоеве, броят на степените на свобода F на двукомпонентен монослой при постоянна температура и атмосферно налягане е $F = 2 - q$. Ако компонентите са несмесваеми и образуват две повърхностни фази ($q = 2$), системата няма степени на свобода $F = 0$ и повърхностното налягане на колапс, π_{col} , (в монослоят се появяват области в 3D обемната фаза) не зависи от състава на монослоя. Съответно, промените на π_{col} , в зависимост от състава на филма са индикация за молекулярно смесване на компонентите. От **Фигура 24А** е видно, че π_{col} (π_{col} - повърхностно налягане на колапса) на монослоеве hBest1/POPC се припокриват с тези на монослоя от POPC (около 46 mN/m), следователно **hBest1 и POPC са несмесваеми на границата въздух/буфер**. Тези резултати предполагат, че компресията на бинарните монослоеве води до екструзия на белтъчните молекули

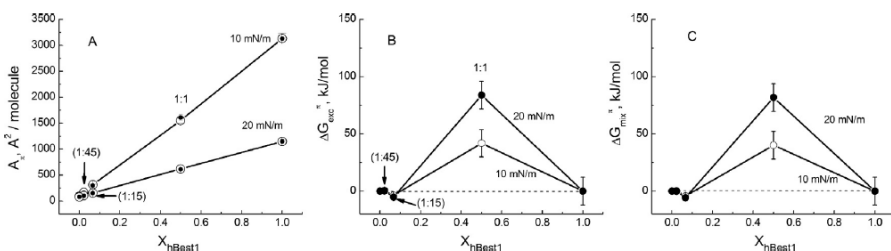
към водната фаза и при $\pi > \pi_{tr}$ на повърхността присъстват основно липидните молекули, които при компресия до 46 mN/m преминават в обемна фаза (колапс на монослоят). Следователно пречупването в π/A изотермите на монослоеве представлява края на екструзията на белтъка към водната субфаза.

C_s^{-1}/π зависимостите на РОРС и hBest1/РОРС монослоеве показва сходна тенденция (**Фигура 24В**). В модулите на еластичност не се наблюдаваха плата и/или резки „скокове“, а плавно нарастване до ~ 31 mN/m (π_{tr}) и след това ставаха по-стръмни, достигайки максимум от ~ 45 mN/m, където са инфлексните точки на π/A изотермите. Рязкото намаляване на C_s^{-1} над ~ 46 mN/m показва, че филмите преминават в колапс. Модулите на еластичност на четирите смесени филми при всяко повърхностно налягане са много сходни, което потвърждава, че те са в едно и също фазово състояние. Максималните модули на еластичност на РОРС монослоеве са 1,5 пъти по-високи от тези на hBest1/РОРС монослоеве, което показва „флуидизация“ ефект на белтъчните молекули върху РОРС филмите и повишената еластичност на смесените монослоеве.

В следващите изследвания, за да избегнем екструдирването на белтъчните молекули в субфазата, ние определихме хистерезисът на двукомпонентните монослоеве чрез компресия до 20 mN/m (под π_{tr}) и последващо разширение. Не установихме статистически значим ефект от Ca^{2+} , Glu и GABA върху хистерезиса на смесените монослоеве (**Фигура 24С**). Кривите на компресия и декомпресия на РОРС монослоя съвпадаха перфектно, следователно при тях липсва хистерезис, поради което значителният хистерезис на смесените монослоеве се дължи само на hBest1 молекулите. Формата на хистерезисните бримки на hBest1/РОРС филмите наподобява тази на hBest1 (**Фигура. 21С**). Също така, кривите на декомпресия бяха разположени при по-ниски молекулни площи (за всяко π) и по-ниско повърхностно налягане (за всяко A). Значително по-ниските стойности на повърхностното налягане в края на разширяването предполагат необратима реорганизация и/или преориентация на белтъчните молекули в монослоя по време на компресия, независимо от присъствието или отсъствието на Ca^{2+} , Glu или GABA. Следователно, **РОРС елиминираше ефектите на Ca^{2+} , Glu и GABA наблюдавани при чисти hBest1 монослоеве (Фигури 21С и 24С).**

Продължихме с анализ на поведението на бинарните монослоеве на фазовата границата въздух/течност и за да докажем смесваемостта и идеалния/неидеалния характер на бинарните монослоеве, сравнихме средните молекулни площи A_{π} (измерени при повърхностни налягания 10 и 20 mN/m, под π_{tr}) със съответните молекулни площи A_{add} за идеална смес или пълно фазово разделяне, което и в двата случая следва правилото за адитивност (**Фигура 25А**):

$$A_{add} = X_{hBest1}A_{hBest1} + X_{РОРС}A_{РОРС}$$



Фигура 25. **А)** Експериментална молекулна площ на смесите (●) и съответната молекулна площ A_{add} за идеална смес (○) (стандартните отклонения в някои случаи са толкова ниски, че попадат в рамката на кръговете); **В)** Излишната свободна енергия на смесване ΔG_{exc}^{π} и **С)** общата свободна енергия на смесване ΔG_{mix}^{π} в бинарните монослоеве hBest1/POPC при 10 и 20 mN/m като функция от молната част на hBest1 (X_{hBest1}) (**Andreeva et al., 2018**).

Средните молекулни площи A_{π} , получени от π/A изотермите на смесените монослоеве hBest1/POPC с различно моларно съотношение на двата компонента, съвпадат с изчислените стойности на A_{add} , показващи идеално смесване или пълно разделяне на фазите. Фактът, че ρ_{col} на POPC и на бинарните hBest1/POPC монослоеве (**Фигура 24А**) съвпаднаше, и че A_{π} следваше правилото за адитивност на площите (**Фигура 25А**), означава, че **hBest1 и POPC са несмесваеми на повърхността на водната субфаза**. Анализът на π/A изотермите чрез подхода на Гудрич (Goodrich), представя ΔG_{exc}^{π} и ΔG_{mix}^{π} на бинарните монослоеве hBest1/POPC като функция от молната част на hBest1 в смесите (X_{hBest1}) при повърхностни налягания 10 и 20 mN/m (**Фигура 25В, С**). Изглежда така, че повърхностното поведение на hBest1 и POPC в бинарните монослоеве зависи драстично от тяхното моларно съотношение (съответстващо на площта, която те заемат върху повърхността). И двете зависимости $\Delta G_{exc}^{\pi}/X_{hBest1}$ и $\Delta G_{mix}^{\pi}/X_{hBest1}$ показаха положителни свободни енергии за hBest1/POPC монослоеве с моларни съотношения 1:45 и 1:1 и отрицателни с моларно съотношение 1:15. Стабилен монослой се образува ако ΔG_{exc}^{π} е отрицателна, т.е. при моларно съотношение 1:15. Ако ΔG_{exc}^{π} е положителна, филмът е фазово разделен, т.е. всички филми при $X_{hBest1} > 0,1$ (**Фигура 25А, В**). Отрицателната стойност на ΔG_{exc}^{π} показва взаимното привличане на молекулите в бинарните монослоеве и предполага, че влиянието на молекулните взаимодействия върху стабилността на монослоя е по-значимо за двукомпонентния монослой с моларна фракция $X_{hBest1} = 0,067$, в сравнение с монослоеве с друг състав. Освен това, отрицателното отклонение на ΔG_{exc}^{π} се засилваше с увеличаването на повърхностното налягане (от $-3,8$ kJ/mol при 10 mN/m до $-5,2$ kJ/mol при 20 mN/m), което означава, че междумолекулните взаимодействия са по-силни, когато бинарният монослой съществува в по-кондензирано състояние. Всички други hBest1/POPC монослоеве показаха положителни стойности на ΔG_{mix}^{π} , което предполага възможност за разделяне на фазите (несмесваемост).

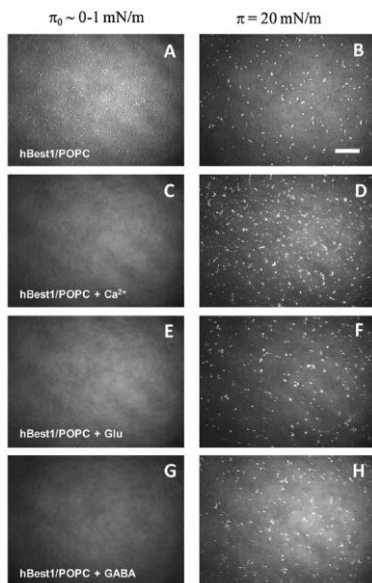
Местоположението на максимума на $\Delta G_{\text{mix}}^{\pi}$ (на графиката) при $X_{\text{hBest1}} = 0,5$ показва, че еквимоларното смесване е термодинамично най-неизгодно.

2.4.1. Влияние на Ca^{2+} , Glu и GABA върху морфологията на hBest1/POPC Лангмюирови монослое

Проведохме и изследване на повърхностната морфология на Лангмюирови монослое, но съдържащи не само белтък, а и липид. Първоначалните експерименти бяха проведени с POPC - монослоеве (**Фигура 22**).

При hBest1/POPC монослоеве, след релаксация на филма, се наблюдаваха множество празнини и малки овални домени с по-висока плътност, равномерно разпределени в околния хомогенен филм (**Фигура 26А**).

Обратно, hBest1/POPC монослоеве, които съдържаха Ca^{2+} , Glu или GABA, бяха напълно хомогенни (**Фигура 26С, Е, G**). Хомогенни сиви зони, които съдържаха равномерно разпределени ярки домени с различен размер, но с еднаква яркост, се наблюдаваха при компресията на всички смесени филми при 20 mN/m (**Фигура 26, дясна колона**).



Фигура 26. ВAM изображения на hBest1/POPC (1/45) филми върху водни субстрати, съдържащи 150 mM NaCl (**A, B**) при добавяне на 0,5 μM Ca^{2+} (**C, D**), 2 mM Glu (**E, F**) и 100 μM GABA (**G, H**), направени 30 минути след разстилане на некомпресирани монослоеве (лява колона) и при 20 mN/m (дясна колона). Бар = 100 μm (**Andreeva et al., 2018**).

Тъй като яркостта зависи от плътността на монослоя, тези агрегати са изградени най-вероятно от плътно опаковани POPC молекули. Най-голям брой такива домени се наблюдаваха в присъствието на Ca^{2+} . Както се вижда на **Фигура 22**, компресията не променяше морфологията на еднокомпонентните hBest1 филми, но морфологията на POPC филмите в присъствието на Ca^{2+} , Glu и GABA беше значително повлияна, което доказва преобладаващия липиден състав на домовете и фазовото разделяне на белтъчните и липидните молекули в hBest1/POPC монослоеве при по-високо повърхностно налягане.

2.4.2. Влияние на Ca^{2+} , Glu и GABA върху топологията на hBest1 в hBest1/POPC Лангмюир-Блоджетови филми

Чрез AFM бяха визуализирани hBest1/POPC филмите. Установихме, че в липидно обкръжение молекулата на hBest1 увеличава своята височина и латерални размери и променя своята компактна овална форма (**Фигура 23E–H, Таблица 2**). Формата на белтъка става по-неправилна – около централното овално белтъчно тяло се забелязваха една или две по-ниски структури. Наблюдаваните промени може да се дължат на белтъчната конформационна динамика и/или димеризация. Тези резултати повдигнаха въпроса за наличието на гранични POPC молекули (ануларни липиди), които да покриват хидрофобната повърхност на hBest1, да променят формата, размера и хидрофилността на белтъка, подобно на цитохром С оксидазата (55 ануларни липида) и родопсина (24 ануларни липида).

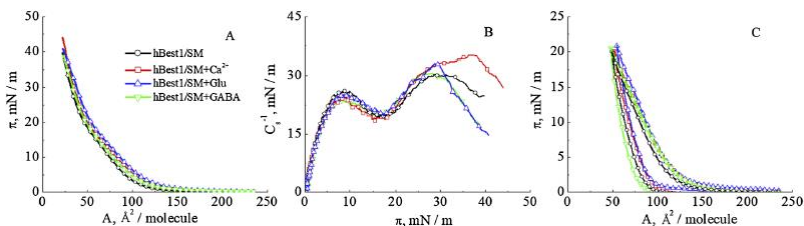
Бихме могли да обобщим, че Ca^{2+} , Glu и GABA повлияват свойствата на hBest1 в монослоеве, като променят повърхностната активност, размер, топология, ориентация и организация на белтъчните молекули на границата въздух/вода без значителни ефекти върху π/A изотермите и хистерезисите на бинарните hBest1/POPC монослоеве. Ефектите на Ca^{2+} , Glu и GABA върху повърхностната динамика на hBest1 в бинарните монослоеве бяха неутрализирани от POPC, затова съответните промени в морфологията, топологията и ориентацията на белтъците можеха да се наблюдават и детектират чрез BAM и AFM. Бинарните филми от hBest1 и POPC са несмесваеми при $X_{\text{hBest1}} > 0.1$, което показва, че липид-липидните и белтък-белтъчните взаимодействия са по-силни от липид-белтъчните взаимодействия при условията на тяхното съвместно съществуване в равнината на монослоя. Това предполага, че увеличаването на областта (повърхността), заета от белтъчни молекули може да окаже влияние върху възможността за белтъчна олигомеризация, правилното структуриране и биологична функция на клетъчните мембрани.

Тези ефекти на Ca^{2+} , Glu, GABA и POPC върху естествената белтъчна структура, конформация, повърхностна организация и поведение на hBest1, оказват влияние не само на неговите канални функции през биологичните мембрани, но и върху взаимодействията му с други мембранни канали, като по този начин допринасят за поддържането на клетъчната хомеостаза и правилното клетъчно функциониране.

2.5. Влияние на Ca^{2+} , Glu и GABA върху π/A изотермите и хистерезисите на hBest1/SM Лангмюирови монослое

Изследванията на повърхностните свойства на hBest1 продължиха със създаването на бинарни Лангмюирови монослое съдържащи SM. Отново анализирахме повърхностната динамика на монослое от hBest1 и на монослое от SM, съдържащи Ca^{2+} , Glu и GABA при физиологични условия. Ефектите на Ca^{2+} , Glu и GABA върху монослоеве от SM при 35 °C са по-сложни.

Както при hBest1/POPC, така и при hBest1/SM при изграждане на Лангмюировите монослое използвахме съотношение на площите протеин:липид 1:3. Установихме, че при 20 mN/m, монослойната площ на една молекула hBest1 е 28,5 пъти по-висока от тази на една молекула SM, което определи моларно съотношение от 1:86 на двата компонента в смесените hBest1/SM монослое. π/A изотермите на бинарните hBest1/SM филми върху субфаза от NaCl, както и в присъствието на Ca^{2+} , Glu и GABA, показаха идентичен ход (**Фигура 27А**), наподобяващ изотермите на SM монослое.



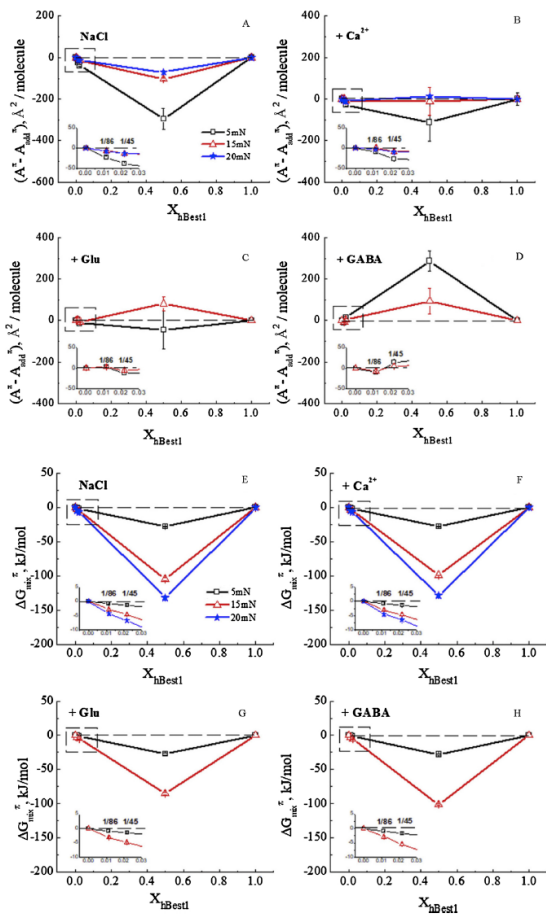
Фигура 27. А) Изотерми повърхностно налягане/средна молекулна площ (π/A); В) Модули на еластичност C_s^{-1} като функция на повърхностното налягане (π) и С) π/A хистерезисни криви на hBest1/SM монослое на границата въздух/буфер. Подфазите съдържат 150 mM NaCl с добавяне на Ca^{2+} , Glu и GABA при 35±2°C (Mladenov et al., 2020).

Ясно се разграничават два района с различен наклон на π/A кривите като преходът между тях се намираше при $\pi_{tr} \sim 20$ mN/m. Отново точната стойност на π_{tr} можеше да бъде определена от кривите на модула на еластичност спрямо повърхностното налягане (C_s^{-1}/π). Два добре дефинирани максимума на модулите на еластичност, разделени от минимум при 17 mN/m, се наблюдават на **фигура 27В**. Модулите на еластичност при двата максимума са в диапазона на LE фазата ($C_s^{-1} = 10 - 50$ mN/m), което означава, че двукомпонентните монослое hBest1/SM не претърпяват фазов преход. Стойността на π_{tr} не се повлияваше от добавянето на Ca^{2+} , Glu и GABA. Максималните модули на еластичност на SM монослоеве бяха в диапазона 50±3 mN/m в зависимост от състава на субфазата, но добавянето на hBest1 намаляваше модула на еластичност на SM монослоеве, като по този начин се предизвиква „флуидизация“ на SM филмите и се възпрепятстваше фазовия преход между LE фазата и междинна (M) фаза, съставляваща смес между течно-разтегната и кондензирана фаза (**Фигура 27В**). Установихме, че π/A циклите на компресия-декомпресия на hBest1/SM

монослоеве (Фигура 27С) показват същата тенденция, както тези на hBest1. Кривите на декомпресия бяха по-стръмни и разположени при по-ниски молекулни площи от тези на компресия, имаха значителен хистерезис, достигаш 40 % от средната молекулна площ.

Причината за този хистерезис най-вероятно е необратимата екструзия на белтъчните молекули във водната фаза по време на компресията на филмите. Стойностите на хистерезиса на монослоеве hBest1/SM нарастват в обратен ред на тези, наблюдавани за монослоеве hBest1 - $\Delta A^{GABA} > \Delta A^{Glu} > \Delta A^{NaCl} > \Delta A^{Ca}$, поради по-голямата моларна част на SM в изследваните бинарни филми. По-стръмното нарастване на повърхностното налягане на hBest1/SM монослоеве над π_{tr} (Фигура 27С) наподобява хода на SM изотермите. При екстраполирането на тези стръмни участъци при високи налягания, както на SM, така и на hBest1/SM изотермите към абсцисата показва еднакви стойности на площта за молекула при нулева компресия, $A_0 = 60 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$, което показва, че само SM молекули присъстват на повърхността на филма след π_{tr} .

Както при hBest1/POPC, така и при hBest1/SM монослоеве, за изследване на смесваемостта на монослоеве, ние проследихме отклонението на експерименталните средни молекулни площи A^π от правилото за адитивност (получено от изотермите π/A на Фигура 27А при повърхностни налягания от 5, 10 и 20 mN/m, всичките под π_{tr}), (Фигура 28). Поради това, че изотермите на hBest1^{Glu} и hBest1^{GABA} не достигат 20 mN/m, стойностите на A^π при това повърхностно налягане не бяха представени на фигура 28.



Фигура 28. Графики, описващи отклонението на експерименталната молекулна площ A^π от адитивното правило и общата свободна енергия на смесване ($\Delta G_{\text{mix}}^\pi$) спрямо състава (молни части) за двукомпонентните hBest1/SM монослоеве върху подфаза от NaCl (A, E), с добавяне на Ca^{2+} (B, F), Glu (C, G) или GABA (D, H), при повърхостно налягане от 5 mN/m, 15 mN/m и/или 20 mN/m. Въмкнатите графики представляват увеличение на рамкираните области. Данните са представени като средна стойност \pm SE (Mladenov et al., 2020).

Изчислените теоретични молекулни площи A_{add}^π съответстват или на идеално смесване, или на пълно фазово разделяне на hBest1 и SM в монослоеве. Средните площи A^π на hBest1/SM монослоеве върху субфаза съдържаща NaCl, показаха отрицателно отклонение от правилото за адитивност, независимо от моларното съотношение на двата компонента (1:86, 1:45 и 1:1), (Фигура 28A). Тези резултати показаха, че междумолекулните взаимодействия между hBest1 и

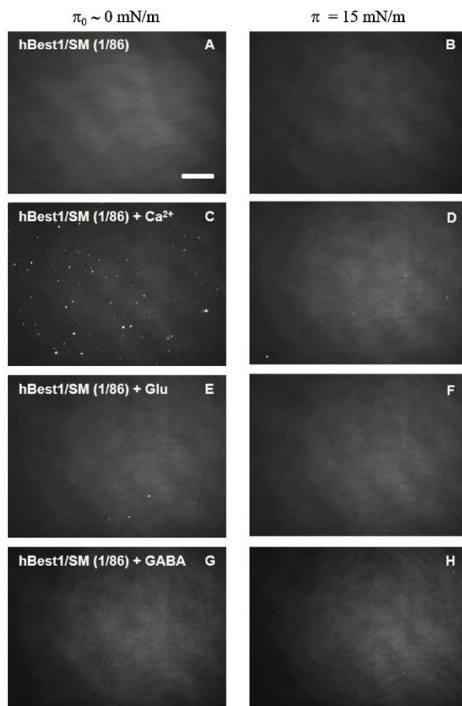
SM (в hBest1/SM монослое) са по-силни от взаимодействията на молекулите hBest1-hBest1 или SM-SM и при моларно съотношение 1:1 неидеалното молекулно смесване е най-благоприятно и термодинамично изгодно (**Фигура 28А**). С увеличаването на повърхностното налягане стойностите на A^π се доближават до A_{add}^π , което предполага подобряване на смесването или фазовото разделяне. Средните молекулни площи A^π на hBest1/SM монослое върху Ca^{2+} - съдържащата подфаза нарастваха линейно с увеличаване на моларната фракция на hBest1, като по този начин следваха адитивните линии при 15 и 20 mN/m (**Фигура 28В**). В този случай междумолекулните взаимодействия hBest1-SM са изравнени с тези от типа hBest1-hBest1 и SM-SM, което означава настъпване на идеално смесване или пълно фазово разделяне. В присъствието на Glu, междумолекулните hBest1-SM взаимодействия доминираха над hBest1-hBest1 и SM-SM при ниско повърхностно налягане, но отслабяха и се превършиха в отблъскване при 15 mN/m, както е показано чрез положителното отклонение на молекулните площи от адитивната линия (**Фигура 28С**). Добавянето на GABA също показва тенденцията да разделя белтъчните и липидните молекули (**Фигура 28D**), но този ефект намаляваше с увеличаването на повърхностното налягане (Glu и GABA взаимодействат с полярната глава на SM, което води или до отблъскване между молекулите на hBest1 и SM, или до включване на Glu и GABA в бинарните монослое).

Количественият анализ и разграничаването между идеалното смесване и пълното фазово разделяне на hBest1 и SM в бинарните монослое беше проведено чрез прилагане отново на подхода на Гудрич за изчисляване на излишната (excess) и тоталната (общата) свободна енергия на смесване ΔG_{exc}^π и ΔG_{mix}^π . Тъй като енергията на идеалното смесване е незначителна в сравнение с излишната свободна енергия на смесване, т.е. стойностите на ΔG_{exc}^π и ΔG_{mix}^π са приблизително еднакви, затова само ΔG_{mix}^π беше изобразена на **фигура 28Е-Н**. Изотермите на hBest1^{Glu} и hBest1^{GABA} не достигаха 20 mN/m, затова ΔG_{exc}^π и ΔG_{mix}^π не можеха да бъдат изчислени (при това π) и не бяха нанесени на **фигура 28Г, Н**. Установихме, че общата свободна енергия на смесване не се повлияваше от добавянето на Ca^{2+} , Glu и GABA. Отрицателните стойности на ΔG_{exc}^π и ΔG_{mix}^π предполагаха, че двукомпонентните монослое hBest1/SM са по-стабилни от единоконпонентните монослое изградени от hBest1 и SM, и че процесът на смесване е спонтанен. При по-нататъшното компресиране на монослое се увеличиха отрицателните стойности на ΔG_{exc}^π и ΔG_{mix}^π , което показваше, че смесването и стабилността са подобрени, т.е. междумолекулните взаимодействия са по-силни, когато бинарните монослое съществуват в по-кондензирано състояние, и че еквимоларното смесване е термодинамично изгодно. Обратно, в проучванията с бинарните монослое hBest1/ПОРС показахме, че фазовото разделяне/смесване зависи от моларното съотношение на компонентите. Смесваемостта между hBest1 и SM най-вероятно включва взаимодействия с amidни и хидроксилни групи на SM, действащи като донори и акцептори на водородни връзки, докато фосфатидилхолинът осигурява само водородни акцептори (естерни карбонилни групи) за белтък-липидните взаимодействия. В

заклучение, можем да твърдим, че смесваемостта на hBest1 и SM в монослоеве е фундаментална физикохимична характеристика и е предпоставка за силни белтък-липидни взаимодействия.

2.5.1. Влияние на Ca^{2+} , Glu и GABA върху морфологията на hBest1/SM Лангмюрови монослоеве

Изследванията върху морфологията на hBest1/SM монослоеве бяха проведени паралелно с изследванията върху монокомпонентните монослоеве от hBest1 и от SM. ВAM изображенията на бинарните монослоеве hBest1/SM (1/86) показаха компактни хомогенни структури на филмите при 0 mN/m (преди компресия) и при 15 mN/m (Фигура 29A, B).



Фигура 29. ВAM изображения на некомпресирани (лява колона) и компресирани (дясна колона) hBest1/SM (1/86) монослоеве върху течна NaCl подфаза (A, B), в присъствие на Ca^{2+} (C, D), Glu (E, F) и GABA (G, H). Бар = 100 μm (Mladenov et al., 2020).

Не се наблюдаваше фазово разделяне, образуване на домени или фазов преход. Добавянето на GABA не оказваше влияние върху морфологията на монослоеве (Фигура 29G, H). Установихме, че добавянето на Ca^{2+} провокира частично фазово разделяне на hBest1 и SM, като след уравнивяване на монослоеве се появяват малки, кръгли, светли домени с микрометрични

размери (**Фигура 29С**). С увеличаване на повърхностното налягане, по време на компресията, броят и размерът на светлите домени намаляваше и при 15 mN/m те напълно изчезваха (**Фигура 29D**). Добавянето на Glu водеше до разделяне на hBest1 и SM в много по-малка степен, в сравнение Ca^{2+} - няколко, по-малко ярки домена се виждаха при $\pi \sim 0$ mN/m (**Фигура 29E**) и изчезваха при компресия до 15 mN/m (**Фигура 29F**). Тези наблюдения са в съответствие с резултатите от термодинамичния анализ за смесваемостта, който показва, че както смесването, така и междумолекулните взаимодействия в бинарните монослоеове се засилват при увеличаване на повърхностното налягане. Установихме, че за разлика от hBest1/SM монослоеве, то Ca^{2+} индуцираше по-силни белтък-белтъчни взаимодействия, промени в конформацията на белтъка и в макроорганизацията при hBest1/POPC монослоеве.

Описаните в глава 2.5. изследванията бяха фокусирани върху взаимодействията между hBest1 и SM и резултатите ясно демонстрираха, че в бинарните монослоеве hBest1 и SM се смесват спонтанно, което е предпоставка, определяща афинитета между hBest1 и SM в биологичните мембрани. Тези резултати кореспондираха добре с резултатите, получени за асоциацията на hBest1 с липидните микродомени в плазмените мембрани на MDCK II – hBest1 клетки и определиха следващите изследвания с добавяне на холестерол в моделните мембрани.

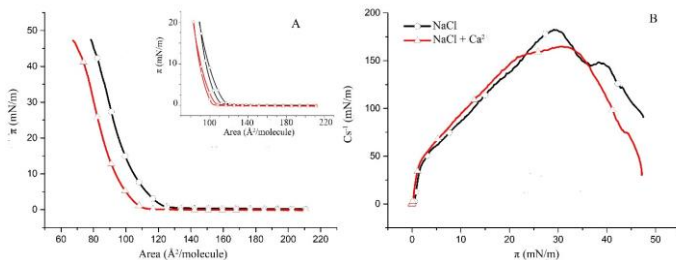
2.6. Физикохимични свойства на дву- и три- компонентни Лангмюирови монослоеве, съдържащи холестерол

Течно-подредените (L_o) фракции в клетъчната мембрана са обогатени със сфинголипиди и холестерол, и съществуват в значително по-кондензирано състояние в сравнение с течно-неподредените (L_d) фракции. Всъщност, едно от основните свойства на холестерола е неговия кондензиращ ефект, който повлиява структурата и функциите на много белтъци в биологичните мембрани, включително и на самите мембрани. Установихме, че холестеролът предизвиква кондензиращ ефект при монослоеве, съдържащи hBest1, hBest1+SM и hBest1+POPC, както и потвърдихме наличието на такъв ефект при SM и POPC монослоеве при условията на експеримента. Също така показахме, че Ca^{2+} - йони играят ключова роля за осъществяването на кондензиращия потенциал на холестерола в монослоеве. Затова продължихме изследванията с охарактеризиране на физикохимичните свойства и повърхностната динамика на Лангмюирови монослоеве съдържащи холестерол. В тези изследвания използвахме подход „отдолу - нагоре“ т. е. първо изследвахме по-малко сложните бинарни подсистеми на POPC/Chol, SM/Chol и hBest1/Chol като основа за по-сложните троични системи hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol.

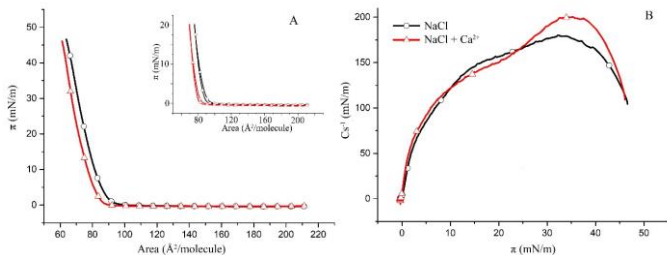
2.6.1. Физикохимични свойства на двукомпонентни монослоеве съдържащи холестерол

(π/A) изотермите на бинарните монослоеве POPC/Chol, SM/Chol и hBest1/Chol (представени на **Фигури 30, 31 и 32**) показаха постепенното

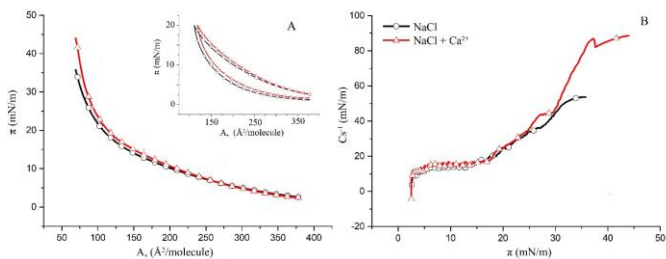
увеличаване на повърхностното налягане и молекулното опаковане, придружаващо намаляването на средната молекулна площ по време на компресия, но без индикации за фазови преходи (като плата или извивки).



Фигура 30. **А)** Изотерми повърхностно налягане/средна молекулна площ на POPC/Chol (1:1) монослоеве върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl с 0,5 μ M CaCl₂ (червен) при 35±2°C (вмъкната графика: π/A хистерезисни криви на компресия-декомпресия); **В)** Модули на еластичност C_s^{-1} като функция на повърхностното налягане (π) на бинарните POPC/Chol (1:1) монослоеве върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl с 0,5 μ M CaCl₂ (червен) при 35±2°C (Videv et al., 2022).



Фигура 31. **А)** Изотерми повърхностно налягане/средна молекулна площ на SM/Chol (1:1) монослоеве върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl с 0,5 μ M CaCl₂ (червен) при 35±2°C (вмъкната графика: π/A хистерезисни криви на компресия-декомпресия); **В)** Модули на повърхностна еластичност C_s^{-1} като функция на повърхностното налягане (π) на бинарните SM/Chol (1:1) монослоеве върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl с 0,5 μ M CaCl₂ (червен) при 35±2°C (Videv et al., 2022).



Фигура 32. А) Изотерми повърхностно налягане/средна молекулна площ на hBest1/Chol (1:58,5) монослое върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl с 0,5 μM CaCl_2 (червен) при $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (вмъкната графика: π/A хистерезисни криви на компресия-декомпресия); **В)** Модули на еластичност C_s^{-1} като функция на повърхностното налягане (π) на бинарните hBest1/Chol (1:58,5) монослое върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl с 0,5 μM CaCl_2 (червен) при $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (Vidov et al., 2022).

Трите изотерми обаче бяха различни по форма и ход. Установихме, че π/A изотермите на компресия при монослоеве POPC/Chol и SM/Chol с добавянето на Ca^{2+} са изместени към по-ниски молекулни площи при дадено π , в сравнение с изотермите без Ca^{2+} . Формата и наклонът на изотермите при тези монослое не се променя, което показва, че присъствието на Ca^{2+} не повлиява нито фазовото състояние, нито молекулната им организация. Други интересни характеристики, които наблюдавахме в π/A изотермите, са повърхностното налягане на колапс (π_{col}) и площта на колапс за молекула (A_{col}). Докато π_{col} не се повлияваше от добавянето на Ca^{2+} , то A_{col} (мярка за кондензиращия ефект на Ca^{2+}) намаляваше с $10 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$ в POPC/Chol монослоеве (Фигура 30А) и само с $4 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$ в монослоеве SM/Chol. Кондензиращият ефект на Ca^{2+} също се отразяваше в намаляването на хистерезиса на POPC/Chol (Фигура 30А, вмъкната графика) и SM/Chol (Фигура 31А, вмъкната графика) монослоеве, като отново този ефект беше по-силен в първата моделна система. Хистерезисът на монослоеве е резултат от хидрофилно-липофилния баланс, получен при взаимодействието между липидните молекули, молекулната кохезия и взаимодействието между полярната глава и субфазата, които определят молекулното опаковане и вискоеластичните свойства на монослоеве по време на компресия и декомпресия. По същество, добавянето и свързването на Ca^{2+} повлиява върху всеки един от тези параметри и балансът между тях при уплътняване на монослоя променя обратимостта на молекулните реорганизации, възникващи по време на компресията и декомпресията на монослоеве. Чрез комбинация от експериментални (π/A изотерми) и теоретични (симулации на молекулната динамика) изследвания ние показахме, че добавянето на Ca^{2+} не променя формата на π/A изотермите на Chol, но ги измества към значително по-ниска средна молекулна площ.

В нашите изследвания не установихме забележим ефект на Ca^{2+} върху POPC монослоеве при концентрация на Ca^{2+} от 0,5 μM , което означава, че

кондензиращият ефект на Ca^{2+} върху бинарните POPC/Chol монослоеве произхожда главно от ефекта върху молекулите Chol.

И двата максимума на модулите на еластичност C_s^{-1} в POPC/Chol монослоеве (без и с Ca^{2+} в подфазата), (**Фигура 30B**) попадаха в границите (от 100 до 250 mN/m), характерни за течно-кондензирана фаза. C_s^{-1} практически не се повлияваше от добавянето на Ca^{2+} като максималните стойности на C_s^{-1} намаляваха само с 15 mN/m и се изместваха към малко по-високо повърхностно налягане.

Максималните модули на еластичност на монослоеве SM/Chol, представени на **фигура 31B**, показаха, че монослоеве са в една и съща течно-кондензирана (LC) фаза. Максималният C_s^{-1} в този случай се увеличаваше с около 20 mN/m и също се изместваха към малко по-високо повърхностно налягане. Преминването към по-високо π предполага лека стабилизация, „насърчена“ от Ca^{2+} в тези бинарни монослоеве. Характерна особеност на монослоеве от SM е фазовия преход LE-LC, който се проявява чрез широко плато (при повърхностно налягане от 6 до 15 mN/m) на графиката C_s^{-1}/π . Подобно плато отсъстваше в SM/Chol монослоеве, което предполага молекулно смесване на двата липида. Максималният модул на еластичност на SM монослоеве при 35°C беше около 50 mN/m. Добавянето на Chol в моларно съотношение 1:1 причиняваше съответно 3,5 и 4 пъти увеличение на тази стойност, като по този начин променяше фазовото състояние от LE към LC.

При бинарните монослоеве hBest1/Chol в π/A изотермите (моларно съотношение 1:58,5, съответстващо на съотношение на повърхностната площ 1:3) бяха разграничени две различни области (**Фигура 32**). При ниски повърхностни налягания до около 20 mN/m, изотермата наподобяваше тази на чистия hBest1, докато при по-високи повърхностни налягания изглеждаше подобна на изотермата на Chol. И двете изотерми показаха идентични форми и начално повърхностно налягане от $\pi_0 = 2,6$ mN/m, които съвпадаха една с друга до $\pi \sim 13$ mN/m. Над 13 mN/m, hBest1/Chol изотермите с добавен Ca^{2+} се изместваха към малко по-високи молекулни площи, за разлика от монослоеве POPC/Chol и SM/Chol, които се изместваха към по-ниски области.

Холестеролните монослоеве върху различни водни и буферни подфазы и температурни условия са интензивно изследвани от различни научни колективи. Ние установихме, че при добавяне на hBest1, максималният модул на еластичност на Chol монослоя ($C_s^{-1}\text{max}$), който се достигаше при π 35 mN/m, е 53 mN/m, (**Фигура 32B**), докато при монослой само от холестеролни молекули е над 300 mN/m, което показва, че монослоеве стават по-неподредени. Въпреки това, добавянето на Ca^{2+} подобряваше подредеността на молекулите в hBest1/Chol монослоя, съдейки по увеличените стойности на C_s^{-1} (max) ~ 90 mN/m. Обратно, максималният C_s^{-1} на hBest1/Chol монослоеве без и с Ca^{2+} беше съответно четири и осем пъти по-висок в сравнение с чистите hBest1 филми, което предполага силно намаляване на еластичността и флуидитета на белтъчния филм, което е свързано с кондензиращата роля на Chol и Chol+ Ca^{2+} . π/A циклите на компресия-декомпресия на монослоеве hBest1/Chol (**Фигура 32A, вмъкната**

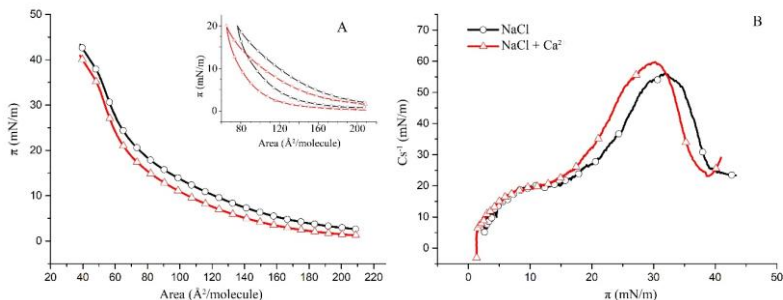
графика) потвърди, че добавянето на hBest1 намалява подредеността на молекулите и увеличава течливостта на Chol монослой. Монослойът от Chol показва почти нулев хистерезис, но при добавяне на hBest1, хистерезисът става значителен и подобен на този на монослоеве hBest1 и hBest1/ПОРС. Формата на циклите на компресия-декомпресия, както и големината на хистерезиса не се повлияха от присъствието на Ca^{2+} .

2.6.2. Физикохимични свойства на трикомпонентни монослоеве съдържащи hBest1 и холестерол

Тези проучвания са ключови в изследванията на двумерната организация на монослоеве съдържащи hBest1 и холестерол, защото чрез монослоеве hBest1/ПОРС/Chol и hBest1/SM/Chol симулирахме физикохимичните характеристики на по-неподредените и по-подредените микродомени в биологичните мембрани.

При изграждането на бинарните филми hBest1/ПОРС и hBest1/SM съотношението на площта hBest1:липид беше 1:3 (площта на монослой, заета от белтъците, към площта заета от липидите). За изследване на термодинамичното поведение на трикомпонентните системи hBest1/ПОРС/Chol и hBest1/SM/Chol в биологично значими условия, използвахме същото съотношение в площите 1:3, което постигнахме при моларни съотношения съответно 1:45:45 и 1:86:86, чрез поддържане на еквимоларно съотношение (1:1) между двата липида.

Установихме, че след добавянето на hBest1 белтъчни молекули напълно се променя π/A изотермата на бинарния липиден ПОРС/Chol монослой. Всъщност, формата и прилича повече на монослой hBest1/Chol. π/A изотермите на монослоеве hBest1/ПОРС/Chol показаха идентични форми, като "разтегнати" синусоидални криви в отсъствието и присъствието на Ca^{2+} (Фигура 33А).

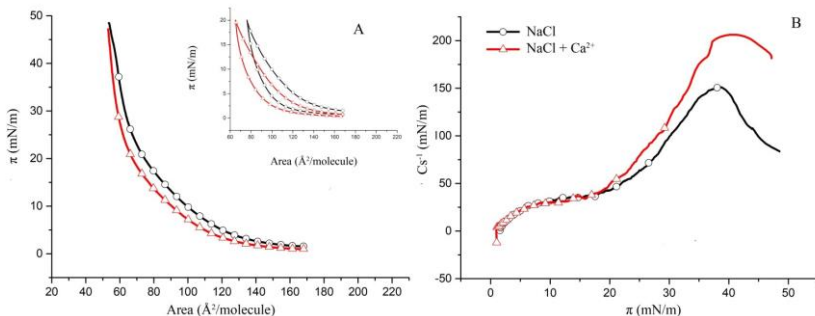


Фигура 33. А) Изотерми повърхностно налягане/средна молекулна площ на hBest1/ПОРС/Chol (1:45:45) монослоеве върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl с 0,5 μM CaCl_2 (червен) при $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (вмъкната графика: π/A хистерезисни криви на компресия-декомпресия); В) Модули на еластичност C_s^{-1} като функция на повърхностното налягане (π) на hBest1/ПОРС/Chol монослоеве върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl с 0,5 μM CaCl_2 (червен) при $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (Videv et al., 2022).

При добавянето на Ca^{2+} установихме намаляване на π_0 от 2,6 mN/m до 1,3 mN/m и цялата изотерма се изместваше към по-ниски повърхностни налягания, което демонстрира кондензиращия ефект на Ca^{2+} върху молекулната организация. Промяна в хода на изотермата се наблюдаваше при около 15 mN/m (π_{tr}).

Точните стойности на π_{tr} бяха определени от кривите C_s^{-1}/π (Фигура 33В). Кривите показаха постепенно увеличаване на модула на еластичност при ниски повърхностни налягания под 13 mN/m (π_{tr}), което беше последвано от много по-стръмно увеличение на C_s^{-1} при повърхностни налягания от 13 mN/m до 32 mN/m (за подфазата без Ca^{2+}) или 30 mN/m (за подфазата с Ca^{2+}), където бяха достигнати максималните стойности на C_s^{-1} . C_s^{-1} (max) за монослоя с подфаза от NaCl беше 56 mN/m, докато за монослоя с подфаза от NaCl, допълнена с CaCl_2 беше 60 mN/m, стойности, които са малко над горната граница от 50 mN/m за LE фазата. Тези стойности бяха по-високи от C_s^{-1} (max) на монослоеве hBest1 (10,7 mN/m) и значително по-ниски от C_s^{-1} (max) на POPC (~110 mN/m) и на Chol (839 mN/m), което е индикация за смесване на трите компонента на монослоя. **Запазването на LE фазовото състояние на hBest1/POPC/Chol монослоя, както и намалената стойност на π_{col} бяха индикация за много добро смесване на компонентите на монослоя.**

Изотермите на монослоеве hBest1/SM/Chol бяха по-стръмни от тези на hBest1/POPC/Chol, следователно те са в по-кондензирано фазово състояние. Това също се отразява на двумерната еластичност на филмите, изразена чрез модула на еластичност (Фигура 34А и В).



Фигура 34. А) Изотерми повърхностно налягане/средна молекулна площ на hBest1/SM/Chol (1:86:86) монослоеве върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl с 0,5 μM CaCl_2 (червен) при $35\pm 2^\circ\text{C}$ (вмъкната графика: π/A хистерезисни криви на компресия-декомпресия); В) Модули на еластичност C_s^{-1} като функция на повърхностното налягане (π) на hBest1/SM/Chol монослоеве върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl с 0,5 μM CaCl_2 (червен) при $35\pm 2^\circ\text{C}$ (Videv et al., 2022).

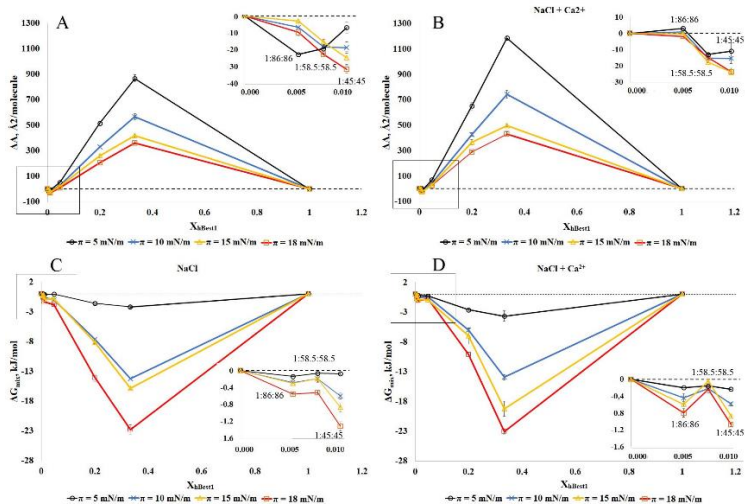
C_s^{-1} (max) на hBest1/SM/Chol монослоя в отсъствие на Ca^{2+} е 152 mN/m, а в присъствие на Ca^{2+} е 206 mN/m, което беше съответно 2,7 и 3,5 пъти по-високо от стойностите на hBest1/POPC/Chol монослоеве и съответстваха на LC

фазовото състояние. Тези резултати показват, че Ca^{2+} упражняват значителен кондензиращ и стабилизиращ ефект върху hBest1/SM/Chol монослоеве, изразяващ се в намаляване на еластичността на филмите. Известно е, че холестеролът образува силно кондензирани монослоеве в състояние на твърда (S) фаза, с $\pi_{\text{col}} \sim 45 \text{ mN/m}$. Нито един от монослоеве, които изследвахме не показваше съществуването на S фазово състояние, следователно молекулите на Chol бяха добре смесени с другите компоненти. За сравнение, молекулите в hBest1 монослоеве (без и с Ca^{2+}) се самоорганизират на повърхността в разтеглен монослой на фазовата граница въздух/вода по време на компресия, без да достигат колапс. Монослоят POPC също беше в състояние на LE фаза до колапса при 46 mN/m .

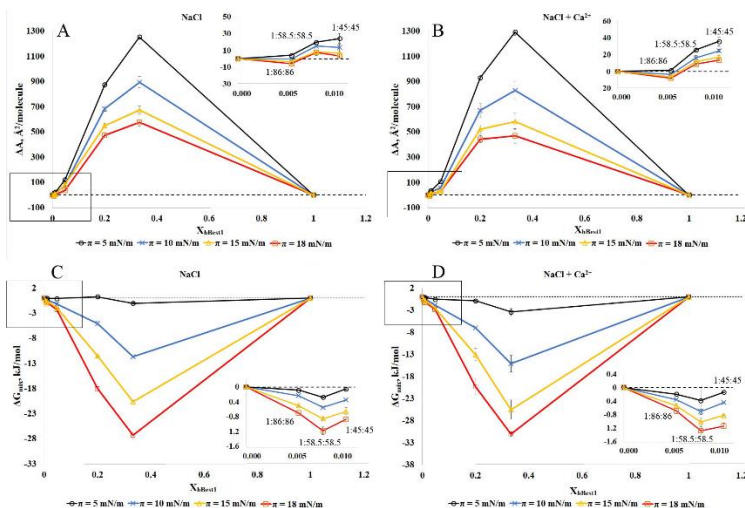
Максималните стойности на C_s^{-1} , определени за hBest1/SM/Chol (1:86:86) монослоеве, са значително по-високи от $C_s^{-1}(\text{max})$ на hBest1 монослоеве ($10,7 \text{ mN/m}$) и по-ниски от $C_s^{-1}(\text{max})$ на монослоеве SM ($\sim 220 \text{ mN/m}$) и Chol (839 mN/m), което е ясна индикация, че трите компонента на тези монослоеве са смесени. SM (16:0), който беше използван в това изследване, претърпяваше LE-LC фазов преход при повърхностно налягане $\pi_{\text{tr}} = 46,8 \text{ mN/m}$, както с NaCl, така и с NaCl + Ca^{2+} в подфазите. Този ефект изчезваше при комбиниране с hBest1 и Chol, което отново **подкрепя твърдението, че компонентите са смесени.**

2.7 Смесваемост и фазово разделяне в hBest1/POPC/Chol and hBest1/SM/Chol монослоеве

За да продължим с термодинамичния анализ на степента на молекулно смесване между hBest1 и липидите POPC, SM и Chol в трикомпонентните монослоеве, построихме изотерми с различни моларни съотношения на hBest1/липиди, както следва: 1:86:86 ($X_{\text{hBest1}} = 0,006$); 1:58,5:58,5 ($X_{\text{hBest1}} = 0,0085$); 1:45:45 ($X_{\text{hBest1}} = 0,011$); 1:10:10 ($X_{\text{hBest1}} = 0,048$); 1:2:2 ($X_{\text{hBest1}} = 0,20$); 1:1:1 ($X_{\text{hBest1}} = 0,33$), като запазахме еквимоларното съотношение между двата липида, както е в изотермите, представени в раздел 2.6.2. Въз основа на изотермите бяха изчислени както качествените (ΔA), така и количествените (ΔG_{mix}) параметри на взаимодействията между молекулите на белтъка и липида. На **фигури 35 и 36**, ΔA и ΔG_{mix} са представени като функция от молните части на hBest1 (X_{hBest1}). Отклонението ΔA ($A_{\text{exp}} - A_{\text{add}}$) на средните експериментални молекулни площи A_{exp} (получени от π/A изотермите на hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol монослоеве) от адитивните молекулни площи (A_{add}), изчислени по правилото за адитивност, е параметър, разкриващ междумолекулните взаимодействия между компонентите на монослоя (виж 2.4.). Отклоненията в площта на hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol монослоеве, формирани в отсъствие и присъствие на Ca^{2+} при четири различни π , но под π_{tr} , са представени съответно на **фигура 35А,В и фигура 36А, В.**



Фигура 35. Графики на отклонението на площта от адитивната линия (ΔA) (A, B) и общата свободна енергия на смесване (ΔG_{mix}^{π}) (C, D) спрямо състава на филма (X_{hBest1}) при различни повърхностни налягания (π), от hBest1/POPC/Chol монослой върху подложка от 150 mM NaCl (A, C) и от 150 mM NaCl, допълнен с 0,5 μ M $CaCl_2$ (B, D) при $35 \pm 2^\circ C$ (вмъкнати графики: уголемяване на полето в рамката) (Videv et al., 2022).



Фигура 36. Графики на отклонението на площта от адитивната линия (ΔA) (A, B) и общата свободна енергия на смесване (ΔG_{mix}^{π}) (C, D) спрямо състава на филма (X_{hBest1}) при различни повърхностни налягания (π), от hBest1/SM/Chol монослой върху подложка от 150 mM NaCl (A, C) и от 150 mM NaCl, допълнен с 0,5 μ M $CaCl_2$ (B, D) при $35 \pm 2^\circ C$ (вмъкнати графики: уголемяване на полето в рамката) (Videv et al., 2022).

ΔA на hBest1/POPC/Chol монослоеве (независимо от π и наличието на Ca^{2+}) имаха отрицателни или нулеви стойности при $X_{\text{hBest1}} < 0,02$, които съответстват на биологично значимите условия в клетъчните мембрани, и положителни стойности при $X_{\text{hBest1}} > 0,02$ (**Фигура 35А, В, вмъкнати графики**). Стойностите на ΔA в hBest1/SM/Chol монослоеве бяха положителни, с изключение на тази при $X_{\text{hBest1}} = 0,006$, която „осцилираше“ около нулата (**Фигура 36А, В, вмъкнати графики**). Отрицателните стойности предполагат, че в hBest1/POPC/Chol монослоеве взаимодействията (силите) на привличане между hBest1 и липидните молекули са по-силни от белтък-белтъчните и липид-липидните, като по този начин уплътняват филмите и смесваемостта между фазите на hBest1 и липидите нараства. Положителните стойности на ΔA във филмите възникнаха като резултат от по-силното привличане между подобните hBest1–hBest1 и липид-липид молекули, както и от по-силното отблъскване между hBest1 и липидите, което предполага разделяне на фазите между hBest1 и липидите в монослоеве.

Стойностите на ΔA , които се намираха на адитивната линия, определят сходни сили на взаимодействие между всички молекули, което предполага смесване или пълно фазово разделяне на компонентите на монослоеве. Колкото по-високо беше съдържанието на белтък, толкова по-голямо беше положителното отклонение от идеалното смесване и по-голяма вероятността за фазово разделяне на компонентите. Това отклонение беше най-силно изразено при ниско π . Уплътняването на монослоеве, беше придружавано от увеличаването на π , което значително намаляваше отклонението на експерименталните молекулни площи от адитивните, а това предполагаше по-добро смесване на компонентите. Добавянето на Ca^{2+} увеличаваше ΔA , което показваше по-добро разделяне в сравнение с монослоеве в отсъствие на Ca^{2+} .

За да анализираме π/A изотермите на тези два трикомпонентни монослоя, отново използвахме метода на Гудрич. За изчисляването на общата свободна енергия на смесване $\Delta G_{\text{mix}}^{\pi}$, **приехме монослоеве за двукомпонентни**, в която един от компонентите беше hBest1 и другият беше липидна смес от POPC/Chol и от SM/Chol. Използвахме този подход, защото: 1) методът на Гудрич е изведен за двукомпонентна система и 2) известно е, че еквимоларните монослоеве POPC/Chol и SM/Chol са много стабилни, имат висок афинитет и „благоприятно“ разположение между двата вида липидни молекули, което ни позволи да изследваме ефекта при включването на hBest1 в тези двукомпонентни липидни монослоеве.

Отрицателните $\Delta G_{\text{mix}}^{\pi}$ стойности на hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol монослоеве показаха, че трикомпонентните монослоеве са по-стабилни от еднокомпонентните hBest1 и липидните монослоеве, което означава, че **смесването на hBest1 и липидните молекули е спонтанен и термодинамично изгоден процес**. Смесването се подобряваше с увеличаването на моларната фракция на hBest1 и π , но се повлияваше слабо от добавянето на Ca^{2+} (**Фигури 35С, D и 36С, D**). Вече показахме фазовото разделяне между POPC и hBest1 и спонтанно смесване между SM и hBest1 в бинарните монослоеве hBest1/POPC и

hBest1/SM. Резултатите в раздел 2.7. показаха, че ефектът на холестерола върху смесваемостта/фазовото разделяне в тройните филми е много силен. **Холестеролът подобрява смесването и стабилността в hBest1/POPC/Chol филмите чрез намаляване на фазовото разделяне между hBest1 и POPC, докато в hBest1/SM/Chol филмите, смесваемостта се запазва, поддържа и стабилизира, макар и с увеличаване на стойностите на $\Delta G_{\text{mix}}^{\pi}$.**

Уравновесяването и стабилизирането в смесваемостта/фазовото разделяне между hBest1 и POPC/Chol от една страна, между hBest1 и SM/Chol от друга, оказва пряк ефект върху асоциирането и локализирането на белтъка с липидните рафтове, неговата конформация, повърхностна организация и неговите функции.

2.8. Обобщение на получените резултати от изследванията на hBest1 в модели на биологични мембрани

- Тези изследвания започнаха с оптимизирането и създаването на схема за получаването на пречистен hBest1 от MDCK II - hBest1 клетки. Постигнахме добив на hBest1 от около 2,8%. **Това беше втората най-важна стъпка в проучванията с hBest1**, защото ни даде възможност да получим белтък в чист вид, който да изследваме.

- Определихме, че в състава на вторичната структура на hBest1 участват 51,1% спирални структурни елементи, включващи главни и къси α -спирали (23,9% общо), и 3_{10} -спирали (27,2%). Добавянето на Ca^{2+} предизвиква: **увеличаване** на всички спирални структури до 59,2%, дължащо се основно на нарастване на съдържанието на α -спиралите (с 5,6%); **намаляване** на β -извивки и бримки до 27,2% (в полза на спиралите); **намаляване** на агрегирани и антипаралелни листове от 16,7% до 13,6%.

- Установихме, че при Лангмюировите монослоевете от hBest1, най-малката възможна площ за молекула, A_0 , за hBest1^{Glu} и hBest1^{GABA} е подобна като тази на монослоя от hBest1 ($A_0 = 3700 \text{ \AA}^2/\text{мономер}$) и значително по-малка за hBest1^{Ca²⁺} ($A_0 = 3360 \text{ \AA}^2/\text{мономер}$).

- Определихме, че максималните модули на еластичност на монослоеве от hBest1 ($C_s^{-1}(\text{max}) = 10,7 \text{ mN/m}$ за hBest1 и hBest1^{Ca²⁺} и $C_s^{-1}(\text{max}) = 11,8 \text{ mN/m}$ за hBest1^{Glu} и hBest1^{GABA}) са в долната граница за течно-разтегнати (LE) липидни филми (варираща от 12,5 до 50 mN/m).

- Показахме, че монослоеве от hBest1 (както и с добавени Ca^{2+} , Glu и GABA) имат значителен хистерезис, който намалява с нарастване на π .

- Въз основа на ВAM изображенията показахме, че монослоеве от hBest1, hBest1^{Ca²⁺}, hBest1^{Glu} и hBest1^{GABA} имат различна плътност на опаковане, която кореспондира с резултатите от π/A изотермите.

- Въз основа на AFM изображенията от Лангмюир-Блоджетови филми установихме, че hBest1 молекулите имат овална форма, с латерални размери $100 \times 160 \text{ \AA}$ и височина 75 \AA . Добавянето на Ca^{2+} , Glu и GABA води до промени в конформацията на hBest1, но само Ca^{2+} индуцира белтъчна агрегация (димеризация и тримеризация).

- Установихме, че hBest1 оказва „флуидизиращ“ ефект върху монослоеве от POPC, поради което hBest1/POPC филмите показват повишена еластичност.

- Показахме, че в hBest1/POPC филмите, POPC елиминира ефектите на Ca^{2+} , Glu и GABA, които се наблюдават при hBest1 монослоеве.

- Показахме, че $\Delta G_{\text{exc}}^{\pi}/X_{\text{hBest1}}$ и $\Delta G_{\text{mix}}^{\pi}/X_{\text{hBest1}}$ имат отрицателни стойности за hBest1/POPC монослоеве с моларно съотношение липид:белтък 1:15 и положителни за монослоеве с моларни съотношения 1:45 и 1:1, което означава, че hBest1 и POPC са несмесваеми на повърхността на водната субфаза.

- Чрез AFM визуализирахме hBest1/POPC филмите. Установихме, че hBest1 увеличава своята височина и латерални размери и променя своята компактна овална форма при наличие на Ca^{2+} , Glu и GABA.

- Показахме, че добавянето на hBest1 намалява модула на еластичност на SM монослоеве, като по този начин предизвиква „флуидизация“ на hBest1/SM филмите.

- Установихме, че смесваемостта на hBest1 и SM на повърхността на монослоеве е термодинамично изгоден процес, което е фундаментална физикохимична характеристика и е предпоставка за силни белтък-липидни взаимодействия.

- Установихме, че холестеролът предизвиква кондензиращ ефект при монослоеве, съдържащи hBest1, hBest1+SM и hBest1+POPC.

- Определихме, че hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol филмите независимо от условията на експериментите, показват отрицателни $\Delta G_{\text{mix}}^{\pi}$ стойности, което означава, че смесването на hBest1 и липидните молекули на повърхността на субфазата е спонтанен и термодинамично изгоден процес.

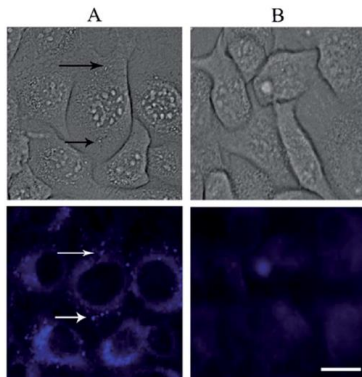
- Установихме, че холестеролът подобрява и стабилизира смесването между компонентите в hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol филмите, независимо от експерименталните условия.

3. hBest1 и нанобиотехнологиите

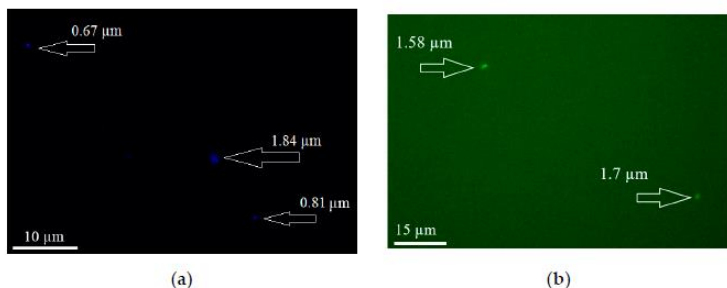
Резултатите от проучванията на поведението на hBest1, получени от изследванията, проведени с клетъчните култури и чрез моделните мембрани, предоставят необходимите фундаментални познания за прилагане на иновативни терапии чрез използване на наноструктури, представляващи сферични нуклеинови киселини, както и бислойни полимер-липидни дискове, липозоми и биконтинуални структури или полимерни наноразмерни частици за интеркалиране на hBest1 в клетъчната мембрана и възстановяване на транспортните ѝ функции.

Тук представяме биологичното охарактеризиране на сферични нуклеинови киселини, изградени от нефосфолипиден нуклеолипид, който представлява оригинална хибридна биомакромолекула, съставена от хидрофобен

остатък, подобен на естествено срещащите се фосфолипиди и ДНК олигонуклеотидна верига (**Фигури 37 и 38**).



Фигура 37. Снимки на А549 клетки направени с бяла светлина (горе) и флуоресценция 30 минути след инкубиране с DPPC/Chol/NucL2 везикули (**панел А**). Везикулите, навлезли в клетките, са обозначени със стрелки. Контролните А549 клетки, които не са третирани с везикулите са показани на **панел В**. Бар = 15 μm (**Dimitrov et al., 2022a**).



Фигура 38. Флуоресцентно маркиране на везикуларни СНК с (a) Лаурдан и (b) FITC (**Dimitrov et al., 2022b**).

В литературата не са открити данни за наноструктури натоварени с hBest1, вероятно поради факта, че до момента липсват данни за друг екип, който да го е изолирал и пречистил. Това е експериментално и научно предизвикателство за нашия научен колектив, тъй като ще предостави ценна информация за структурата и механизма на действие на hBest1 в клетките, както и ще разкрие потенциала на нанобиотехнологиите за приложение в биомедицината.

IV. Изводи

1. Епителните клетки от линията MDCK II са добър модел за изследване на сортирането на hBest1, защото се поляризират само за около пет дни и имат много добре дефинирана апикална и базолатерална мембрана.

2. Клетките от линията MDCK II транскрибират гена *BEST1*, но не транслират белтъка hBest1. След трансфекция в тези клетки, hBest1 се експресира и локализира по базолатералната мембрана, както е при клетките на РПЕ.

3. Нарушенията в състава и структурата на потенциалните базолатерални сортиращи мотиви Y85VTL, Y97ENL и Y227DWI, които са отговорни за клиничните прояви при пациенти с BVMD, могат да предизвикват нарушения свързани с правилното сортиране и локализация на мутантните форми hBest1. Фосфорилирането на hBest1 по Туг 227 повлиява базолатералната локализация на белтъка.

4. При клетките от стабилната клетъчна линия MDCK II - hBest1, растежните характеристики, метаболитната активност, морфологията и поляризацията не се повлияват от стабилната експресия на белтъка.

5. Белтъкът hBest1 в MDCK II - hBest1 клетките повлиява трансепителната резистентност като забавя достигането на максималните стойности. Добавянето на Glu и GABA увеличават стойностите на TER, докато АТФ ги понижават.

6. MDCK II - hBest1 клетките са по-резистентни към ензимното действие на PLA₂, най-вероятно поради повишеното количество на неламеларни липиди в сравнение с ламеларните липиди в мембраните на клетките

7. В плазмените мембрани на MDCK II - hBest1 клетките се наблюдава увеличаване на L_d домените в сравнение с L_d домените при нетрансфектирани MDCK II клетки. hBest1 се локализира и самоорганизира основно в L_d областите (около 60-65 %) на клетъчните мембрани, спрямо 30-35 % в L_o домените (липидните рафтове)

8. Във вторичната структура на hBest1 участват около 51% спирални структурни участъци, но добавянето на Ca²⁺ предизвиква увеличаване на всички спирални структури до 59%.

9. Топологията на молекулите от hBest1 е овална, с латерални размери 100 × 160 Å и височина 75 Å. Ca²⁺, Glu и GABA променят конформацията на hBest1 като Ca²⁺ може да индуцира молекулна агрегация.

10. Най-малката възможна площ за молекула, A₀, за hBest1^{Glu} и hBest1^{GABA} е подобна като тази на монослоя от hBest1 (A₀ = 3700 Å²/мономер) и значително по-малка за hBest1Ca²⁺ (A₀ = 3360 Å²/мономер).

11. Монослоевите от hBest1, hBest1^{Ca²⁺}, hBest1^{Glu} и hBest1^{GABA} имат различна плътност на опаковане и стойностите на C_s⁻¹ (max) са в долната граница за течно-разтегнати (LE) липидни филми.

12. ПОРС премахва ефектите на Ca²⁺, Glu и GABA в hBest1/ПОРС филмите.

13. При физиологични съотношения на площта белтък : липид (1:3), hBest1 и ПОРС са несмесваеми.

14. В hBest1/POPC филмите, молекулите на hBest1 увеличават своята височина и странични размери и променят своята компактна овална форма при добавяне на Ca^{2+} , Glu и GABA.

15. hBest1 предизвиква „флуидизация“ на POPC и SM филмите.

16. Смесваемостта на hBest1 и SM на повърхността на монослоевите е спонтанен и термодинамично изгоден процес независимо от условията на експеримента.

17. Холестеролът предизвиква кондензиращ ефект при монослоевите, изградени от hBest1, hBest1+SM и hBest1+POPC.

18. Смесването на hBest1 молекулите и липидите в hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol монослоеве е също спонтанен и термодинамично изгоден процес като холестеролът подобрява и стабилизира смесването между компонентите.

В заключение, резултатите от нашите дългогодишни проучвания показват, че правилното локализиране на hBest1 по базолатералната мембрана на клетките зависи от участието на поне три сортиращи сигнала, като нарушаването на аминокиселинния състав на всеки сигнал по отделно не може да „обърне“ локализирането на белтъка по апикалната мембрана, а предизвиква само частична промяна в тази посока. Затова е по-коректно да говорим за акумулативен ефект на няколко сортиращи сигнала, за да се постигне пълното обръщане на локализацията на hBest1. Но дори частичната апикална локализация на белтъка и увеличаване на броя молекули на hBest1 по апикална мембрана нарушава йонния транспорт през клетките на ретиналния пигментен епител, увеличавайки концентрацията на анионите в пространството около фоторецепторите, и това постепенно може да доведе до тяхното увреждане и отмиране, което с течение на времето да предизвика прогресивната загуба на зрение.

Чрез използването на PLA_2 и TEP индиректно, но „елегантно“ показахме, че променения метаболизъм от hBest1 в посока на синтез и/или натрупване на неламеларни липиди, понижава действието на PLA_2 върху MDCK II - hBest1 клетките, защото TEP се променя много слабо (под 10%). Въпреки това, дори при понижено ензимно действие на PLA_2 върху клетките, се увеличава течноподредената и намалява течноподредената фаза в клетъчните мембрани, където основно се локализира hBest1 (около 70%), което показва инактивирането на канала в течноподредената фаза.

Задълбочените изследвания с монослоевите, съдържащи hBest1 и основни липиди, включително и холестерол, разкриха силите на взаимодействие между различните молекули, т.е. наличието на смесируемост или фазово разделяне на повърхността на филмите, което предизвика последвалите изследванията с наночастици.

V. Приноси

Приноси с фундаментален характер

1. Масштабните изследвания, проведени с модели на биологични мембрани допринесоха за дълбокото разбиране на молекулярните механизми на взаимодействие на hBest1 с основни липиди, определящи повърхностните свойства, локализация, (само)организация и функции на hBest1 в клетъчните мембрани.

2. Бяха определени елементи от вторичната структура на hBest1 и влиянието на Ca^{2+} върху неговата конформация.

3. Бяха определени промените в липидния състав в мембраните на MDCK II клетки, предизвикани от hBest1.

Приноси с научно-приложен характер

1. Бяха създадени две нови, стабилно трансфектирани с hBest1 клетъчни линии: RPE1-hBest1, произхождаща от ретинален пигментен епител и MDCK II-hBest1, произхождаща от епител на бъбрек. Всички създадени преди това клетъчни линии, които дори ендогенно експресират hBest1, губят неговата трансляция при инкубиране на клетките *in vitro*.

2. Беше създаден оригинален метод за пречистване и изолиране на hBest1 от клетките на новосъздадената MDCK II - hBest1 клетъчна линия, което определи възможността за провеждане на всички други изследвания с моделни мембрани и наночастици.

Приноси с методичен характер

1. Беше определена смесваемостта на hBest1 в двукомпонентни монослоеве чрез оригинално прилагане на метода на Goodrich за намиране на ΔA и ΔG_{mix} в трикомпонентни монослоеве.

2. Беше създаден оригинален подход за количествено определяне на апикалната и базолатерална локализация на hBest1, въз основа на данните от конфокална микроскопия.

VII. Публикации, свързани с темата на дисертацията: 18 бр.

С импакт фактор: 16 бр.

1. **Jordan A. Doumanov**, Kirilka Mladenova, Vesselina Moskova-Doumanova, Tonya D. Andreeva, Svetla D. Petrova. Self-organization and surface properties of hBest1 in models of biological membranes. *Advances in Colloid and Interface Science*, accepted February 2022, (302)102619, **Q1, IF 15.19**, **Цитати-1** <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102619>
2. Pavel Videv; Kirilka Mladenova; Tonya D. Andreeva; Jong Hun Park; Veselina Moskova-Doumanova; Svetla D. Petrova; **Jordan A. Doumanov**; Cholesterol Alters the Phase Separation in Model Membranes Containing hBest1; 2022; *Molecules* 2022022, Volume 27, Issue 13, 4267, **Q1, IF 4.927**, <https://doi.org/10.3390/molecules27134267>
3. a) Erik Dimitrov, Natalia Toncheva-Moncheva, Pavel Bakardzhiev, Aleksander Forsys, **Jordan Doumanov**, Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, Barbara Trzebicka and Stanislav Rangelov; Nucleic acid-based supramolecular structures: vesicular spherical nucleic acids from a non-phospholipid nucleolipid; *Nanoscale Advances*, August 2022, **Q1, IF 5.598**, **Цитати-1**, 10.1039/d2na00527a
4. b) Erik Dimitrov, Natalia Toncheva-Moncheva, Pavel Bakardzhiev, Aleksander Forsys, **Jordan Doumanov**, Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, Barbara Trzebicka and Stanislav Rangelov; Original Synthesis of a Nucleolipid for Preparation of Vesicular Spherical Nucleic Acids; *Nanomaterials* 2022, 12, 3645, **Q1, IF 5.719**, **Цитати-1**, <https://doi.org/10.3390/nano12203645>
5. Pavel Videv, Nikola Mladenov, Tonya Andreeva, Kirilka Mladenova, Veselina Moskova-Doumanova, Georgi Nikolaev, Svetla D. Petrova, **Jordan A. Doumanov**, Condensing Effect of Cholesterol on hBest1/POPC and hBest1/SM Langmuir Monolayers; 2021, *Membranes*, Volume 11, Issue 1, 52, **Q2, IF 3.094**, **Цитати-3**, 10.3390/membranes11010052
6. Mladenov, N (Mladenov, N.) Petrova, S (Petrova, S.) Andreeva, T (Andreeva, T.) Moskova-Doumanova, V (Moskova-Doumanova, V.) Videv, P (Videv, P.) Mladenova, K (Mladenova, K.) **Doumanov, J (Doumanov, J.)**, Effect of cholesterol on mixed hBest1/lipid monolayers, *FEBS OPEN BIO*, 2021, Volume11, Page 224-224, Supplement 1, **Q2, IF 2.693**
7. Nikola Mladenov, Svetla D. Petrov, Kirilka Mladenov, Desislava Bozhinov, Veselina Moskova-Doumanov, Tanya Topouzova-Hristov, Pavel Videv, Ralitsa Veleva, Aneliya Kostadinov, Galya Staneva, Tonya D. Andreev, **Jordan A. Doumanov**, Miscibility of hBest1 and sphingomyelin in surface films – A prerequisite for interaction with membrane domains, 2020, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 189, 110893, **Q1, IF 3.973**, 10.1016/j.colsurfb.2020.110893
8. Tonya D. Andreeva, Svetla D. Petrova, Kirilka Mladenova, Veselina Moskova-Doumanova, Tanya Topouzova-Hristova, Yulia Petseva, Nikola Mladenov, Konstantin Balashev, Zdravko Lalchev, **Jordan A. Doumanov**, Effects of Ca²⁺, Glu and GABA on hBest1 and composite hBest1/POPC surface films, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018, 161, 192–199, **Q1, IF 4.295**, **Цитати-3** <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.10.051>

9. Kirilka Mladenova, Svetla D. Petrova, Tonya D. Andreeva, Veselina Moskova-Doumanova, Tanya Topouzova-Hristova, Yuri Kalvachev, Konstantin Balashev, Shomi S. Bhattacharya, Christina Chakarova, Zdravko Lalchev, **Jordan A. Doumanov**, Effects of Ca²⁺ ions on bestrophin-1 surface films, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 149 (2017) 226–232, **Q1, IF 3.902, Цитати-6**
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.10.023>
10. a) Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, Veselina Moskova-Doumanova, Tanya Topouzova-Hristova, Stoyanka Stoitsova, Irena Tabashka, Christina Chakarova, Zdravko Lalchev, **Jordan Doumanov**, Transepithelial resistance in human bestrophin-1 stably transfected Madin-Darby canine kidney cells, *Biotechnology and biotechnological equipment*, 29, 1, 101-104, 2015, ISSN (print):1310-2818, ISSN (online):1314-3530, **Q4, IF 0.622, Цитати-1** doi:10.1080/13102818.2014.988078
11. b) K. Mladenova, S. Petrova, T. Andreeva, V. Moskova-Doumanova, Z. Lalchev, **J. Doumanov**, Effect of Ca²⁺ ions on Bestrophin-1 interaction with 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in surface films, *FEBS journal suppl.*, 2015, Volume 282, p. 319, Supplement 1, **Q1, IF 4.53**
12. Kirilka Mladenova, Svetla D. Petrova, Georgi As. Georgiev, Veselina Moskova-Doumanova, Zdravko Lalchev, **Jordan A. Doumanov**, Interaction of Bestrophin-1 with 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) in surface films, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, ISSN 1873-4367, 122/ 432-438, **Q1, IF 4.287, Цитати-9**, doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.01.045
13. Veselina Moskova-Doumanova, Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, Tanya Topouzova-Hristova, Christina Chakarova, Zdravko Lalchev, **Jordan Doumanov**, Aminoacid exchange R25W affects proper cellular localization of Best1 protein in MDCKII cells, *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 2014, Tome 67, Number 2, **Q3, IF 0.198**
14. **Jordan Doumanov**, Kirilka Mladenova, Radoslav Aleksandrov, Georgi Danovski, Svetla Petrova, Interactions of pharmacologically active snake venom sPLA2 with different cell lines, *Biotechnology and biotechnological equipment*, 28; 5; 918-922, 2014, ISSN (print):1310-2818, ISSN (online):1314-3530, **Q4, IF 0.622, Цитати-3**, doi: doi.org/10.1080/13102818.2014.965014
15. K. Mladenova, V. Moskova-Doumanova, I. Tabashka, S. Petrova, Z. Lalchev and **J. Doumanov**, Establishment and haracterization of stably transfected MDCK cell line, expressing hBest1 protein, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 2013, 19 (2), 159–162, **Q3, IF 0.189**
16. **Doumanov JA**, Zeitz C, Dominguez Gimenez P, Audo I, Krishna A, Alfano G, Diaz ML, Moskova-Doumanova V, Lancelot ME, Sahel JA, Nandrot EF, Bhattacharya SS., Disease-causing mutations in BEST1 gene are associated with altered sorting of bestrophin-1 protein, *Int J Mol Sci.*, 2013 Jul 22;14(7):15121-40, **Q2, IF 2.464, Цитати-16**, doi: 10.3390/ijms140715121

Общ IF 62.303

Общ брой цитати - 44

Без импакт фактор: 2 бр.

17. Pavel Videv, Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, **Jordan Doumanov**, STRUCTURE AND FUNCTION OF hBEST1, EXPRESSED IN MDCK II CELLS, Sofia University, "St. Kliment Ohridski", Faculty of Biology, Department of Biochemistry, Bulgaria, 1164 Sofia, 8 Dragan Tzankov Blvd., 2019, p. 387-395, PKP-Print, <https://drive.google.com/file/d/1E-wzQ-k1L163yRieYFg8TI1j1mw0Hj5p/view?usp=sharing>, ISSN 1314-3425, регистрирана в НАЦИД
18. Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, Veselina Moskova-Doumanova, Albena Jordanova, Tanya Topouzova-Hristova, Zdravko Lalchev and **Jordan Doumanov**, Characterization of morphology and growth rate of stably transfected MDCK cell line, expressing wild type of hBest1 protein, Science and technology, 2013, Volume III, Number 1, 32-36

VIII. Участия на научни форуми

В страната:

1. Pavel Videv, Jon Hun Park, Nikola Mladenov, Tonya Andreeva, Veselina Moskova-Doumanova, Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, Jordan Doumanov, EFFECT OF CA²⁺ ON COMPOSITE BESTROPHIN-1 LANGMUIR MONOLAYERS, XXXI МЕЖДУНАРОДНА ONLINE НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ, Шестдесет години СЪЮЗ НА УЧЕНИТЕ – СТАРА ЗАГОРА, 03-04 юни 2021 год
2. P. Videv, K. Mladenova, T. Andreeva, N. Mladenov, J. H. Park, V. Moskova-Doumanova, S. Petrova, J. Doumanov, MORPHOLOGY OF COMPOSITE hBEST1/POPC AND hBEST1/SPHINGOMYELIN MONOLAYERS, SCIENTIFIC CONFERENCE KLIMENT'S DAYS, 05/11-05/11, 2020, Sofia
3. Никола Младенов, Светла Петрова-Чанкова, Ралица Велева, Павел Видев, Кирилка Младенова, Йордан Думанов, РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ НА hBEST1 В МЕМБРАННИ ДОМЕНИ ОТ ПЛАЗМЕНАТА МЕМБРАНА НА ЕУКАРИОТНИ КЛЕТКИ, Варненски медицински форум, т. 8, 2019, прил. 1, 13 - 15 септември 2019, Варна
4. Н. Младенов, С. Петрова, Т. Андреева, К. Младенова, В. Московка-Думанова, П. Видев, Т. Топузова-Христова, Й. Думанов; ЕФЕКТИ НА ТЕМПЕРАТУРАТА ВЪРХУ МОНОСЛОЕВЕ ОТ ЧОВЕШКИ БЕСТРОФИН-1; XXIX МЕЖДУНАРОДНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ, 6 – 7 юни 2019 година; Стара Загора
5. К. Младенова, С. Петрова, В. Московка-Думанова, Т. Топузова-Христова, П. Видев, Н. Младенов, Р. Велева, Т. Андреева, Й. Думанов; ВЛИЯНИЕ НА АТФ ВЪРХУ МОНОСЛОЕВЕ ОТ ЧОВЕШКИ БЕСТРОФИН-1; XXIX МЕЖДУНАРОДНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ, 6 – 7 юни 2019 година; Стара Загора

6. Nikola Mladenov, Svetla Petrova, Tonia Andreeva, Kirilka Mladenova, Desislava Bojinova, Ralitsa Veleva, Veselina Moskova-Doumanova, Pavel Videv, Yulia Petseva, Tanya Topouzova-Hristova, Jordan Doumanov, EFFECTS OF GLU AND GABA ON BEST1/SM MONOLAYERS, INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE "KLIMENT'S DAYS", 8-9 November 2018 Sofia, Faculty of Biology, SU
7. Nikola Mladenov, Kirilka Mladenova, Pavel Videv, Veselina Moskova-Doumanova, Tanya Topouzova-Hristova, Zdravko Lalchev, Tonia Andreeva, Svetla Petrova, Jordan Doumanov, TENSIMETRIC INVESTIGATIONS OF HBEST1 AND SM MONOLAYERS, YOUTH SCIENTIFIC CONFERENCE "KLIMENT'S DAYS", 16-17 November 2017, Sofia, Faculty of Biology
8. N. J. Mladenov, S. D. Petrova-Chankova, T. D. Andreeva, K. S. Mladnova, T. I. Topouzova-Hristova, V. S. Moskova-Doumanova, Y. G. Petseva, Z. I. Lalchev, J. A. Doumanov, AFM and BAM investigations of hBest1 and sphingomyelin monolayers, Folia medica, 2017, vol. 59, suppl. 1
9. Н. Младенов, С. Петрова-Чанкова, Т. Андреева, К. Младенова, Т. Топузова-Христова, В. Москова-Думанова, Ю. Пецева, З. Лалчев, Й. Думанов, ЕФЕКТИ НА GABA ВЪРХУ МОНОСЛОЕВЕ ОТ ЧОВЕШКИ БЕСТРОФИН-1, XXVII МЕЖДУНАРОДНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ, ПОСВЕТЕНА НА 65 ГОДИНИ "МИНИ МАРИЦА - ИЗТОК", 1-2 юни 2017 година
10. Пленарен доклад, Assoc. prof. Jordan Doumanov PhD, Department of Biochemistry, Sofia University St. Kliment Ohridski, Cellular Polarity and Retinal Pathologies, Младежка научна конференция "Климентови дни" 17-18 ноември, 2016 г., София, Биологически факултет
11. K. MLADENOVA, S. PETROVA T. ANDREEVA, N. MLADENOV, V. MOSKOVA-DOUMANOVA, T. TOPOUZOVA-HRISTOVA, Y. PETSEVA, K. BALASHEV, Z. LALCHEV, J. DOUMANOV, VISUALIZATION OF HBEST-1 PROTEIN BY ATOMIC-FORCE MICROSCOPY, Постер M27, Младежка научна конференция "Климентови дни" 17-18 ноември, 2016 г., София, Биологически факултет
12. К. Младенова, С. Петрова, Т. Андреева, В. Москова-Думанова, Т. Топузова-Христова, Р. Велева, Е. Йоцова, Лалчев, Й. Думанов, ПРИЛОЖЕНИЕ НА АТОМНО-СИЛОВАТА МИКРОСКОПИЯ ПРИ ИЗСЛЕДВАНЕ НА ТРАНСМЕМБРАННИ БЕЛТЪЦИ, XXVI МЕЖДУНАРОДНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ, 2-3 Юни, 2016, Стара Загора
13. Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, Tonia Andreeva, Ekaterina Yotsova, Veselina Moskova-Doumanova, Tanya Topouzova-Hristova, Zdravko Lalchev, Jordan Doumanov, Influence of γ -aminobutyric acid on Bestrophin-1 interaction with POPC in Langmuir monolayers, Младежка научна конференция "Климентови дни", 18-20.11.2015, постер KD16, Биологически Факултет на СУ „Св Климент Охридски“

14. Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, Tonya Andreeva, Ekaterina Yotsova, Veselina Moskova-Doumanova, Zdravko Lalchev, Jordan Doumanov, Influence of glutamate on Bestrophin-1 interaction with POPC in Langmuir–Blodgett films, Anniversary Conference of the Roumen Tsanev Institute of Molecular Biology, 5-6 October, 2015
15. Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, Veselina Moskova-Doumanova, Tanya Topouzova-Hristova, Christina Chakarova, Zdravko Lalchev And Jordan Doumanov, (2013) Transepithelial resistance in human bestrophin-1 stably transfected MDCK cells, International Conference "Bioscience - development and new opportunities" - KLIMENT'S DAYS 2013, poster MB38, Sofia, Bulgaria
16. Jordan Doumanov, Virginia Doltchinkova, Kirilka Mladenova, Radoslav Aleksandrov, Georgi Danovski, Stoyan Chakarov, Svetla Petrova,(2013), Altered surface properties of MDCK-hBest1 cells treated with toxic sPLA2, International Conference "Bioscience - development and new opportunities" - KLIMENT'S DAYS 2013, poster MB36, Sofia, Bulgaria
17. Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, Veselina Moskova-Doumanova, Albena Jordanova, Tanya Topouzova-Hristova, Zdravko Lalchev and Jordan Doumanov, (2013), Characterization of morphology and growth of stably transfected MDCK cell line, expressing wild type of hBest1 protein, 23th International Scientific Conference, 6 - 7 June 2013, Stara Zagora, Bulgaria
18. Kirilka Mladenova, Veselina Moskova-Doumanova, Petya Koleva, Tanya Hristova-Topouzova and Jordan Doumanov, (2013), Establishment of stably transfected MDCK cell line expressing wild type of hBest1 protein, Proceedings of the fourth workshop on experimental models and methods in biomedical research, p.153, 2013, Sofia, Bulgaria
19. K. Mladenova, V. Moskova-Doumanova, I. Tabashka, S. Petrova, Z. Lalchev and J. Doumanov, (2012), Establishment and characterization of stably transfected MDCK cell line, expressing hBest1 protein, KLIMENT'S DAYS 2012, poster P43, Sofia, Bulgaria
20. V. Moskova-Doumanova, J. Doumanov., (2012), Expression and localization of hBest1 in MDCK II cells, FEBS Advanced lecture course "Sofia school of protein science: structure and dynamics of biological macromolecules", 9-14 september 2012, p. 22, Sofia, Bulgaria
21. Veselina Moskova-Doumanova, Kirilka Mladenova, Zdravko Lalchev, Jordan Doumanov, (2012), Are the RPE-derived cell lines RPE-1 and RPE-J appropriate model for investigation of cellular localization of Best1 protein, Third workshop on Experimental models and methods in Biomedical research, 23-25 April 2012, oral presentation A01, Sofia, Bulgaria.

В чужбина:

22. V. Moskova-Doumanova, A. Krishna, E. Nandrot, P. Dominguez Gimenez, A. Jordanova, Z. Lalchev, SS. Bhattacharya, J. Doumanov, (2011), Investigation of cellular localization of the R25W Best1 mutant, , IVth International Congress of Molecular Medicine, 27-30.06.2011, poster 148, Istanbul, Turkey, In Vivo, vol.25, number 3, p. 524

По отделни въпроси от тематиката на дисертационния труд са защитени успешно 4 дипломни работи и 3 дисертационни труда за научно-образователната степен „доктор“ към Катедра „Биохимия“, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“.