

## РЕЦЕНЗИЯ

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

**Тема на дисертацията:** „Самоорганизация и повърхностни свойства на hBest1 в модели на биологични мембрани”

**Автор:** проф. д-р Йордан Атанасов Думанов

**Рецензент:** акад. проф. дбн Румен Георгиев Панков, Биологически факултет при СУ „Св. Климент Охридски”, член на научното жури, определено със заповед на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ РД38-595/31.10.2023 год.

### Кратки биографични данни за кандидата

Професор Йордан Думанов е роден през 1973 година в гр. Банско. Завършва висшето си образование в СУ „Св. Кл. Охридски“ през 1999 год., със специалност Биология и магистратура по „Клетъчна биология и биология на развитието“, като едновременно с това получава и втора специализация – „Учител по биология“. След дипломиранто си заминава за Германия, където първо работи като изследовател в Института по човешка генетика към Университета на Грайфсвалд и Института по биохимия, RWTH-Аахен, а от 2001 година постъпва като докторант в университета Хохенхайм в Щутгарт. През 2006 год. успешно защитава дисертация на тема „Идентифициране на базолатералния сортиращ сигнал в цитоплазмения домен на интерлевкин-6 сигналния преносител gp130“. През същата година проф. Думанов се завръща в България и постъпва на работа като асистент в катедрата по Биохимия на БФ при СУ „Св. Кл. Охридски“. В тази катедра продължава и професионалното му развитие, където преминава последователно през длъжностите главен асистент (2011-2014), доцент (2015) и професор (2021).

Проф. Думанов е специализирал в продължение на две години в Института по зрението, Университет Пиер и Мария Кюри, Париж, Франция и SABIMER, Севиля, Испания за четири месеца. Член е на Съюза на учените в България, секция Биохимия, биофизика и молекулярна биология. Участвал е в изпълнението на 20 проекта, финансирани от ведомствени и национални организации, като е ръководил шест от тях. Под негово ръководство вече са защитени успешно три докторски дисертации и девет дипломни работи.

### Общи данни за документацията свързана с дисертационния труд

Дисертационният труд, авторефератът и приложените документи по защитата са изготвени в пълно съответствие със Закона за развитие на академичния състав на РБ, Правилника за развитие на академичния състав на СУ „Св. Климент Охридски“ и вътрешните наредби на Биологически факултет. Представената научна продукция отговаря напълно на профила на обявения конкурс.

### Актуалност на дисертационната тема

Основен обект на проведеното проучване е човешкият трансмембранен белтък бестрофин 1 (hBest1), експресирани от клетките на ретиналния пигментен епител, където участва в калциево-зависимия пренос на хлорни йони. В

допълнение, има данни и за функционирането му като канал в централната нервна система, където транспортира  $\gamma$ -аминобутират (GABA) в глиалните клетки и глутамат (Glu) в астроцитите и невроните. Интересът към този белтък се поддържа от участието му в група наследствени дегенеративни заболявания на зрението, известни под общото название бестрофинопатии. До момента са описани над 200 различни мутации в *hBest1*, участващи в бестрофиновите патологии. Въпреки сравнително ниската си честота, тази група заболявания имат социално значими измерения, тъй като предизвикват прогресивна загуба на зрението при човека, което е свързано със силно снижаване качеството на живот на засегнатите индивиди.

Изясняването на молекулните механизми, довеждащи до проява на бестрофинопатиите изисква добро познаване на структурата, начина на вграждане в мембраната и нормалното функциониране на бестрофина. Както при всеки трансмембранен белтък, това в голяма степен се определя от взаимодействието с липидното му обкръжение – проблематика, която все още е слабо разработена. Проведените изследвания дават отговори на голяма част от тези въпроси, като представят нови данни за характеристиките на белтъка, поведението и взаимодействията му с основни мембранни компоненти. Всичко, споменато по-горе, ми дава основание да определя разработеният в дисертацията научен проблем като актуален както от фундаментална, така и от практическа гледна точка.

### **Структура, цели и методичен подход на дисертационния труд**

Дисертацията на проф. Йордан Думанов е написана на 196 страници, включва 69 фигури и 3 таблици. Много полезни, от доказателствена гледна точка, са и включените 30 стр. приложения, предоставящи информация, свързана с използваните материали и илюстриращи експериментални резултати, които не са включени в основния текст. Дисертацията е структурирана съгласно възприетите стандарти за този вид научен труд и включва основните раздели: Литературен обзор от 23 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материали и методи – 22 стр., Резултати и дискусия – 87 стр., Изводи – 3 стр., Приноси – 1 стр., Бъдещи изследвания - 1 стр. Включен е и списък на 18 публикувани от проф. Думанов научни статии и 22 участия с доклади на научни форуми, всичките във връзка с проучванията от дисертационния труд.

Литературният обзор, подкрепен с 294 литературни източника, е балансиран като обем и като съдържание и показва много добро познаване на публикуваната информация, свързана с темата на дисертацията. Направен е кратък, но информативен преглед на структурата и функциите на окото, като е отделено специално внимание на ретиналния пигментен епител. В следващите раздели са представени актуалните данни за генерализираните увреждания на ретината, известни като бестрофинопатии, като най-съществено място е отделено на известните до момента данни за основния носител на тези заболявания - белтъкът бестрофин-1 (*hBest1*). Доколкото бестрофинът е мембранен компонент, работещ в епителен тип клетки, са представени и още два раздела – „Клетъчна поляризация“ и „Биологични мембрани“, които резюмират основните характеристики на средата в която функционира изследвания белтък. Голямото количество информация е добре систематизирано, обобщено и онагледено с 14 подходящи фигури. Представянето на данните е ясно, направено е професионално и включва всички основни постановки, които са необходими за обосноваване и разбиране на извършените изследвания.

Целта е формулирана ясно – „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“. Тя е прецизирана в две комплексни задачи, които ясно очертават периметъра на проведените изследвания. За решаването на поставените задачи е използвана широка палитра от удачно подбрани интердисциплинарни методични подходи. В разделът „Материали и методи“ са описани различни методи от областта на биохимията и молекулярната биология (афинитетна и молекулно-ситова хроматографии, имунопреципитация, SDS-PAAGE, Western blotting, Real-Time PCR, мутагенеза и др.), физикохимията (измерване на хистерезисни  $\pi/A$  изотерми на свиване и разширяване, Брюстеръглова микроскопия, атомно-силова микроскопия, инфрачервена спектроскопия и др.) и клетъчната биология (клетъчно култивиране, трансфекция, създаване на стабилно трансфектирани клетъчни линии, имунофлуоресценция, МТТ тест, измерване на трансепителна резистентност и др.). Представянето на експерименталните процедури съдържа достатъчно информация, необходима за оценка на проведените експерименти.

### **Анализ на експерименталните резултати, изводи и приноси**

Основна част по значимост и по обем в дисертацията е разделът „Резултати и обсъждане“. Получените експериментални данни са изложени и дискутирани в раздела в ред, който следва дефинираните задачи на дисертационния труд. В разглеждането си аз също ще спазя този ред, като ще обобща основните научни достижения.

Първата група резултати включва изследвания върху човешкия белтък Best1 в неговата естествена среда – мембраните на клетки от различни клетъчни култури. Изследвайки различни клетъчни линии (RPE-1, RPE-J и MDCK II) проф. Думанов показва, че най-добър експериментален модел за проследяване клетъчната локализация на трансфектирания hBest1 са клетките от епителната линия MDCK II, в която белтъка се локализира по базолатералната мембрана подобно на ретиналните пигментно-епителни клетки, които са естественото място на експресия на бестрофина. Изследванията върху MDCK II - hBest1 клетките демонстрират, че в тях се наблюдава увеличаване на Ld домените в сравнение с Ld домените при нетрансфектирани MDCK II клетки, а hBest1 се локализира и самоорганизира основно в Ld областите (около 60-65 %) на клетъчните мембрани, спрямо 30-35 % в Lo домените (липидните рафтове). Разполагайки с тази подходяща експериментална система проф. Думанов изследва ефектите на мутантни форми на hBest1 - Y85H, Q96R, R25W и Y227N, за които се знае, че предизвикват класическата вителиформна дистрофия на макулата на Бест (BVMD), като най-вероятно засягат базолатералните сортиращи мотиви. След експресия на изготвените в лабораторията му мутантни форми на бестрофина и проследяване на тяхната клетъчна локализация е показано, че тези мутации в действителност нарушават правилната локализация на белтъка и са токсични за клетките. Интересна и потенциално важна за бъдещи изследвания е находката, показваща че Фосфорилирането на hBest1 по Tyr 227 повлиява базолатералната локализация на белтъка.

В изпълнение на втората комплексна задача, посочена в целите на дисертацията, проф. Думанов преминава от клетъчно биологичните към биофизични експериментални постановки, като ги използва за по-детайлно

проучване на начините по които hBest1 си взаимодейства с отделните мембранни липиди и за да даде отговор на въпроса как се променя неговата конформация, молекулна организация и активност в „изчистената“ среда на моделните биологични мембрани. Тази възможност, колективът на проф. Думанов си подsigурява след успешното разработване на метод за пречистване на hBest1 от стабилно трансфектираните MDCK клетки, като е постигнат значителен добив от около 2.8% от общото белтъчно съдържание.

Използвайки пречищения белтък и инфрачервена спектроскопия с трансформация на Фурие проф. Думанов попълва липсващите до този момент в литературата данни за вторичната структура на човешкия Best1. Показано е, че в състава на вторичната структура на hBest1 участват 51,1% спирални структурни елементи, включващи главни и къси  $\alpha$ -спирали (23,9%), и  $3_{10}$ -спирали (27,2%). Добавянето на  $\text{Ca}^{2+}$  предизвиква: увеличаване на всички спирални структури до 59,2%, дължащо се основно на нарастване на съдържанието на  $\alpha$ -спиралите (с 5,6%); намаляване на  $\beta$ -извивки и бримки до 27,2%; намаляване на агрегирани и антипаралелни листове от 16,7% до 13,6%.

Освен като калциево-активируем хлорен канал, за Best1 е показана и способността му да пропуска и невротрансмитери като Glu и GABA. Това води до логичното предположение, че транспортът на невротрансмитерите може също да индуцира различни конформационни промени в Best1 както и в самите мембрани. Използвайки Лангмюирови монослоеве и Лангмюир-Блоджетови филми, проф. Думанов провежда задълбочени изследвания на структурните и повърхностните свойства на hBest1. Чрез сравнение на  $\pi/A$  изотермите на монослоеве от чист hBest1 или в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA е установено, че най-малката възможна площ за молекулата се наблюдава при чистия белтък, както и, че не се променя съществено при добавяне на невротрансмитерите ( $A_0 = 3700 \text{ \AA}^2/\text{мономер}$ ), докато в присъствие на калциеви йони тя намалява съществено ( $A_0 = 3360 \text{ \AA}^2/\text{мономер}$ ).

Анализирайки кривите на модулите на еластичност спрямо повърхностното налягане е установено, че монослоеве от hBest1, hBest1 $\text{Ca}^{2+}$ , hBest1Glu и hBest1GABA имат различна плътност на опаковане и стойностите на  $\text{Cs}^{-1}(\text{max})$  са в долната граница за течно-разтегнати липидни филми. Допълнителна информация за молекулярните взаимодействия, структурните пренареждания и стабилност в монослоеве от hBest1 е получена чрез изследване хистерезисът на компресия-декомпресия на  $\pi/A$  изотермите. Установено е, че монослоеве от hBest1 (както и с добавени  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA) имат значителен хистерезис, който намалява с нарастване на  $\pi$ . Задълбочавайки изследванията върху Лангмюирови монослоеве от hBest1 чрез Брюстеръглова микроскопия (BAM) е показано, че монослоеве от hBest1, hBest1 $\text{Ca}^{2+}$ , hBest1Glu и hBest1GABA имат различна плътност на опаковане, която добре кореспондира с резултатите от  $\pi/A$  изотермите. Тъй като BAM не позволява разграничаване на точните конформации на белтъчните комплекси от hBest1 и евентуалните промени след третиране с  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu или GABA, проф. Думанов преминава към използването на атомно-силова микроскопия (AFM), метод който позволява регистриране на промени на ниво нанометри. AFM изображенията от Лангмюир-Блоджетови филми убедително показват, че човекия Best1 е по-голям от характеризирания до момента пилешни аналог, имат овална форма ( $100 \times 160 \text{ \AA}$  и височина  $75 \text{ \AA}$ ), а добавянето на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA води до промени в конформацията му, но само  $\text{Ca}^{2+}$  е способен да индуцира димеризация и тримеризация на белтъка.

Разширявайки ин витро моделните системи с цел доближаването им до естествените биологични мембрани, чрез използване на комбинации от изследвания белтък и различни липиди при формиране на Лангмюировите монослоеви проф. Думанов показва, че фосфолипидите (POPC) могат значително да променят организацията и активността на hBest1 в такива условия. Резултатите показват, че: hBest1 оказва „флуидизиращ“ ефект върху монослоеви от POPC, поради което hBest1/POPC филмите показват повишена еластичност; наличието на фосфолипид премахва ефектите на Ca<sup>2+</sup>, Glu и GABA, регистрирани при чистите белтъчни монослоеви; hBest1 и POPC не се смесват на повърхността на водната субфаза; hBest1 в смесените белтък/фосфолипидни монослоеви увеличава своята височина и латерални размери и променя своята компактна овална форма при наличие на Ca<sup>2+</sup>, Glu и GABA.

Използвайки сфингомиелинови (SM) и смесени hBest1/SM Лангмюирови монослоеви и калций, глутамат и гама-аминобутират е демонстрирано, че добавянето на белтъка предизвиква „флуидизация“ на hBest1/SM филмите, подобрява подредеността на смесените Лангмюирови монослоеви и че смесваемостта между hBest1 и сфингомиелина е термодинамично изгоден процес, което е предпоставка за силни белтък-липидни взаимодействия и в биологичните мембрани. По нататъшно усложняване на експерименталната постановка, постигнато чрез добавяне на още един обичаен мембранен компонент – холестерол, демонстрира, че той предизвиква кондензация при монослоевите, съдържащи hBest1, hBest1+SM и hBest1+POPC, а проучвания върху филмите формираните от hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol показват, че смесването на hBest1 и липидните молекули на повърхността на субфазата е спонтанен и термодинамично изгоден процес. В допълнение е установено, че холестеролът подобрява и стабилизира смесването между компонентите в hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol филмите, независимо от експерименталните условия.

В последната част на дисертационния си труд проф. Думанов представя първоначални данни и очертава интересно ново направление на изследванията си свързано със създаването на наночастици: нанодискове, полимерни и биконтинуални наноразмерни структури с участието на hBest1, които да се използват за транспорт и интегриране на белтъка в мембраните на клетките и възстановяване на техните функции.

От извършените изследвания са изведени 18 обобщени извода и са формулирани три приноса с фундаментален характер, два приноса с научно-приложен характер и два приноса с методичен характер. Всички изводи и приноси са експериментално обосновани и правилно формулирани, което ми дава основание да ги приема без забележки.

Афторефератът е изготвен съгласно изискванията и отразява всички основни резултати и приноси на дисертационния труд.

### **Съответствие на представената документация със ЗРАСБ и наукометрични показатели**

Общата научна продукция на проф. Думанов включва 64 статии, от които 44 са публикувани в списания с импакт фактор (общ ИФ 157,06) и цитирани 183 пъти в базата данни Scopus. За настоящия конкурс той е представил списък от 18 публикации и 22 участия в научни форуми у нас и в чужбина. От научните статии 16

са публикувани в списания с импакт фактор и са цитирани 44 пъти. Общият импакт фактор от тези статии е 62,3. В 16 от тях (89%) той е първи или последен автор, което е безспорно доказателство за водещата му роля в проведените изследвания. От 16-те статии с импакт фактор, повече от половината (56,2%) са публикувани в списания от първи квартал (Q1) - индикация и за високо им научно качество.

Справката за изпълнението на минималните национални изисквания по чл. 26 от ЗРАСРБ за научна област 4. Природни науки, математика и информатика професионално направление: 4.3 Биологически науки, представена от проф. Думанов включва следните показатели: група А - 50 т.; група В - 100 т.; по показател Г - 100 т., а по показател Д (цитирания) събира 160 т. при минимум 100 т. Така, при изискуем минимум от 350 т. за научната степен „Доктор на науките“, съгласно ППЗРАСРБ, проф. Думанов формира 390 т., с което не само покрива, но и надхвърля минималните национални изисквания, необходими за тази научна степен.

### **Заключение:**

Дисертационният труд „Самоорганизация и повърхностни свойства на hBest1 в модели на биологични мембрани“, представен от проф. Думанов е фокусиран монографичен труд на високо научно ниво, който отговаря на изискванията, предявявани към дисертация за получаване на научната степен „Доктор на науките“. Той е резултат на дългогодишна и целенасочена изследователска дейност и разработва съществени въпроси, свързани с актуалната тема за структурата, организацията и функциите на белтъка hBest1, мутациите в който предизвикват социално значимите заболявания бестрофинопатии. Проведени са поредица от пионерни изследвания, резултатите от които са намерили широк отзвук, както в нашата, така и в международната научни общности. Те характеризират своя автор като висококвалифициран професионалист в тази специфична област на молекулярната биология.

Всичко отбелязано по-горе ми дава основание да дам своята положителна оценка и да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури да присъдят на проф. д-р Йордан Атанасов Думанов научната степен „Доктор на науки“.

15.12.2023 г.

Рецензент:

/акад. проф. дбн Румен Панков/