

СУ „Св. Климент Охридски”

Биологически факултет

Катедра „Биохимия”

СОФИЙСКИ
УНИВЕРСИТЕТ



„СВ. КЛИМЕНТ
ОХРИДСКИ”
ОСНОВАН 1888 г.

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

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор” по
професионално направление 4.3 Биологически науки (Молекулярна
биология – Клетъчна поляризация и сигнализация)

на ас. Павел Веселинов Видев,

задочен докторант към катедра Биохимия

Научни ръководители:

Проф. д-р Йордан Думанов

Проф. д-р Светла Петрова

София, 2022 г.

Благодарности:

На първо място бих искал да изразя благодарност на научните си ръководители проф. д-р Йордан Думанов и проф. д-р Светла Петрова-Чанкова за тяхната подкрепа, професионализъм и разбиране, без които не би могла да бъде реализирана тази дисертация.

Изказвам благодарност и на доц. д-р Тоня Андреева и гл. ас. д-р Кирилка Младенова за техните незаменими съвети и насоки в експерименталната част.

Настоящата дисертация е реализирана с финансовата подкрепа на договор № КП-06-Н23/7 от 2018 г. към ФНИ, МОН.

Списък със съкращения:

hBest1 – човешки бестрофин-1

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

SM, eggSM – сфингомиелин, яйчен сфингомиелин

Chol - холестерол

RPE, РПЕ – ретинален пигментен слой, ретинален пигментен
епител

Glu – глутамат

GABA – гама-аминобутирилова киселина

ЕРГ – електроретинография

ЕОГ - електроокулография

КрBest – бестрофин от *Klebsiella*

cBest1 – кокоши бестрофин-1

bBest2 – говежди бестрофин-2

ВАМ – Брюстер-ъглова микроскопия

TLC – тънкослойна хроматография

TER – трансепителна резистентност

1. Увод.

Човешкият бестрофин-1 (hBest1) е калциево-активируем хлорен канал, който регулира ретиналната хомеостаза, възбудимостта на невроните и синаптичната активност [1]. Той се разполага в мембраната на клетки от ретиналния пигментен епител (RPE), както и в глиални клетки и астроцити. Освен в транспорт на хлорни йони в RPE, hBest1 участва и в пренасянето на глутамат [2] и γ -аминобутират [3] в ЦНС.

Генът *BEST1* е отговорен за синтеза на белтъка hBest1 и мутации в него водят до дегенеративни състояния на ретината, наречени още бестрофинопатии. Към тези патологии спада болестта на Бест (класическа вителиформна дистрофия на макулата), която е автозомно-доминантно заболяване и се проявява в юношеска възраст. Това нелечимо заболяване се характеризира с набор от клинични прояви като дегенерация на ретината свързана със загуба на централното зрение.

За да се изследват характеристиките на hBest1 са необходими интердисциплинарни подходи, чрез които да хвърли светлина върху свойствата на белтъка в зависимост от състоянието на плазмената мембрана, както и влиянието му върху самите клетки. Връзката между биохимичните свойства на белтъка и фазовото състояние на мембраната не е напълно изяснена. Изследването на взаимодействията между многокомпонентни моделни мембрани и hBest1 ще допринесат за разбирането на механизмите, по които белтъкът функционира, динамиката на конформационните промени и въздействието им върху мембранната топология и структура.

Получаването на трансфектирани клетки, с мутантни форми на hBest1, определянето на характеристиките на мутантните белтъци и тяхното въздействие върху еукариотни клеткиса от съществено значение

за изясняване на механизмите на патологичните състояния, отговорни за развитието на дегенерации на макулата.

2. Цел и задачи

Целта на дисертацията е да се определи връзката между структура и функция на hBest1 като се изследват молекулните взаимодействия между hBest1, фосфатидилхолин, сфингомиелин и холестерол в Лангмюирови монослое. Да се определи влиянието на hBest1 върху липидния състав и поляризацията на еукариотни клетки, както и влиянието на негови мутантни форми върху развитието на клетките.

За изпълнението на целта бяха поставени следните задачи:

1. Да се установят повърхностните свойства на hBest1 в дву- и трикомпонентни Лангмюирови монослое, включващи POPC, SM и холестерол в присъствие и отсъствие на калциеви йони;
2. Да се определи смесваемостта на hBest1 и двукомпонентни системи от POPC/холестерол и SM/холестерол в Лангмюирови монослое в присъствие и отсъствие на калциеви йони;
3. Да се определи ефектът на Ca^{2+} и променливи количества холестерол върху морфологията на POPC, SM, hBest1/POPC и hBest1/SM монослое.
4. Да се сравни липидния състав на MDCKII клетки и на такива, експресиращи hBest1;
5. Да се определи влиянието на Glu, GABA, АТР и PLA₂ върху трансепителната резистентност на MDCKII клетки и на такива, експресиращи hBest1;
6. Да се определи влиянието на мутантни форми на hBest1 в развитието на MDCKII клетки.

3. Материали и методи.

3.1 Материали.

Използваните консумативи и химикали са закупени от Sigma-Aldrich, освен ако не са специфично описани.

3.2 Методи.

3.2.1. Аналитични и биохимични методи

3.2.1.1 Приготвяне на клетъчни лизати

Трансфектирани и нетрансфектирани MDCKII клетки бяха промити с охладен PBS и към тях беше прибавен лизис-буфер (RIPA-буфер, Sigma), съдържащ коктейл протеазни инхибитори. След 1 час инкубация на лед, получените лизати бяха центрофугирани при 15700g на 4°C за 5 мин. За извършване на Western blot анализ, супернатантата беше събрана и пробите бяха преципитирани с ацетон. 100 µl от лизата беше добавен към 900 µl ацетон и инкубиран на -20°C за 30 мин. Преципитатите бяха центрофугирани на 13 000 оборота. Супернатантата беше отстранена. Утайката беше оставена да престои 30 мин на стайна температура, след което беше прибавен по 20µl Sample Buffer. Пробите бяха инкубирани 5 мин при 95°C.

3.2.1.2 Определяне на количество белтък по метода на Smith

За определяне на количеството белтък в пробите за хроматография и в тоталния лизат беше използван метода на Smith [4, 5]. Методът е подходящ за измерване в границите от 0.5 µg/mL до 1 mg/mL белтък. Предварително пробите бяха диализирани срещу пречистена вода. Бяха използвани бисинхонинова киселина (bicinchoninic acid, BCA) и 4% CuSO₄. Пептидните връзки на белтъците редуцират Cu²⁺ до Cu⁺. Cu⁺

образува хелатни съединения с ВСА, в резултат на което се получава лилаво съединение с максимум на абсорбцията на светлина при дължина на вълната 562 nm. Количеството белтък беше определено с помощта на стандартна крива, изготвена за телешки серумен албумин.

3.2.1.3 Пречистване на hBest1

Пречистването се извърши чрез молекулноситова и афинитетна хроматография [6]. Всички използвани буфери за хроматографиите са предварителни филтрувани.

3.2.1.4 Молекулно-ситова хроматография и FPLC

Фракциите, съдържащи His-tagged hBest1, бяха събрани в обща фракция. Сборната фракция бе пречистена чрез молекулно - ситова хроматография с помощта на колона Superose 12 (HR10/30), предварително калибрирана с PBS (pH 7.4) при скорост на потока 0.4 мл/мин. За елуиране бе използван същия буфер и профилът беше детектиран чрез измерване на абсорбцията при 280 nm (FPLC system, LKB, Sweden).

3.2.1.5 Афинитетна хроматография

Преди всяка стъпка на пречистване разтворът, съдържащ His-tagged hBest1, беше диализиран в PBS буфер за 24 часа при 4°C.

Диализираният разтвор, съдържащ His-tagged hBest1, беше пречистен чрез афинитетна хроматография. Използвахме HisTrap колона (GE Healthcare, BioScience AB, Sweden), наситена с Ni²⁺ йони. Ni²⁺ е използван в изследванията метален йон за пречистване на рекомбинантни His-tagged белтъци поради високия си афинитет към His и поради това висока ефективност на свързване. HisTrap колона беше предварително

калибрирана с различни буфери, съдържащи имидазол в различна комбинация и концентрация (Приложение 1). Фракциите бяха елуирани при скорост на потока 0.5 мл/мин с линеен градиент на имидазол в същия буфер. След това фракциите, съдържащи His-tagged hBest1, бяха имунодетектирани, обединени и диализирани. Белтъчните концентрации бяха изчислени по метода на Smith чрез използването на BCA Protein Assay kit [254, 255].

3.2.1.6 SDS-PAGE и имунодетекция чрез Western blot

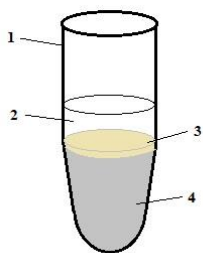
След всяка стъпка на пречистване пробите бяха проверявани за наличие на бестрофин-1 посредством Western blot.

Беше използван 10% разделящ гел. Освен пробите, на стартовете на гела беше нанесен и белтъчен маркер с големина между 10 и 250 kDa (BioRad). След приключване на електрофорезата беше извършен трансфер на белтъците от гела върху нитроцелуозна мембрана, посредством трансфериращ буфер. След 1 час при 110V мембраната беше промита с Ponceau S. По този начин бяха визуализирани трансферираните белтъци. За отчитане на hBest1 сигнал беше използвано моноклонално мише антитяло срещу човешки бестрофин-1 (IgG1 антитяло, клон Е6-6, Novus Biologicals) и второ козе анти-мише антитяло (IgG, конюгирано с хрянова пероксидаза, Enzo Life Sciences), конюгирано с хрянова пероксидаза. Мембраната беше третирана с ECL система (Santa Cruz Biotechnology Inc), съгласно инструкциите на производителя, и сигнала беше отчетен чрез филмова плака на GE HealthCare.

3.2.1.7 Получаване на липидни екстракти

MDCKII и MDCKII - hBest1 клетките бяха култивирани в петритата до достигане на 100% конfluентност. След преброяване, по 2.5×10^6 и 5

* 10^6 клетки от всяка линия бяха центрофугирани за 10 минути на 300 x g и утайката с клетки бе ресуспендирана в 300 μ l смес от хлороформ и метанол в съотношение 2:1. След инкубация за 1 час на стайна температура, през който периодично сместа се ресуспендира, се добавят 60 μ l дестилирана вода, сместа се разклаща добре и се центрофугира за 2 минути на 10000 x g), за да се получи фазово разделяне (Фиг. 1) [7]. Липидният екстракт се пренася в нова епруетка, разтворителят се изпарява и получените липиди в сухо състояние могат да бъдат използвани в последващи експерименти.



Фигура 1. Получаване на липиден екстракт от клетки по метода на . Легенда: 1 - центрофужна епруетка, 2 - водно-метанолова фаза, 3 - интерфаза, 4 - хлороформна фаза с липиди.

3.2.1.8 Тънкослойна хроматография на липиди

Разделянето на липидните фракции в получените екстракти бе извършено с тънкослойна хроматография (TLC) по метода на Folch [8] . Бяха използвани плаки с покритие от Silicagel 60 за неподвижна фаза, активирани за 1 час на 110°C. За подвижна фаза бе използвана смес от разтворители, съдържаща метанол, хлороформ, изопропанол, 0,25% воден разтвор на KCl и триетиламин в съотношение 30:9:25:6:18 [9]. Паралелно с изследваните проби на плаката бе нанесена стандартна

проба от разтвор на фосфатидилхолин и фосфатидилетаноламин с концентрация 1mg/ml. Разделянето бе направено в два последователни етапа в едно и също направление за подобряване на разделянето. Платката бе проявена чрез „напръскване“ с 20% водно-метанолов разтвор на амониев сулфат и загряване на 200°C за ~10 минути. Размерът на получените фракции бе определен с помощта на софтуер (ImageJ, National Institutes of Health).

3.2.2. Физикохимични методи

3.2.2.1. Тензиометрични измервания с използване на Лангмюирови монослоеве

Изследванията на монослоеве бяха извършени с помощта на система MicroTrough G (Kibron Inc.). Липидните и белтъчните компоненти бяха нанасяни чрез микропипета тип „Hamilton” на въздушно-водната фазова граница. За водна фаза бе използван 150 mM NaCl или 150 mM NaCl + 0.5μM CaCl₂ (за експериментите с Ca²⁺). Бяха използвани прегради и вани с тefлоново покритие, тъй като е инертно (липо- и хидрофобно) и по този начин се ограничава взаимодействието с компонентите от монослоя. Нанасянето на компонентите (липид или белтък) се извършва последователно. Промяната на π в зависимост от площта за молекула (A, Å²/молекула) (π/A изотерми) при постоянна температура (35±2°C) бе проследена чрез свиване и релаксиране на монослоя с използване на подвижните прегради.

За експериментите с Лангмюирови монослоеве бяха използвани разтвори на 1-палмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC, 1mM в хлороформ), сфингомиелин от яйчен жълтък (SM, 1mM в хлороформ), холестерол (Chol, 1mM в хлороформ) и човешки бестрофин 1 (1mg/ml в 150mM NaCl). Смесените дву- и трикомпонентни монослоеве

бяха формирани като компонентите бяха нанасяни един след друг в следната последователност – основен липид (POPC или SM), Chol и hBest1. След нанасянето на липидните разтвори се изчаква ~10 минути, за да се изпари органичният разтворител и да се разнесат равномерно молекулите по повърхността. След нанасянето на белтъка за изчаква 10-15 минути, докато се достигне равномерно разпределение на молекулите и равновесие на монослоя. От получените π/A изотерми беше изчислен модула на еластичност C_s^{-1} по следната формула: $C_s^{-1} = -A_\pi(\partial\pi/\partial A)_T$.

За да се проследи поведението на hBest1 в трикомпонентни монослоеве включващи един от основните липиди - POPC или SM - и холестерол, бяха построени изотерми с различно молно съотношение между белтъка и липидния компонент (1:2, 1:4, 1:20, 1:90, 1:117 и 1:172). От получените изотерми беше направено сравнение между получените средни площи за молекула (A^π) при различни стойности на π (5, 10, 15 и 18 mN/m) и бяха изчислени средните площи при идеално смесване A_{add} по следната формула:

$$A_{add} = X_{hBest1} A_{hBest1} + X_{(липиди)} A_{(липиди)}$$

Също така беше определена смесваемостта на трикомпонентните монослоеве чрез изчисляване изменението на свободната енергия на Гибс. Тези изменения са критерий за наличието на смесване или за фазово разделяне между липидния и белтъчния компонент. Свободната енергия на Гибс беше изчислена по формулата:

$$\Delta G_{exc}^\pi = N_A \left(\int_0^\pi A_{hBest1+липиди} d\pi - X_{hBest1} \int_0^\pi A_{hBest1} d\pi - X_{липиди} \int_0^\pi A_{липиди} d\pi \right) .$$

$A_{hBest1+липиди}$ е молекулната площ на компонентите в смесения монослой при определено повърхностно налягане, докато A_{hBest1} и $A_{липиди}$ са молекулните площи на съответния компонент – белтък и липиди – в

монослоеве съставени от hBest1 или основен липид (POPC или SM) и Chol при същите стойности на π . X_{hBest1} и $X_{\text{липиди}}$ са молните части на компонентите в смесените монослоеве. Изчислението на свободната енергия на смесване ΔG_{mix}^{π} бе направено по формулата:

$$\Delta G_{mix}^{\pi} = \Delta G_{exc}^{\pi} + \Delta G_{ideal}^{\pi} = \Delta G_{exc}^{\pi} + RT(X_{hBest1} \ln X_{hBest1} + X_{\text{липиди}} \ln X_{\text{липиди}}),$$

където ΔG_{ideal}^{π} е свободната енергия на Гибс при идеално смесване на компонентите.

3.2.2.2. Брюстер-ъглова микроскопия (ВАМ)

За да бъде визуализиран кондензиращия ефект на холестерола в hBest1 монослоеве, бе използван Брюстер-ъглов микроскоп - ВАМ (UltraВАМ, Accurion GmbH, Гьотинген, Германия), който комбинира изображения в реално време и висока разделителна способност (до 2 μm). Експериментите се провеждат при $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$; р-поляризирана червена светлина от 50mW ширококолов лазерен източник се насочва под ъгъла на Брюстър към водната повърхност, при която няма отражение. Компонентите на монослоеве се нанасят последователно върху фазовата граница: първо, POPC или яйчен SM (1 mM изходен разтвор в хлороформ) се разнасят, докато повърхностното налягане достигне 20 mN/m, и се добавя Chol (0,1 mM изходен разтвор в хлороформ) 2 минути по-късно с моларна част X_{Chol} 0,167, 0,285, 0,375, 0,444 или 0,5 (съответстват на съотношения липид:холестерол = 1:0.2, 1:0.4, 1:0.6, 1:0.8 и 1:1). След още 2 минути, когато разтворителят се изпари и достигне равновесие, hBest1 (1 mg/mL изходен разтвор в 150 mM NaCl) се добавя към бинарните POPC/Chol или SM/Chol монослоеве. Количеството на разпределения hBest1 се изчислява по отношение на основния липид в системата (POPC или SM) с моларно съотношение 1:45 и 1:86, съответно, така че площта, заета от белтъка, към тази, заета от околните липиди е 1:3

[10]. Изображенията са направени 10 минути след прилагане/добавяне на hBest1.

3.2.3. Клетъчнобиологични и молекулярнобиологични методи

3.2.3.1 Клетъчно култивиране

Използваните контролни MDCKII и стабилно експресиращите човешки бестрофин-1 MDCKII-hBest1 клетки бяха култивирани при стандартни условия – температура 37°C, влажност 95% и 5% съдържание на CO₂. Беше използвана хранителна среда DMEM с добавени 10% фетален серум (FBS), стрептомицин 100 mg/ml, пеницилин 60 mg/ml и генетицин (G418) 0.5mg/ml за трансфектираните клетки. MDCKII-hBest1 клетките са трансфектирани чрез вектор pReceiver-Best1HisMyctag (GeneCoposia TM), носител на гена *BEST1* с прикачени His- и Myc-участъци и гени за резистентност срещу неомицин и ампицилин. Клетъчната линия е получена чрез трансфекция с Effectene (Qiagen) [11]

3.2.3.2. Трансфекция

За получаване на мутантни форми на hBest1, бяха трансфектирани MDCKII клетки чрез вектор pReceiver-Best1HisMyctag (GeneCoposia TM), носител на гена *BEST1* див тип или с една от внесените точкови мутации Y85H, Q96R, R25W и Y227N. За трансфекцията бе използван кит Effectene (Qiagen). След достигане на ~90% конfluентност клетките бяха разреждени в съотношение 1:2 и прехвърлени в селективна среда, съдържаща 0.5mg/ml G418 [11].

3.2.3.3. Определяне на апоптоза чрез поточен цитометър

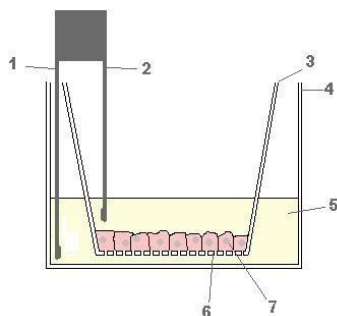
Степента на апоптоза бе определена в момента на пресяване в селективна среда и на 7-мия ден от пресяването. Броят на клетки в

апоптоза бе определен с помощта на поточен цитометър GUAVA easyCyte (Luminex) и кит GUAVA Nexin Reagent. Китът включва в състава си Annexin V и 7-Aminoactinomycin D (7-AAD). Annexin V се свързва с фосфатидилсерин при появата му във външния мембранен монослой на апоптични клетки. 7-AAD е флуоресцентно багрило, което оцветява ДНК. То не може да премине през интактна клетъчна мембрана, затова е подходящо за определяне на клетки в късни стадии на апоптозата, когато е нарушен пермеабилитета на мембраната. Клетъчните суспензии с трансфектираните и нетрансфектираните MDCKII клетки бяха инкубирани с реакционната смес според инструкциите на производителя. Клетките бяха разпределени в четири категории: незасегнати клетки - Annexin(-) 7-AAD(-), клетки в ранна апоптоза - Annexin(+) 7-AAD(-), клетки в късна апоптоза - Annexin(+) 7-AAD(+), клетъчни останки (дебри) - Annexin(-) 7-AAD(+). Резултатите бяха представени като проценти от общия брой. Всяка серия се състоеше от 4 повторения.

3.2.3.4. Измерване на трансепителна резистентност (TER) на клетки MDCKII и MDCKII-hBest1 с прилагане на Glu, GABA и ATP

По 2.5×10^5 клетки от всяка линия бяха посяти в 6-ямкови Transwells плаки. В хода на експеримента бе използвана хранителна среда Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) с добавени 10% серум (FCS), антибиотици - стрептомицин (100 mg/l) и пеницилин (60 mg/l) като допълнително бе добавен 0.5 mg/ml G418 (Sigma Aldrich) в средата за MDCKII-hBest1 клетки. Клетките бяха инкубирани за 10 дни в стандартни условия при 37°C и 5% CO₂. Бяха използвани серии в три повторения с добавени към хранителната среда глутамат (Glu, крайна концентрация 2mM), γ -аминобутирова киселина (GABA, крайна концентрация 100 μ M), аденозин трифосфат (ATP, крайна концентрация

0.5 mM) и контролна серия. Измерването на трансепителната резистентност (TER) бе правено всеки ден с помощта на уред Evom Epithelial Voltohmmeter (World Precision Instruments Inc.) според инструкциите на производителя, като хранителната среда в ямките бе подменяна с нова всеки път непосредствено преди измерването. Измерването бе направено с помощта на два електрода с фиксирана дължина - единият бе поставен в ямката с полупропусклива мембрана, където се разполагат клетките, а втория - отстрани в ямката на плаката (Фиг. 2). Разположението на електродите бе такова, че да не се допират до стените на ямките или до мембраната с клетките.



Фигура 2. Измерване на трансепителна резистентност на монослой клетки, култивирани върху transwell-плака: (1), (2) – електроди; (3) – ямка, чието дъно е полупропусклива мембрана (6); (4) – ямка на плаката; (5) – среда; (7) – монослой клетки.

3.2.3.5. Измерване на трансепителна резистентност (TER) на клетки MDCKII и MDCKII - hBest1 с третиране на PLA₂

По 2.5×10^5 клетки от всяка линия бяха посяти в 6-ямкови Transwells плаки. В хода на експеримента бе използвана хранителна среда Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) с добавени 10% серум (FCS), антибиотици - стрептомицин (100 mg/l) и пеницилин (60 mg/l) като допълнително бе добавен 0.5 mg/ml G418 (Sigma Aldrich) в средата за

МДСКII - hBest1 клетките. Клетките бяха инкубирани в стандартни условия при 37°C и 5% CO₂. Бяха използвани серии в три повторения с трансфектирани и нетрансфектирани клетки. Първата серия бе контролна с нетретиранни клетки. Клетките от втората серия бяха инкубирани с PLA₂ (секреторна фосфолипаза A₂, изолирана от *Vipera ammodytes meridionalis*) за 15 минути в деня на достигане на конfluентност (3-ти ден и за двете клетъчни линии), а при третата серия, клетките бяха инкубирани с PLA₂ същото време, но в деня на достигане на максимална трансепителна резистентност (TER_{max} - 5-ти ден за МДСКII и 7-ми ден за МДСКII-hBest1 клетките). За третирането с PLA₂, ензимът беше разтворен в безсерумна среда в концентрация, съобразена с броя клетки в ямките (2mM концентрация за 1 ml среда на 5x10⁵ клетки). Измерването на трансепителната резистентност (TER) беше правено всеки ден в продължение на 10 дни с помощта на уред Evom Epithelial Voltohmmeter (World Precision Instruments Inc.) според инструкциите на производителя, като хранителната среда в ямките беше подменяна с нова всеки път непосредствено преди измерването. В сериите с PLA₂, TER беше измерена и в различни моменти след третирането - на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 и на 360-та минута от отстраняването на ензима.

4. Резултати и дискусия

4.1. Тензиометрични изследвания на дву- и трикомпонентни монослоеове, съдържащи холестерол (изотерми, хистерезиси, модул на еластичност; +/- Ca^{2+})

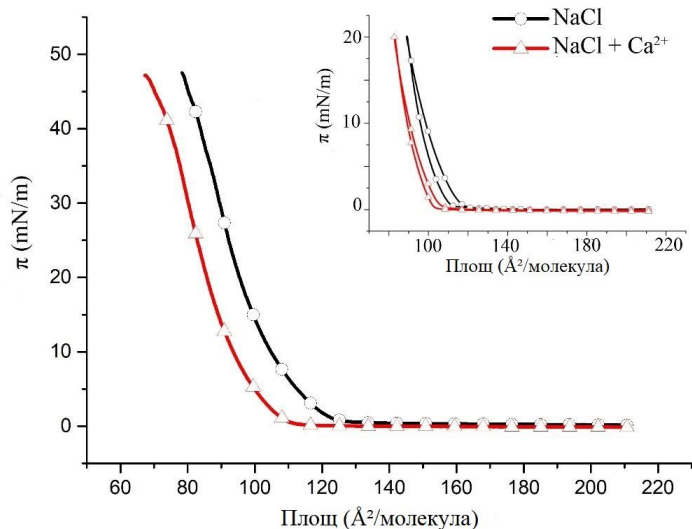
4.1.1. Ефект на Ca^{2+} върху POPC/Chol Лангмюирови монослоеове

В наши предишни изследвания беше проучен ефекта на калциеви йони върху монослоеове от hBest1/POPC [12] и hBest1/SM [13]. Следващият етап изискваше изследването на монослоеове с участието на холестерол (Chol). Всички тензиометрични изследвания бяха проведени при температура, близка до физиологичната ($35\pm 2^\circ\text{C}$).

Първата стъпка беше да се изследват бинарните системи POPC/Chol, SM/Chol и hBest1/Chol като основа за по-сложно структурираните и организирани тройни системи hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol. Изотермите на повърхностното налягане спрямо молекулната площ (π/A) на бинарните монослоеове (представени на Фиг. 3, 5 и 7) показват постепенно повишаване на повърхностното налягане и уплътняване на монослоя, съпътстващо намаляването на средната молекулна площ по време на компресия, без индикации за фазови преходи като плата или извивки. Получените изотерми имат различна форма и ход.

Изотермата на свиване π/A на POPC/Chol монослоя в присъствие на Ca^{2+} е изместена към по-малки молекулни площи при дадено π , в сравнение с изотермите без Ca^{2+} . Формата и наклонът на изотермата не се променят, следователно наличието на Ca^{2+} не влияе на фазовото състояние и молекулната организация в този бинарен монослой. Други интересни характеристики на изотермите π/A са повърхностното

налягане на колапс (π_{col}) и площта на колапс на молекула (A_{col}). Докато π_{col} не се влияе от добавянето на калциевите йони при POPC/Chol монослоя, то A_{col} (като мярка за кондензиращия ефект на Ca^{2+}), се намалява с $10 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$ (Фиг. 3).



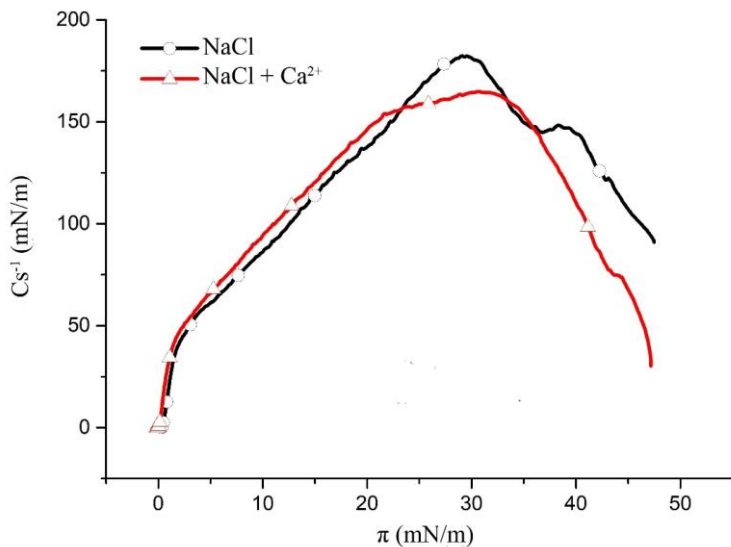
Фигура 3. Изотерми на повърхностно налягане/средна молекулна площ на бинарните POPC/Chol (1:1) монослоеве върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl с 0,5 μM $CaCl_2$ (червен) при $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (вмъкната графика: π/A хистерезисни криви на компресия-декомпресия).

Кондензиращият ефект на Ca^{2+} йони се отразява и в намаляване площта на хистерезиса на бинарния POPC/Chol (Фиг. 3) монослой. Хистерезисът на монослоя е резултат от комбинация между хидрофилно-липофидния баланс на липидните молекули, молекулната кохезия и взаимодействието на полярните глави със субфазата. Тези фактори определят опаковането на молекулите и еластичните свойства на монослоя, намиращ се на фазовата граница при свиване и разширение.

Свързването с Ca^{2+} йони влияе върху всеки един от тези параметри и равновесието помежду им в посока към компактизиране на молекулите. По този начин реорганизацията на молекулите при свиване и разширение на монослоя става обратима (по-малка промяна) и площта на хистерезиса остава малка.

Изследвания показват, че калциевите йони в определена концентрация могат да повлияят структурата на РОРС. Установено е, че зета потенциалът на РОРС везикулите нараства от нула в чиста вода до 15 mV след добавяне на CaCl_2 , което показва адсорбция на Ca йони [14]. Този ефект зависи от концентрацията на Ca йони, като води до 5% намаление на средната площ на една РОРС молекула при концентрация от $0,1\text{M}\text{Ca}^{2+}$. В предишни тензиометрични изследвания върху монослоеве от РОРС, hBest1 и hBest1/РОРС не беше открит забележим ефект на Ca^{2+} върху РОРС монослоеве при концентрация на Ca^{2+} от $0,5\ \mu\text{M}$ [12, 15], следователно кондензиращият ефект на Ca^{2+} върху бинарните РОРС/Chol монослоеве (при тях изотермите имат различна форма и ход) произлиза главно от ефекта на холестеролните молекули.

И двата максимума на модулите на еластичност C_s^{-1} на РОРС/Chol монослоеве без и с Ca^{2+} йони в субфазата (Фиг. 4), попадат в границите (от 100 до 250 mN/m), определени за течно-кондензирана фаза [16]. C_s^{-1} (който е мярка за еластичността на монослоя) не се влияе от добавянето на Ca^{2+} ; максималният C_s^{-1} се намалява само с 15 mN/m и се измества към малко по-високо повърхностно налягане.

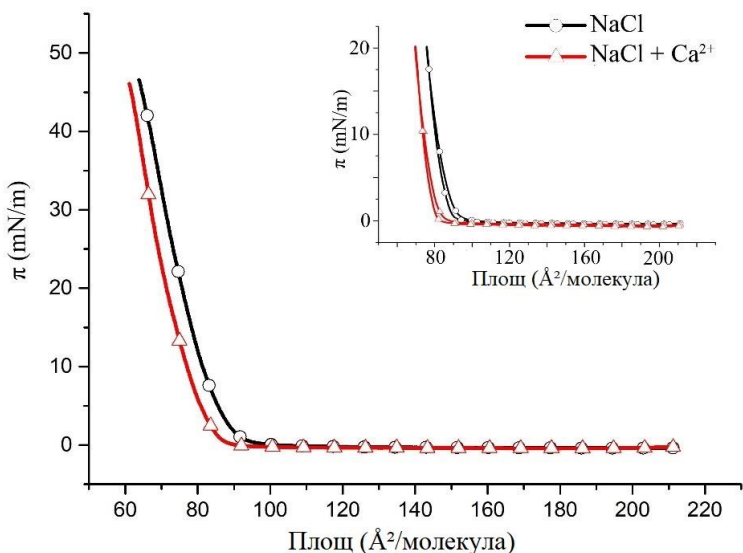


Фигура 4. Модули на повърхностна еластичност C_s^{-1} като функция на повърхностното налягане на бинарните POPC/Chol (1:1) монослоеве върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl с 0,5 μ M CaCl₂ (червен) при $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Тези резултати се потвърждават от подобни изследвания на Лангмюирови монослоеве. При монослоеве от олеинова киселина върху подложки с различна концентрация на CaCl₂, π/A изотермите се разполагат успоредно до 10 mN/m, докато докато C_s^{-1}/π графиките се припокриват [17]. Разликата в C_s^{-1}/π графиките на Фиг. 4 (получени чрез числено диференциране на π/A изотермите на Фиг. 3) при високи повърхностни налягания се дължи на различното разположение на инфлексната точка в π/A изотермите, които се появяват при 30,2 mN/m за монослоя POPC/Chol (1:1) върху подфаза от 150 mM NaCl и при 32,7 mN/m за монослоя върху 150 mM NaCl с 0,5 μ M CaCl₂. Тези стойности съвпадат точно с повърхностните налягания, при които се достигат максималните стойности на модулите за еластичност.

4.1.2. Ефект на Ca^{2+} върху SM/Chol Лангмуирови монослое

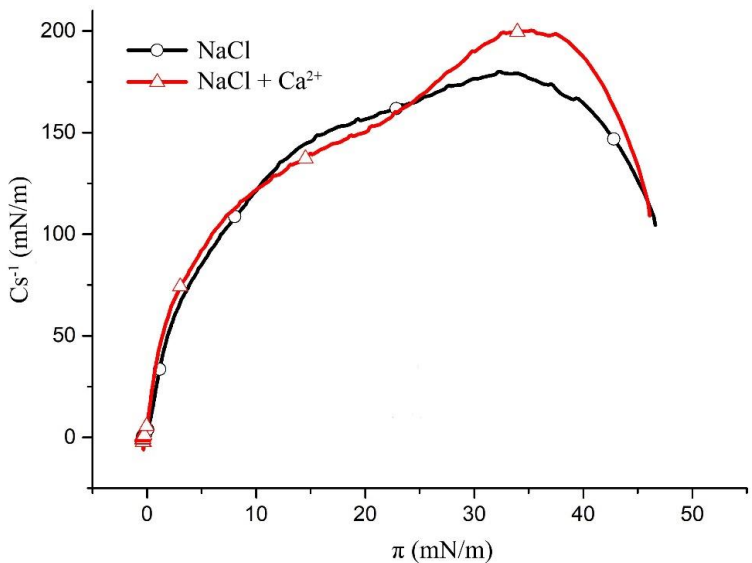
π/A изотермите на компресия на бинарния SM/Chol монослой показват тенденция подобна на POPC/Chol монослоеве (Фиг. 5). Добавянето на Ca^{2+} води до изместване на изотермата към по-малки молекулни площи в сравнение с тази без Ca^{2+} . Подобно на POPC/Chol, наклонът и формата на SM/Chol изотермата остава идентична, тоест фазовото състояние отново не зависи от наличието на Ca^{2+} . Забелязва се непроменено π_{col} , а A_{col} намалява с $4 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$ при добавяне на Ca^{2+} във водната фаза под SM/Chol монослоя.



Фигура 5. Изотерми на повърхностно налягане/средна молекулна площ на бинарните монослое SM/Chol (1:1) 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).

Максималните модули на компресия на SM/Chol монослоеве (~ 180 mN/m без Ca^{2+} и ~ 200 mN/m с Ca^{2+}), представени на Фиг. 6 показват, че монослоеве са в една и съща течно-кондензирана (LC) фаза. Максималният C_s^{-1} в този случай се увеличава с около 20 mN/m, като същевременно се измества към по-високо повърхностно налягане π (33 mN/m без Ca^{2+} и 36 mN/m с Ca^{2+}), което предполага слаба, индуцирана от Ca^{2+} стабилизация на тези бинарни монослоеве. Характерна особеност на SM монослоя е фазовият преход от течно-разтеглено състояние (LE) към LC, проявяващ се чрез широко плато (при повърхностни налягания от 6 до 15 mN/m) в зависимостта C_s^{-1}/π [18]. Такова плато липсва в монослоеве SM/Chol, което предполага молекулно смесване на двата липида.

По отношение на хистерезисните бримки, при SM/Chol монослоя също се наблюдава намаляване на площта, което може да е индикация за кондензиращ ефект на Ca^{2+} , въпреки по-слабия ефект върху този монослой в сравнение с монослоеве от POPC/Chol. Кондензиращият ефект на Ca^{2+} йони върху монослоеве SM [19, 20] и върху монослоеве Chol [21] вече е доказан.



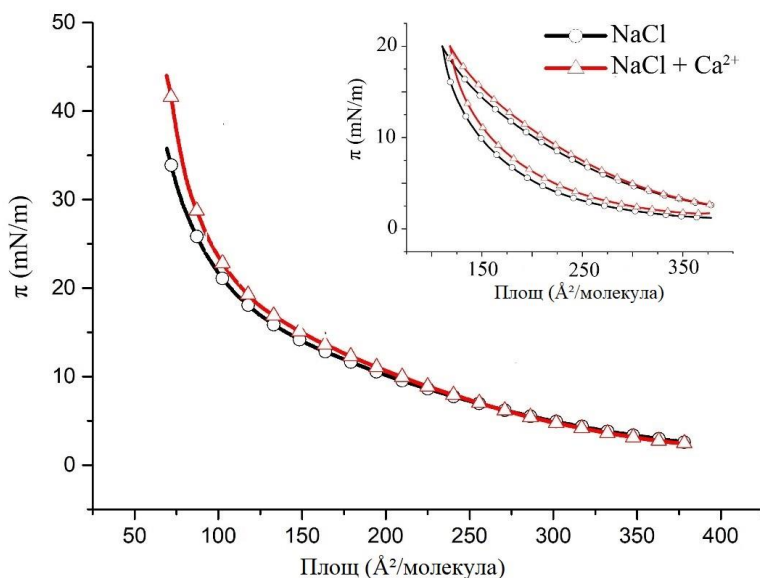
Фигура 6. Модули на повърхностна еластичност C_s^{-1} като функция на повърхностното налягане на бинарните монослоеове SM/Chol (1:1) върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl с 0,5 μ M CaCl₂ (червен) при 35 \pm 2 $^{\circ}$ C.

Максималният модул на компресия на SM монослоеове при 35 $^{\circ}$ C е около 50 mN/m [13], както без, така и с Ca²⁺ във водната подложка, а добавянето на Chol в моларно съотношение 1:1 води до 3.5 - 4 пъти увеличаване на тази стойност, като по този начин предизвиква изместване на фазовото състояние от LE към LC.

4.1.3. Ефект на Ca²⁺ върху hBest1/Chol Лангмюирови монослоеове

В π/A изотерми на монослоеове hBest1/Chol (моларно съотношение 1:58.5, съответстващо на съотношение на повърхността 1:3) се разграничават две различни области (Фиг. 7). При ниски повърхностни налягания до около 20 mN/m изотермата наподобява тази на hBest1 [12, 13, 15], докато при по-високи повърхностни налягания изглежда подобна

на изотермата на Chol [21-23]. И двете изотерми имат идентична форма и изходно повърхностно налягане $\pi_0 = 2,6 \text{ mN/m}$ и съвпадат една с друга до $\pi \sim 13 \text{ mN/m}$. Над 13 mN/m изотермата hBest1/Chol с добавяне на Ca^{2+} е леко изместена към по-високи молекулни площи (до $80 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$ при 35 mN/m), за разлика от монослоеве POPC/Chol и SM/Chol, които са изместени към по-ниски площи ($70 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$ при 35 mN/m).



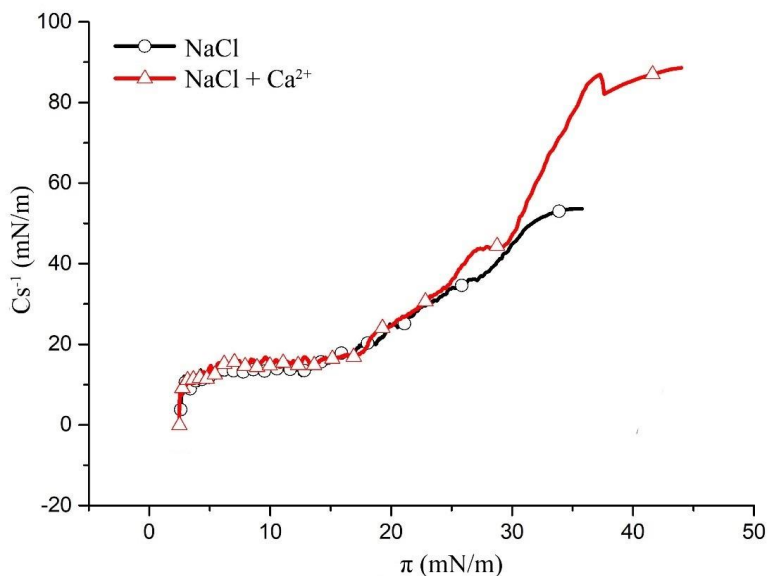
Фигура 7. Изотерми на повърхностно налягане/средна молекулна площ на бинарните монослоеве hBest1/Chol (1:58.5) върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl с $0,5 \text{ }\mu\text{M CaCl}_2$ (червен) при $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (вмъкната графика: π/A хистерезисни криви на компресия-декомпресия).

За разлика от POPC/Chol и SM/Chol, при монослоеве, съдържащи hBest1, се наблюдава ненулево изходно повърхностно налягане (изотермата започва от 2.6 mN/m). Това явление се наблюдава и в предишни експерименти върху чисти hBest1 монослоеве като BAM

изображения показват, че въпреки ненулевата стойност на π_0 , монослоеве са хомогенни [24].

Чрез C_s^{-1}/π зависимостите, може да бъде направена по-точна оценка на фазовите състояния и преходи, протичащи по време на монослойна компресия. (Фиг. 8). Отново се разграничават две области в двете C_s^{-1}/π криви. В първата област, разположена при повърхностни налягания между 2,6 и 13 mN/m, модулът на еластичност е само около 14 mN/m и не се променя при свиване. Според Davies и Rideal [16], LE и LC състоянията се характеризират със стойности на C_s^{-1} в диапазона съответно от 12,5-50 mN/m и 100-250 mN/m. По този начин, при повърхностно налягане под 13 mN/m бинарните монослоеве hBest1/SM са в LE състояние, докато в описаната по-горе система е налице съвместно съществуване между LE и LC фаза.

Самостоятелни холестеролни монослоеве върху различни субфази (водни разтвори, буфери) и температурни условия са изследвани в различни разработки [22, 23, 25]. Установихме, че максималният модул на компресия на Chol монослой $C_s^{-1}(\max)$, достигнат при 35 mN/m, е 53 mN/m при добавяне на hBest1 (Фиг. 8). Това е индикация, че монослоеве стават по-неподредени в сравнение с чистите Chol монослоеве, за които C_s^{-1} при 35 mN/m е над 300 mN/m, съответно те се намират в кондензирано фазово състояние. Добавянето на Ca йони обаче оказва обратен ефект, подобрявайки подредеността на молекулите в монослоя hBest1/Chol, както се вижда от увеличението $C_s^{-1}(\max) \sim 90$ mN/m. От друга страна, максималният C_s^{-1} на hBest1/Chol монослоеве без и с Ca^{2+} е съответно 4 и 8 пъти по-висок в сравнение с чистите hBest1 филми [12, 13], което предполага силно намаляване на еластичността и флуидитета на белтъчния филм, свързано с кондензиращата роля на Chol и Chol+Ca²⁺.



Фигура 8. Модули на повърхностна еластичност C_s^{-1} като функция на повърхностното налягане на бинарните монослоеви hBest1/Chol (1:58.5) върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl с 0,5 μ M CaCl₂ (червен) при $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Циклите на компресия-декомпресия π/A на монослоевите hBest1/Chol, представени във вмъкването на Фиг. 7, потвърждават, че добавянето на hBest1 намалява подредеността и увеличава течливостта на монослоя от Chol. Chol монослоят показва почти нулев хистерезис [26], но когато се смеси с hBest1, площта на хистерезисната бримка нараства значително и наподобява тези на монослоевите hBest1 и hBest1/ПОРС [12, 13]. Формата на циклите на компресия-декомпресия и големината на хистерезиса не се влияят от наличието на Ca²⁺.

Проведени опити с монослоеве от холестерол показват изместване на изотермите на свиване към по-ниски молекулни площи при добавяне на калциеви йони (CaCl₂) - монослоя в присъствие на

калций достига $\pi = 30 \text{ mN/m}$ при $\sim 30 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$, докато без калций тази стойност на π се достига при $\sim 37 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$ [21]. Трябва да се отбележи, че в този случай са използвани по-високи концентрации на калций (5mM) и експериментите са проведени при по-ниска температура ($\sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$) в сравнение с тези, използвани в представените експерименти (0.5 μM и $\sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$). Тъй като температурата на топене на холестерола е много по-висока от използваните $\sim 148 \text{ }^\circ\text{C}$, (National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 5997, Cholesterol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cholesterol>) може да се приеме, че разликата в температурата при различните експерименти е от минимално значение. Свързването на Ca йони предизвиква изместване към по-големи молекулни площи при монослоеве hBest1/SM, и към по-малки площи при такива от пречистен hBest1 - при монослой изграден само от hBest1 в присъствие на калций $\pi = 20 \text{ mN/m}$ се достига при $\sim 1000 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$, докато в отсъствие на Ca^{2+} същото π се достига при $\sim 1200 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$ [13]. Взаимодействието между холестерол и белтък при монослоеве hBest1/Chol, опосредства промяната и преминаване към по-големи молекулни площи с добавен Ca^{2+} във водната фаза – монослой в присъствие на Ca^{2+} достига $\pi = 30 \text{ mN/m}$ при $\sim 85 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$, докато без Ca^{2+} същата стойност на π се достига при $\sim 75 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$. За кокоши бестрофин-1 са предположени определени места за директно свързване с холестерола в мембраната [27], но за hBest1 все още такива данни липсват.

Ролята на холестерола в активирането на редица трансмембранни белтъци, включително калциево зависими йонни канали е функционално дефинирана и е доказана [28]. Проучванията показват, че кинетиката на калций-зависимите хлорни канали в съдовите гладкомускулни клетки се променя драстично от краткото приложение

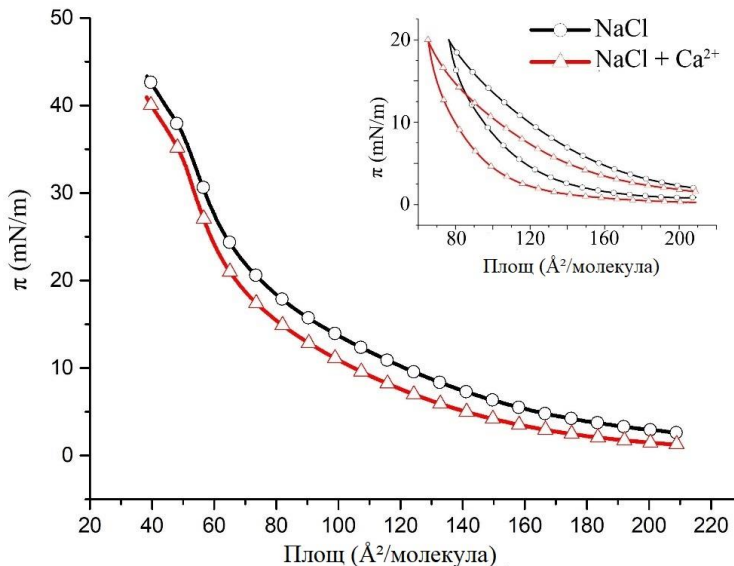
на метил β -циклодекстрин (M- β CD), който свързва холестерол, но има слабо изразен ефект върху разположението на калций-зависими калиеви канали и хлорния канал TMEM16A в или извън рафтовете [28]. Sones et al. [28], предполагат, че Ca^{2+} -зависимите Cl^- канали се разполагат в локализиранни липидни микродомени или липидните рафтове, където взаимодействието с калиевите канали може да определя биофизични и фармакологични свойства. Калиевите канали са намерени в обогатени с кавеолин липидни рафтове в ендотелни клетки [29, 30], глиомни клетки [31], както и гладка мускулатура на уретрата и матката [32-34] и именно физическото взаимодействие с белтъка кавеолин-1 в тези микродомени действа като посредник и регулатор [29, 35]. Разрушаването на богатите на холестерол липидни домени от циклодекстрина намалява активността на калиевите канали в глиомни и гладкомускулните клетки на матката [31, 34]. Sones et al., показват, че прилагането на M- β CD, при относително ниски концентрации (3 mg.ml^{-1}) в сравнение с предишни проучвания [33, 36-39], намалява притока на K^+ йони в миоцити, зависим от паксиллин, но увеличава амплитудата на активираните от калций хлорни потоци [28]. Това показва, че холестеролът има пряко въздействие и върху хлорни канали, които се разполагат в липидните рафтове, не само върху такива, които предпочитат течна-неподредената фаза в мембраната. Съществуват данни за връзка между TMEM16A и бестрофина [40]. Тъй като в ендотелни клетки TMEM16A е основен при транспорта на хлорни йони, експресията на TMEM16A има значение за експресията и на други канали, включително бестрофини [40, 41]. Волт-зависими калиеви канали [42-45], волт-зависими натриеви канали [46, 47], TRPM8 [48], както и ацетилхолинови рецептори [49], Na^+ - K^+ АТФ-аза [50], β -адренергични рецептори [51, 52], хемокинови рецептори [53], глутаматни рецептори [54, 55], канабиноидни рецептори [56], опиоидни рецептори [57] се разполагат и изпълняват функцията си в подредената фаза в мембраната.

Сред тях има такива, които разполагат с места за директно свързване с холестерол [46, 58-67]. Действието на йонни канали в подредената фаза и активирането им посредством холестерол (както и от резултатите по-горе) създават предпоставки да се смята, че холестеролът може да взаимодейства с hBest1 и да повлиява определени участъци от молекулата, които са отговорни за разположението в липидните рафтове.

4.1.4. Ефект на Ca^{2+} върху hBest1/POPC/Chol Лангмюирови монослое

Следвайки основната схема за изследване на термодинамичното поведение на бинарни hBest1/POPC и hBest1/SM филми [12, 13], където бяха използвани монослое със съотношение на площите hBest1/липид 1:3 (площта на монослоя, заета от белтъка, към площта, заета от липидите), ние продължихме изследването с трикомпонентни системи hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol при биологично релевантни условия. Съотношението на площите 1:3 се постигна при моларни съотношения 1:45:45 и 1:86:86 (еквимоларно съотношение между двата липида) на тройните hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol монослое, съответно. Добавянето на молекули hBest1 към бинарния липиден POPC/Chol монослой напълно промени π/A изотермата. Формата на изотермата се доближава по-скоро до тази на монослоя hBest1/Chol отколкото до изотермата на POPC/Chol. π/A изотермите на монослоеве hBest1/POPC/Chol имат идентична форма подобна на „разтегната“ синусоидална крива в отсъствието и присъствието на Ca^{2+} (Фиг. 9). Добавянето на Ca йони намалява равновесното разпространение π_0 от 2,6 mN/m до 1,3 mN/m и измества цялата изотерма към по-ниски повърхностни налягания, което показва кондензиращ ефект на Ca^{2+} върху организацията на молекулите, разположени на фазовата граница. Наблюдава се промяна в хода на изотермата при около 15 mN/m (π_{tr}).

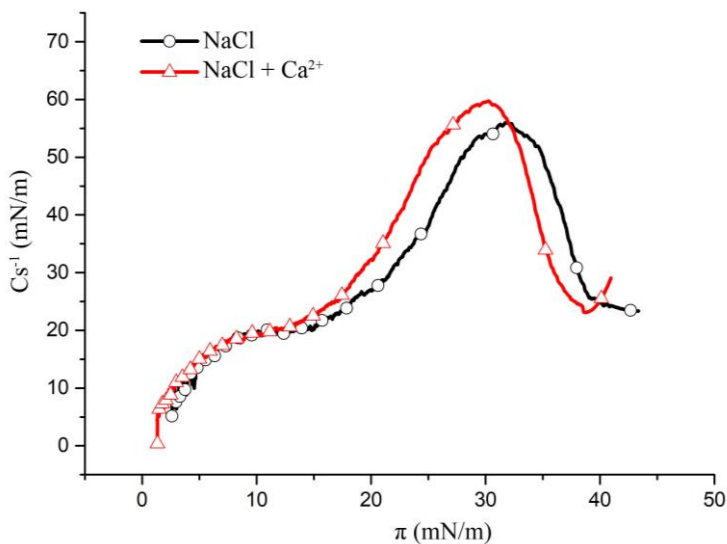
Формата на хистерезистните бримки на hBest1/POPC/Chol е сходна на тези при hBest1/POPC [12] и hBest1/Chol, като тази при монослоя с Ca^{2+} е изместена към по-малки молекулни площи, както се наблюдава и при изотермите.



Фигура 9. Изотерми на повърхностно налягане/средна молекулна площ на тройните монослоеве hBest1/POPC/Chol (1:45:45) 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).

Точното местоположение на π_{tr} може да се намери от кривите C_s^{-1}/π на Фиг. 10. Те показват постепенно нарастване на модула на еластичност при ниско повърхностно налягане под 13 mN/m (π_{tr}), съответстващо на съвместното съществуване на газ (G)-LE, както е показано от стойностите на C_s^{-1} , последвано от много по-стръмно увеличение на C_s^{-1} при повърхностно налягане от 13 mN/m до 32 mN/m (за субфазата без Ca^{2+}) или 30 mN/m (за субфазата с Ca^{2+}), където се

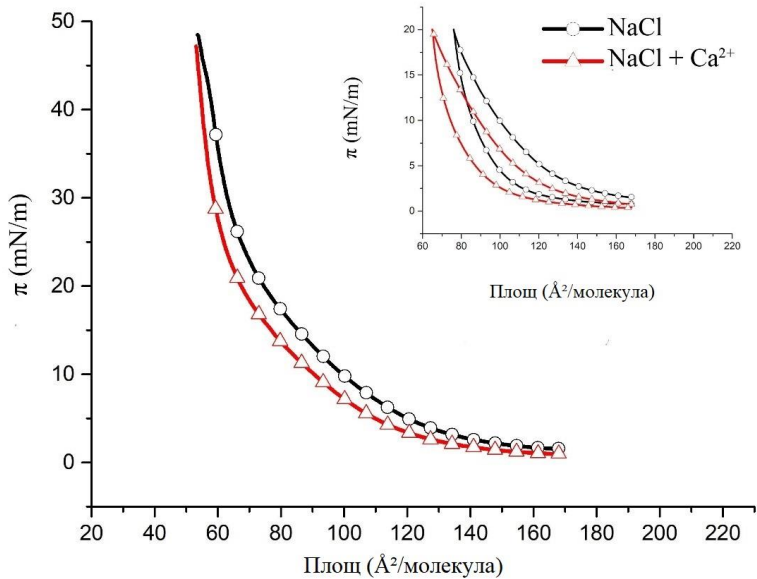
достигат максималните стойности на C_s^{-1} . $C_s^{-1}(\text{max})$ е 56 mN/m за монослоя върху субфаза NaCl и 60 mN/m за монослоя върху субфаза NaCl, допълнен с CaCl_2 , като и двата се разполагат малко над горната граница от 50 mN/m, предложено от Davies и Rideal [16] за фаза LE. Тези стойности са по-високи от $C_s^{-1}(\text{max})$ на hBest1 монослоеве (10.7 mN/m, [24]) и по-ниски от $C_s^{-1}(\text{max})$ на POPC (~110 mN/m, [68]) и на Chol (839 mN/m, [69]), което е индикация за смесване на трите участника в този троичен монослой. Фазовото LE състояние на hBest1/POPC/Chol монослоя и понижената стойност на π_{col} също подсказват за доброто смесване на компонентите от монослоя.



Фигура 10. Модули на повърхностна еластичност C_s^{-1} като функция на повърхностното налягане на тройните монослоеве hBest1/POPC/Chol (1:45:45) върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl с 0,5 μM CaCl_2 (червен) при $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

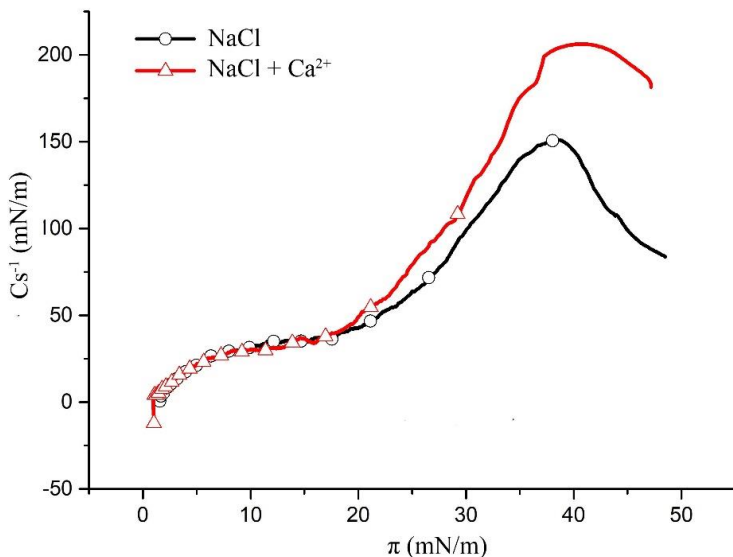
4.1.5. Ефект на Ca^{2+} върху hBest1/SM/Chol Лангмюирови монослоеве

Изотермата на монослоя hBest1/SM/Chol (Фиг. 11) е по-стръмна от тази на монослоя hBest1/POPC/Chol, което предполага, по-кондензирано състояние на тройната система. При сравняване графиките на модула на еластичност това заключение се потвърждава (Фиг. 12). $C_s^{-1}(\text{max})$ за монослоя hBest1/SM/Chol без калциеви йони е 152 mN/m, а с калциеви йони - 206 mN/m, което е съответно 2,7 и 3,5 пъти по-високо от стойността за монослоя hBest1/POPC/Chol и съответства на LC фазово състояние. Свързването с Ca^{2+} оказва значителен кондензиращ и стабилизиращ ефект върху монослоя hBest1/SM/Chol, както се вижда от намаляването на еластичността на монослоя. Индикация за кондензиращия ефект е и площта на хистерезисната бримка при монослоя с Ca^{2+} , която е по-малка от тази без калций. Хистерезисът без калций е по-близък по форма до този на hBest1/SM монослоя [13], докато този с Ca^{2+} е по-сходен по форма на hBest1/Chol монослоя.



Фигура 11. Изотерми на повърхностно налягане/средна молекулна площ на тройните монослоеве hBest1/SM/Chol (1:86:86) върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl, допълнен с 0,5 μ M CaCl₂ (червен) при 35 \pm 2 $^{\circ}$ C (вмъкната графика: π/A цикли на хистерезис на компресия-декомпресия).

Ходът на зависимостите C_s^{-1}/π на Фиг. 12 ясно показва, че монослоевите претърпяват фазов преход от първи род от LE към LC, протичащ при $\pi_{tr} = 20$ mN/m. При $\pi < \pi_{tr}$ стойностите на C_s^{-1} нарастват от 6 mN/m до 46 mN/m (съответстващо на LE фаза), докато при $\pi > \pi_{tr}$, C_s^{-1} нараства много по-рязко и показва стойности типични за LC фаза.



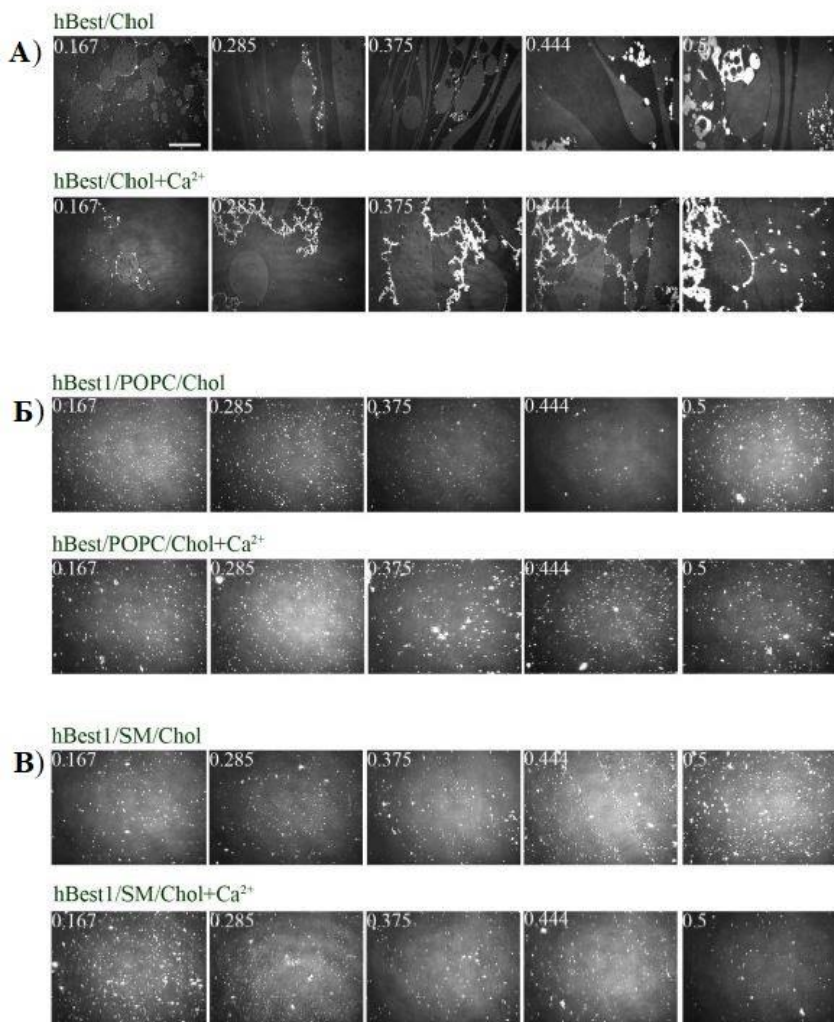
Фигура 12. Модули на повърхностна еластичност C_s^{-1} като функция на повърхностното налягане на тройните монослое $hBest1/SM/Chol$ (1:86:86) върху подложка от 150 mM NaCl (черен) и от 150 mM NaCl, допълнен с 0,5 μM $CaCl_2$ (червен) при $35 \pm 2^\circ C$.

Известно е, че холестеролът образува силно кондензирани монослое в твърдо (S) фазово състояние, с $\pi_{col} \sim 45$ mN/m [69]. Нито един от изследваните тройни монослое не показва наличието на S фазово състояние, следователно молекулите на Chol са добре смесени с другите компоненти на монослоеве. При $35^\circ C$, молекулите на $hBest1$, се самоорганизират в разтеглен монослой на въздушно-водната фазова граница в присъствие и отсъствие на Ca^{2+} йони в рамките на целия процес на свиване, без да достигат колапс [13]. За сравнение, POPC монослоят съществува в LE състояние до достигане на колапс при 46 mN/m [12]. LE състоянието на монослой $hBest1/POPC/Chol$ и намалената стойност на π_{col} показват много добро смесване на компонентите на монослоя (показано по-горе). SM (16:0), използван в това изследване, претърпява фазов

преход от LE към LC при повърхностно налягане $\pi_{tr} = 46,8 \text{ mN/m}$ както върху субфазата с NaCl, така и върху тази с NaCl+Ca [13]. Може да се предположи, че фазовият преход от LE към LC при 20 mN/m , който се получава в изотермата на монослоя hBest1/SM/Chol, произлиза от фазово разделени SM молекули, като значителното намаляване на π_{tr} показва, че това разделяне е само частично.

4.2. Брюстер-ъглова микроскопия на монослоеве hBest/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol. Влияние на концентрация на холестерола.

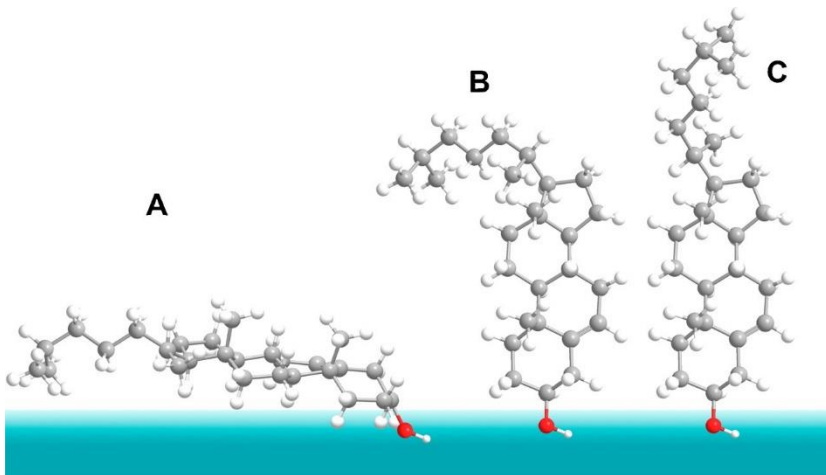
Морфологията на равновесните многокомпонентни монослоеве беше изследвана от ВАМ и представена на Фиг. 13.



Фигура 13. ВАМ изображения на (А) hBest1/Chol монослое, (Б) hBest1/POPC/Chol и (В) hBest1/SM/Chol монослое (при молни части на Chol 0,167; 0,285; 0,375; 0,444 и 0,5) в присъствието или отсъствието на Ca^{2+} , при $35 \pm 2^\circ\text{C}$. За мащаб - бялата лента = 100 μm [70].

Всички снимки на Фиг. 13 показват съвместното съществуване на газова (черни зони) и кондензирана (сиви зони) фаза, което е типично

за Chol, но само при големи молекулни площи и 0 mN/m. Равновесното повърхностно налягане на бинарните монослоеви hBest1/Chol варира между 6 и 13 mN/m, където монослоевите Chol представляват хомогенна кондензирана фаза [71]. Доказано е, че монослоевите hBest1 са компактни и хомогенни от изходното състояние до края на компресията при 20 mN/m [24, 72]. Въпреки това, допълнителна по-кондензирана фаза, характеризираща се с много ярки домени с овална форма, присъства в монослоевите hBest1/Chol и площта, заета от тази фаза, се увеличава с повишаване на моларната част на Chol (Фиг.13А). Калциевите йони предизвикват лека кондензация на монослоевите hBest1, но това не е придружено от появата на ярки домени [24]. Забелязва се, че молекулите на Chol индуцират кондензация на hBest1 монослоя (като е възможно hBest1 да индуцира кондензация на Chol монослоя) и този ефект се засилва от присъствието на Ca^{2+} йони. В предишни изследвания ние доказахме, че Ca^{2+} има кондензиращ ефект върху hBest1 монослоевите и индуцира промени в конформацията и олигомеризацията на белтъчните молекули [24]. Изследвания от последните години показват, че молекулите на Chol в Лангмюирировите монослоеве съществуват в две различни твърди фази, различаващи се по ориентацията на гъвкавата изооктилова верига, прикрепена към C17 - наклонена или вертикална (Фиг. 14) [73]. Може да се смята, че молекулите hBest1 индуцират кондензация на Chol, а йони Ca^{2+} засилват този ефект.



Фигура 14. Фази на холестерола в Лангмюиров монослой при компресия: А – газова фаза; В – твърда фаза с наклонена изооктилова верига; С – твърда фаза с вертикална изооктилова верига.[23, 73].

В предишни изследвания бе показано, че добавянето на Ca^{2+} в субфазата води до малки светли домени с повишена молекулна плътност в РОРС монослоя [12]. От своя страна, добавяне на hBest1 има аналогичен ефект върху монослой от РОРС при молно съотношение 1/45 [12]. Двата ефекта са акумулативни, поради което hBest1/РОРС (1/45) монослоя в присъствие на Ca^{2+} образува по-голям брой светли домени [12]. Изображенията на Фиг. 13Б показват, че добавянето на Chol в различни молни съотношения към бинарния hBest1/РОРС монослой не води до промяна на морфологията. Бяха забелязани същите многобройни светли домени с относително сходни размери, равномерно разпределени в хомогенната кондензирана фаза.

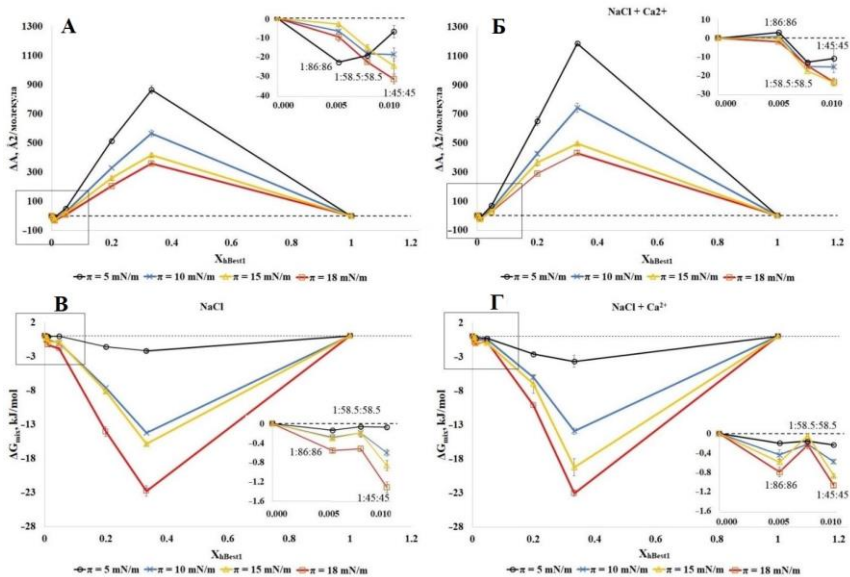
Доказано е, че бинарните монослоеве hBest1/SM (молекулно съотношение 1/86, $X_{\text{hBest1}} = 0.011$) са компактни и хомогенни при $\pi = 15$ mN/m [13]. Изображенията на Фиг. 13В демонстрират кондензиращия ефект на Chol върху монослоеве hBest1/SM (1/86), изразен чрез

образуването на множество малки ярки домени от силно кондензирана фаза, равномерно разпределени в компактния хомогенен монослой.

Получените чрез ВАРМ изображения показват връзката между морфологията на монослоя и получените изотерми. Наблюдаваните от изотермите и модулите на еластичност физикохимични промени отговарят на характерно разположение на молекулите в монослойните моделни системи и съответстват на специфична морфология.

4.3. Смесваемост на hBest1 с двукомпонентни липидни монослоеве (ΔA и ΔG)

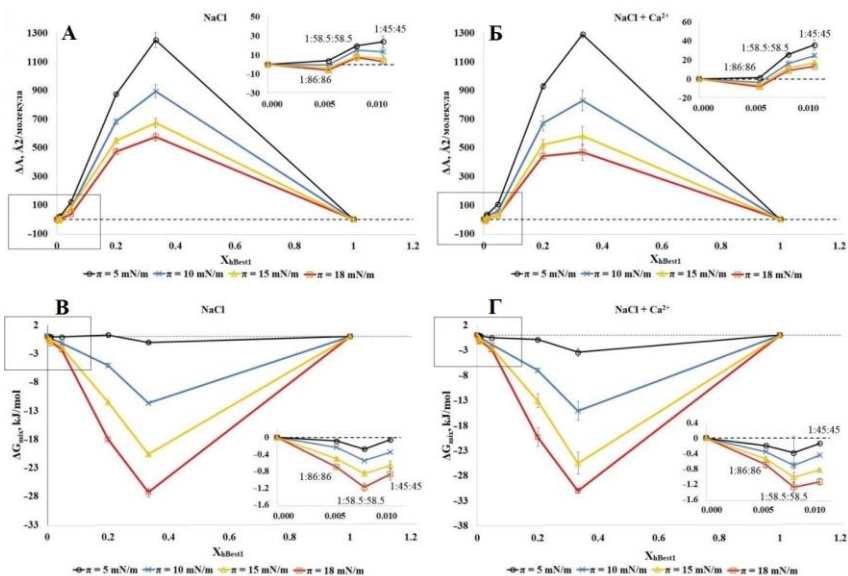
За да може да се направи термодинамичен анализ на степента на смесваемост между hBest1 и липиди (POPC, SM и Chol) в тройни монослоеве, бяха получени изотерми с различни моларни съотношения hBest1/липиди, както следва: 1:86:86 ($X_{\text{hBest1}} = 0,006$); 1:58,5:58,5 ($X_{\text{hBest1}} = 0,0085$); 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 ($X_{\text{hBest1}} = 0,33$), поддържайки еквимоларното съотношение между двата липида, както в тензиометричните експерименти, описани по-горе. Освен използваните досега съотношения (1:86:86, 1:58.5:58.5 и 1:45:45) бяха получени изотерми и от съотношения с по-висока молна част на белтъка с цел да се добие представа за изменението на параметрите в системата и при относително високи количества белтък. На базата на изотермите бяха изчислени ΔA и ΔG_{mix} параметрите на взаимодействията между белтъчния и липидния компоненти. Отклоненията на площта на монослоеве hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol, образувани в отсъствието и присъствието на Ca^{2+} йони, при четири различни повърхностни налягания под π_{cr} , са представени на Фиг. 15 и Фиг. 16, съответно.



Фигура 15. Графики на отклонението на площта от адитивната линия (ΔA) (А и Б) и общата свободна енергия на смесване (ΔG_{mix}^T) (В и Г) спрямо състава на филма (X_{hBest1}) при различни повърхностни налягания, от hBest1/ПОРС/Chol монослой върху подложка от 150 mM NaCl (А и В) и от 150 mM NaCl, допълнен с 0,5 μ M CaCl₂ (Б и Г) при 35±2°C (вмъкнати графики: уголемяване на полето в рамката).

Независимо от повърхностното налягане и наличието на Ca²⁺, ΔA на монослоеве hBest1/ПОРС/Chol има отрицателни или нулеви стойности при $X_{hBest1} < 0,02$, съответстващи на биологично релевантните условия в клетъчната мембрана, и положителни стойности при $X_{hBest1} > 0,02$ (Фиг. 15). Стойностите на ΔA на монослоеве hBest1/SM/Chol са положителни, с изключение на тази при $X_{hBest1} = 0,006$, който осцилира около нула (Фиг. 16). Отрицателните стойности предполагат, че в тройните монослоеве hBest1/ПОРС/Chol взаимодействията на привличане между hBest1 и липидните молекули са по-силни от взаимодействията hBest1-hBest1 и липид-липид, като по този начин уплътняват филма и увеличават смесваемостта. Положителните

стойности на ΔA са резултат от по-силното привличане между подобни hBest1-hBest1 и липидно-липидните молекули в сравнение с привличането между hBest1 и липидите, което предполага фазово разделяне между hBest1 и липидите в монослоеве. Стойностите на ΔA , които лежат на адитивната линия, предполагат сходна сила на взаимодействие между всички молекули, отнасяща се до смесване или пълно фазово разделяне на компонентите на монослоя. Колкото по-високо е съдържанието на белтък, толкова по-голямо е положителното отклонение от идеалното смесване и по-висока вероятността за фазово разделяне на компонентите. Това отклонение е най-силно изразено при ниско повърхностно налягане. Уплътняването на монослоеве, придружено от повишаване на повърхностното налягане, значително намалява отклонението на експерименталните молекулни площи от адитивните, което предполага по-добро смесване на компонентите. Добавянето на Ca^{2+} йони увеличава ΔA , което показва по-изявено разделяне в сравнение с монослоя без Ca^{2+} .



Фигура 16. Графики на отклонението на площта от адитивната линия (ΔA) (А и Б) и общата свободна енергия на смесване (ΔG_{mix}^{π}) (В и Г) спрямо състава на филма (X_{hBest1}) при различни повърхностни налягания, от hBest1/SM/Chol монослой върху подложка от 150 mM NaCl (А и В) и от 150 mM NaCl, допълнен с 0,5 μ M CaCl₂ (Б и Г) при $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (вмъкнати графики: уголемяване на полето в рамката).

За да анализираме π/A изотермите на тези две троични системи по метода на Goodrich [74] и да изчислим общата свободна енергия на смесване ΔG_{mix}^{π} , разгледахме системата като двоична, в която един от компонентите е hBest1, а другият е липидната смес (POPC/Chol и SM/Chol). Методът на Гудрич е изведен за двукомпонентна система и бе необходимо липидният компонент да се приеме като единичен, тъй като уравненията не дават възможност да се отчете суперпозиция между три различни молекулни вида. Основание за това е факта, че еквимоларните POPC/Chol и SM/Chol монослоеве са много стабилни, с висок афинитет, силни взаимодействия и особено благоприятно разположение на двата

типа липидни молекули [18], което позволява изследване на ефекта на включване на белтъка hBest1 в тези два липидни монослоя.

Отрицателните стойности на $\Delta G_{\text{mix}}^{\pi}$ на монослоевите hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol показват, че тройните монослоеве са по-стабилни от единичните hBest1 и липидните монослоеве, следователно смесването на hBest1 и липидните молекули е спонтанен и термодинамично изгоден процес, който се проявява по-силно при увеличаване на моларната част на hBest1 и повърхностното налягане, но се влияе по-слабо от добавянето на Ca^{2+} (Фиг. 15 и 16). В предишни изследвания с бинарни hBest1/POPC и hBest1/SM монослоеве, нашият научен екип доказва разделяне на фазите между POPC и hBest1 и спонтанно смесване между SM и hBest1 [12, 13]. Представените тук резултати показват, че ефектът на холестерола върху смесимостта и фазовото разделяне в тройните филми е значителен. Холестеролът подобрява смесването и стабилността във филмите hBest1/POPC/Chol чрез намаляване на фазовото разделяне между hBest1 и POPC, докато в hBest1/SM/Chol филмите се поддържа смесваемост, макар и с увеличаване на $\Delta G_{\text{mix}}^{\pi}$.

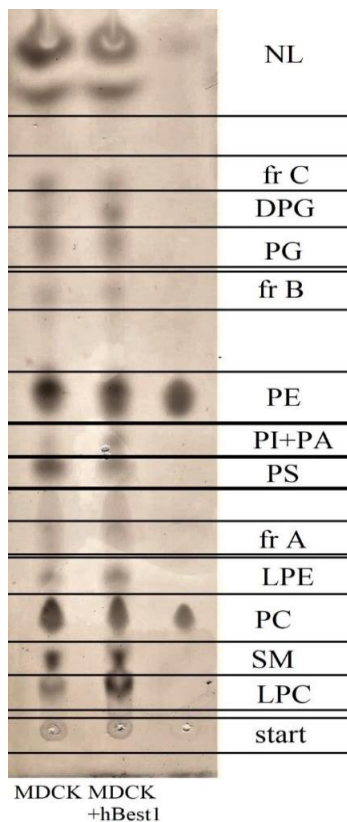
Добавянето на холестерол води до отчитане на отрицателните стойности на $\Delta G_{\text{mix}}^{\pi}$ на тройните филми, т.е. холестеролът повлиява силата на междумолекулните взаимодействия между hBest1 и липидната смес POPC/Chol, както и между hBest1 и сместа SM/Chol и подобрява смесимостта на белтъка с тези липиди. Уравновесяването на смесимостта или фазовото разделяне между hBest1 и липидните молекули има пряк ефект върху свързването на белтъка с липидните рафтове [13], структурата му като трансмембранен белтък, неговата конформация и функция на йонен канал.

4.4. Влияние на hBest1 върху липидния състав на трансфектирани с *BEST1* клетки.

Изследванията върху взаимодействията на пречистени hBest1 и липидни компоненти в моделни мембранни системи е основата за определяне на междумолекулните взаимодействия и евентуалното структуриране на биологично активен трансмембранен йонен канал в мембраните на живи клетки. Като мембранен белтък, правилната конформация и функция на hBest1 е силно зависима от липидния състав. Беше определен качествения състав на липидите в клетъчните мембрани на трансфектирани с hBest1 MDCKII клетки и бе сравнен с този на нетрансфектираните MDCKII клетки (Фиг. 17). Наблюдават се ясно изразени качествени разлики в няколко ключови фракции. В липидния екстракт от нетрансфектираните MDCKII клетки се наблюдава по-висок относителен дял на неутралните липиди (NL – 20% повече), фосфатидилсерин (PS, 33% повече), фосфатидилхолин (PC, 13% повече), както и на неизвестната фракция C (fr C, 53% повече). При трансфектираните клетки се определят по-големи количества от смесената фракция фосфатидилинозитол и фосфатидат (PI+PA, 90% повече), кардиолипин (DPG, 75% повече), както и лизолипидите лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилетаноламин (LPC, 42% повече и LPE, 33% повече) и неопределената фракция A (fr A, 25% повече). Беше сравнена площта и интензитета на оцветяване на всяка фракция със съответната от контролната клетъчна линия. Резултатите на Фиг. 18 обобщават относителния дял на всеки липид от съответната фракция, приемайки сумата от двете фракции като едно цяло, което представя приблизителна оценка за присъствието на даден липид в мембраните на различните клетъчни линии и какво е влиянието на трансфектирания hBest1 върху състава им.

Получените резултати на Фиг. 18 потвърждават наблюденията от тънкослойната хроматография, като основните разлики са в количествата на ламеларните PC и PS и неламеларните PA, LPC и LPE. Едно от свойствата на hBest1 е свързано с т.нар. процес на „флуидизиране“ на клетъчната мембрана – от една страна той се разполага в течно-неподредената фаза в мембраната, а от друга – наличието му в мембраната увеличава площта на течно-неподредената фаза в мембраната за сметка на течно-подредената [13]. Този ефект на бестрофина се потвърждава от получените резултати за мембрания липиден състав на двете клетъчни линии – при експресиращите hBest1 MDCKII клетки, се наблюдава по-голямо количество неламеларни липиди, които водят до флуидизиране на мембраната и увеличаване на течно-неподредената фаза в нея. Характерно е, че наличието на hBest1 в мембраната не само води до промяна на латералното разположение на

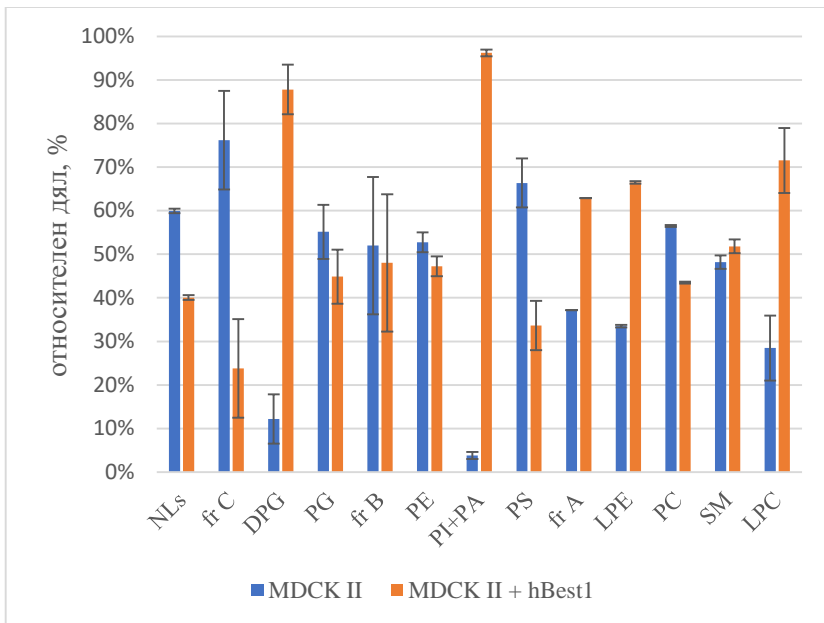
липидите в нея, но също така повлиява клетъчния метаболизъм, като увеличава скоростта на синтеза на неламерарни фосфолипиди.



Фигура 17. TLC на липидни екстракти от MDCKII и MDCKII-hBestI клетки.

Легенда:

NL – неутрални липиди; fr C – неизвестна фракция C; DPG – кардиолипин; PG – фосфатидилглицерол; fr B – неизвестна фракция B; PE – фосфатидилетаноламин; PI – фосфатидинозитол; PA – фосфатидна киселина; PS – фосфатидилсерин; fr A – неизвестна фракция A; LPE – лизофосфатидилетаноламин; PC – фосфатидилхолин; SM – сфингомиелин; LPC – лизофосфатидилхолин.



Фигура 18. Относителен дял на липидите в MDCKII и MDCKII-hBest1 клетки от всяка получена TLC фракция.

Съществува определена разлика в количеството на основните фосфолипиди - фосфатидилетаноламин и фосфатидилхолин в MDCKII (в които hBest1 не е експресиран) и RPE клетките (в които hBest1 е ендогенно експресиран) – 58% PC и 28% PE в MDCKII и около 20% PC и 67% PE в RPE [75, 76]. Имайки предвид, вече доказаното акумулиране на нестерифициран холестерол в RPE при развитие на BVMD [77], може да се търси връзка между промяната на липидния метаболизъм и развитието на патологично състояние. Характерно за холестерола е заемането на свободните обеми, които се създават между липидните молекули в течно-неподредена фаза [78]. Натрупването на холестерол може да доведе до по-висока подреденост и намаляване площта на течно-неподредената фаза, респективно до промяна на функциите на мембранните белтъци.

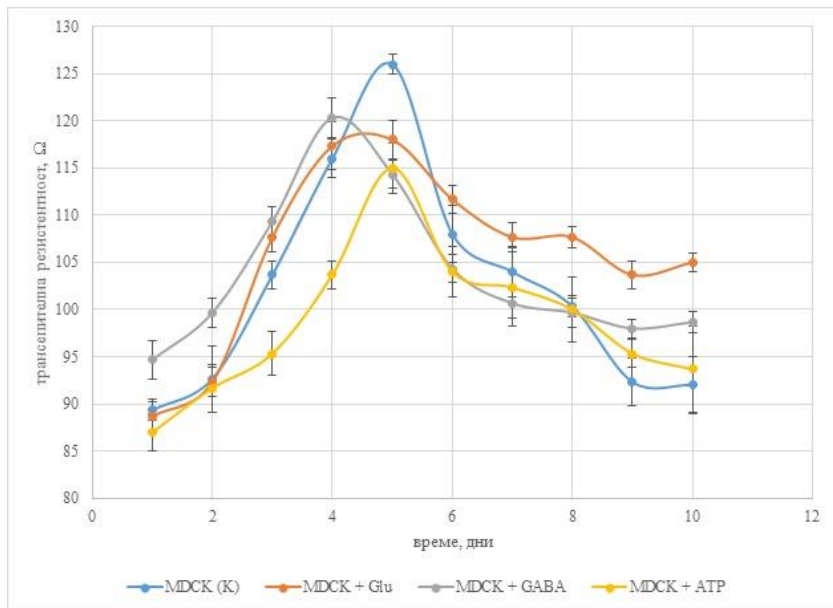
Това насочва вниманието към евентуалната връзка между мутациите в *BEST1* и потенциалната им роля върху промяната на свойствата на белтъка и способността да ремоделира мембраната. Изследванията в тази област убедително доказват значението на липидните рафтове и промяната на фазата на мембраната при отключването и развитието на различни невродегенеративни състояния [79]. Ролята на hBest1 при патологични състояния, доказва, че свойствата на hBest1 (например свързани с увеличаване на неподредената фаза в мембраната) повлияват както структурните и функционалните характеристики на мембраните, така и липидния метаболизъм.

4.5. Влияние на hBest1 върху трансепителната резистентност на MDCKII клетките при наличие на Glu, GABA, ATP, PLA₂

4.5.1 Промяна на трансепителна резистентност на трансфектирани с *BEST1* и нетрансфектирани MDCKII клетки в присъствие на Glu, GABA, ATP

Функционалната активност на hBest1, взаимодействията с глутамат (Glu), γ -аминобутират (GABA) и аденозинтрифосфат (ATP), както и ефекта върху клетъчната поляризация, бе определяна чрез измерване на трансепителната резистентност (TER) на трансфектираните и нетрансфектирани клетки с добавяне на съответния компонент в хранителната среда. За сравнение бяха използвани нетретираните контролни серии от двете клетъчни линии, като получените данни кореспондират с предишни резултати на научния екип [80]. На Фиг. 19 са сравнени резултатите за нетрансфектираните клетки които показват отчетливо понижаване на пиковете на TER при добавените компоненти в сравнение с контролата. Единствено GABA предизвиква по-високи стойности на TER още на първия ден и по-бързо достигане на максимум

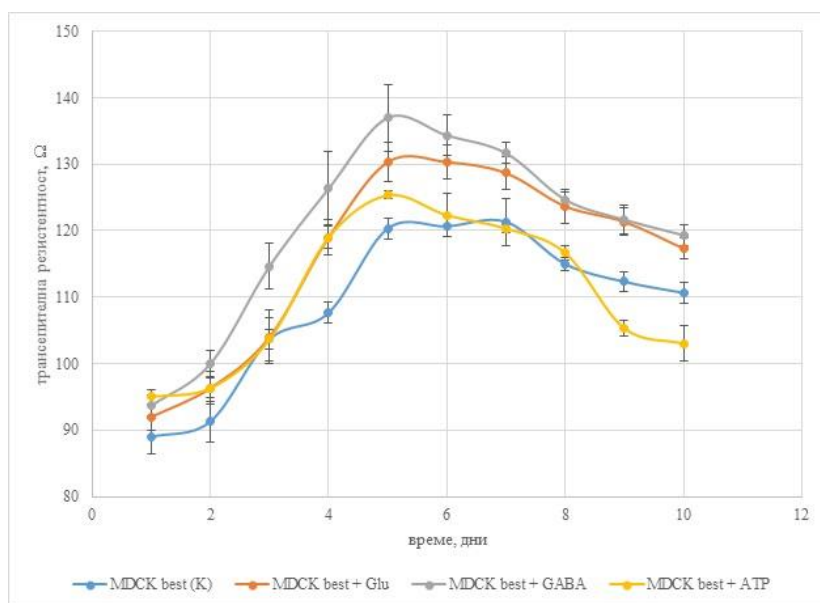
в TER (TER_{max}). При клетките третирани с Glu се установява, че след като достигнат TER_{max} , и двете клетъчни линии поддържат по-високи стойности на TER в сравнение с контролите.



Фигура 19. Промяна на TER при MDCKII клетки, инкубирани с АТФ, глутамат и GABA за 10 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm SE, $n = 3$.

За разлика от нетрансфектираните, при MDCKII-hBest1 клетките се забелязва по-ранно достигане на TER_{max} при всички експериментални серии (5-6 ден) в сравнение с контролната (7 ден) (Фиг. 20). Наличието на Glu и GABA в хранителната среда води до значително повишаване на TER_{max} като в тези случаи стойностите на TER остават по-високи от другите серии до края на експеримента. Високите стойности на TER предполагат, че Glu и GABA водят до намаляване на активността на hBest1 като йонен канал, респективно понижаване на проводимостта на клетъчния слой и увеличаване на съпротивлението. Това важи в по-голяма степен за GABA, тъй като за разлика от MDCKII-hBest1,

третираните с GABA нетрансфектирани клетки в последните дни от измерването показват стойности на TER близки до контролната серия. Също така, в сравнение с всички останали серии, клетките с ATP показват най-ниски стойности на TER в края на експеримента. Това може да е резултат от свързването на hBest1 с ATP и активирането на белтъка [94], като по този начин увеличеният поток на йони през клетката намалява съпротивлението на клетъчния слой.



Фигура 20. Промяна на TER при MDCK-hBest1 клетки, инкубирани с ATP, глутамат и GABA за 10 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm SE, n = 3.

Интересно е да се отбележи, че въпреки активиращия ефект на ATP върху hBest1 [81], TER на трансфектираните клетки е по-висока през първите 5 дни от измерването като при дни 6-8 е съизмерима и намалява спрямо контролните клетки чак през дни 9-10. При нетрансфектираните

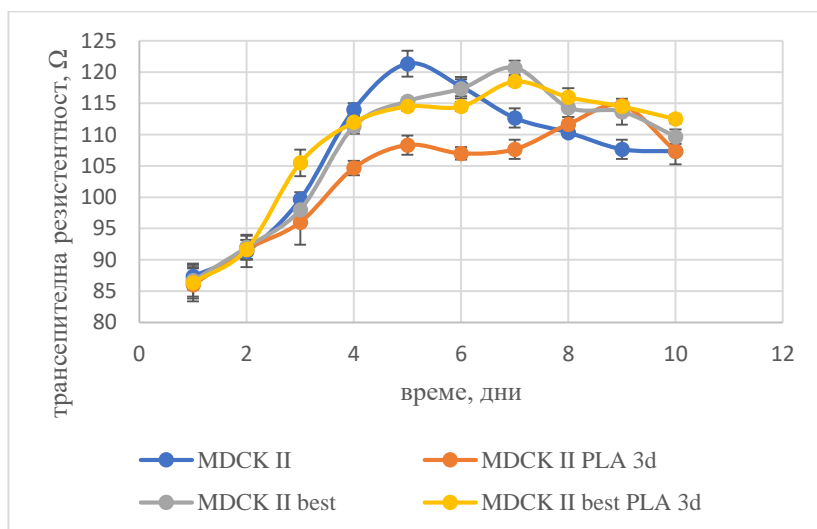
клетки добавянето на АТФ в средата не предизвиква по-бързо достигане на TER_{max} (5-ти ден и за контролната серия, и за тази с АТФ). Също така стойностите на TER остават по-ниски от тези на нетретираните клетки за всеки от дните до достигане на TER_{max} .

4.5.2 Промяна на трансепителна резистентност на трансфектирани с *BEST1* и нетрансфектирани MDCKII клетки при наличие на PLA_2

Ензимите PLA_2 (EC 3.2.1.4) имат огромно значение за реорганизацията, ремоделирането и функционалната активност на клетъчните мембрани, като при RPE клетките PLA_2 участва активно в разграждането на външните фоторецепторни сегменти [82]. За да се изследва значението на *hBest1* за TER при условия, водещи до ремоделирането на клетъчната мембрана, MDCKII клетки (трансфектирани и нетрансфектирани) бяха третирани с PLA_2 в различни етапи от развитието на монослоя – при достигане на 100% конфлуентност и при достигане на TER_{max} .

В първия случай – третиране на нетрансфектираните клетки при достигане на пълна конфлуентност (3-ти ден и при двете клетъчни линии) с PLA_2 за 15 минути – се наблюдава силно ензимно въздействие върху нетрансфектираните клетки (Фиг. 21). Стойностите на TER , измерени след третирането с PLA_2 са значително по-ниски от тези в контролната серия, а TER_{max} се достига едва на 9-тия ден от провеждането на експеримента. В сравнение с контролите, трансфектираните клетки показват незначителни разлики в промяната на TER и TER_{max} се достига по същото време (ден 7), както при нетретираните клетки. Намалената TER при нетрансфектираните клетки се дължи на активността на PLA_2 и пермеабилзацията на мембраната. За разлика от тях, MDCKII-*hBest1*

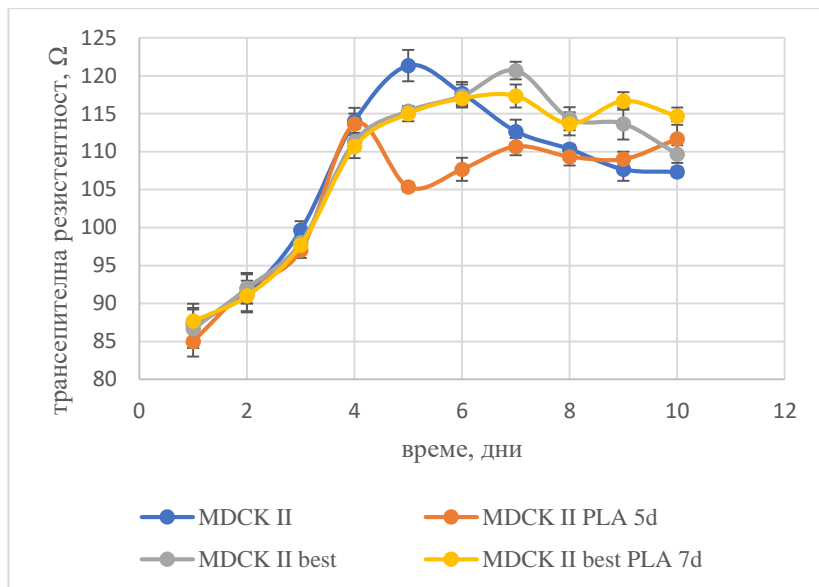
клетките са по-устойчиви на влиянието на PLA₂, което може да се дължи на пониженото количество фосфатидилхолин (установено по-горе) и повишеното количество лизолипиди, спрямо които PLA₂ не проявява активност (незначителна при условията на експеримента). Като резултат от действието на PLA₂ върху мембраната е увеличаването на течноподредената фаза и намаляване на течноподредената [83, 84]. Тази промяна във фазовото състояние на мембраната предполага промяна в структурата и функцията на hBest1, който се разполага основно в неподредената фаза.



Фигура 21. Промяна на TER (определена за 10 дни) при MDCK и MDCK-hBest1 клетки, инкубирани с 2mM sPLA₂ за 15 минути в деня на достигане на 100% конfluентност (ден 3). Резултатите са представени като средна стойност ± SE, n = 3.

Във втория случай, третирането на клетките с PLA₂ за 15 минути в деня на достигане на TER_{max} (5-ти ден за MDCKII и 7-ми ден за MDCKII-hBest1) се установяват минимални промени в трансфектираните клетки (в деня на третиране) (Фиг. 22). В допълнение, третираните

клетките достигат по-високи стойности на TER (115 Ω) в края на експеримента (10 ден) в сравнение с тези от контролната серия (110 Ω). При нетрансфектираните клетки, стойностите на TER рязко намаляват в деня на третирането (от 121 на 105 Ω), като се възстановяват и достигат нивата на тези от контролните клетки едва на 7-мия ден.

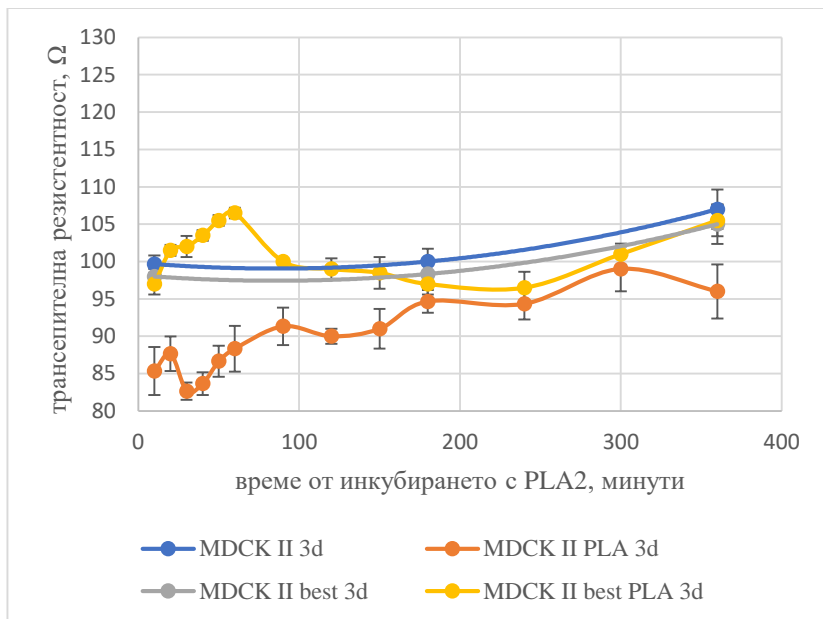


Фигура 22. Промяна на TER (определена за 10 дни) при MDCK и MDCK-hBest1 клетки, инкубирани с 2мМ sPLA₂ за 15 минути в деня на достигане на TER_{max}. Резултатите са представени като средна стойност \pm SE, n = 3.

4.5.3 Промяна на трансепителна резистентност на трансфектирани с *BEST1* и нетрансфектирани MDCKII клетки при наличие на PLA₂ в първите 6 часа от третирането

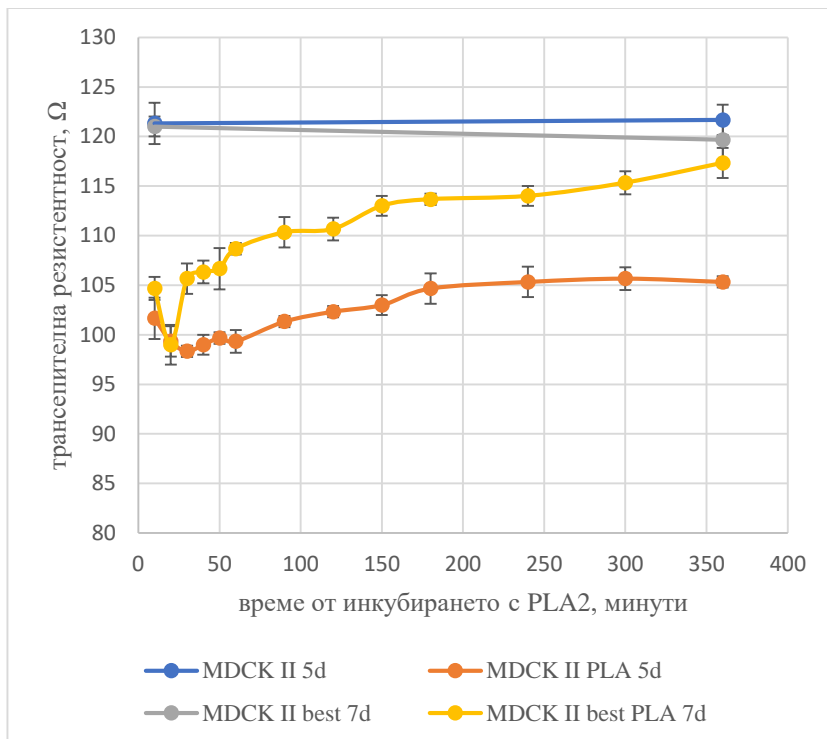
Ензимното действие на PLA₂ върху клетки бе установено кинетично, както е показано в [85], промяната на TER бе проследена до 6 часа от самото третиране. Значително понижаване в стойностите на TER бе установено още в първите 30 минути след третирането на

конфлуентни MDCKII клетки за 15 минути. След първоначалното понижаване на TER, следва възстановяване на мембраните, детектирано чрез постепенно нарастване и възстановяване на TER (Фиг. 23). Това може да се обясни с потенциални нарушения в мембраната, предизвикани от действието на PLA₂ и повишаване пропускливостта за йони, които с времето се възстановяват. До 6-тия час от експеримента, измерената TER остава значително по-ниска в сравнение с тази на нетретирани клетки. Въздействието на PLA₂ върху TER през първите 2 часа има обратен ефект при MDCK-hBest1 клетките. TER се повишава до 60 минута, като след това до 4-ия час стойностите се понижават. До края на експеримента тенденцията се променя и стойностите на TER достигат тези измерени за контролните трансфектирани клетки. В този случай ефектът на PLA₂ се изразява в повишаване на TER, което може да се свърже/асоциира с намаляването на функциите на йонните канали в мембраната, включително hBest1. PLA₂ увеличава течно-подредената фаза в мембраната (което намалява пермеабилитета) и е възможно този ефект инхибира функцията на hBest1, който се разполага преференциално в течно-неподредената фаза.



Фигура 23 Промяна на TER (определена за 350 минути) при MDCK и MDCK-hBest1 клетки, инкубирани с 2мМ sPLA₂ за 15 минути в деня на достигане на 100% конфлуентност (ден 3). Резултатите са представени като средна стойност ± SE, n = 3.

При третиране на клетките от двете линии с PLA₂ в деня на достигане на TER_{max} (5-ти ден за MDCKII и 7-ми ден за MDCKII-hBest1), стойностите на TER в рамките на първите 20 минути от третирането намаляват в сравнение с контролните клетки и при двете линии (Фиг. 24). При нетрансфектираните клетки, след 30 минута до края на експеримента (6-ти час), промените в стойностите на TER са незначителни и не достигат стойностите за нетретираните клетки. При MDCK-hBest1 клетките, след 30 минута стойностите на TER се променят постепенно и в края на експеримента се доближават до тези измерени за нетретираните с PLA₂ трансфектирани клетки.



Фигура 24. Промяна на TER (определена за 350 минути) при MDCK и MDCK-hBest1 клетки, инкубирани с 2мМ sPLA₂ за 15 минути в деня на достигане на TER_{max}. Резултатите са представени като средна стойност ± SE, n = 3.

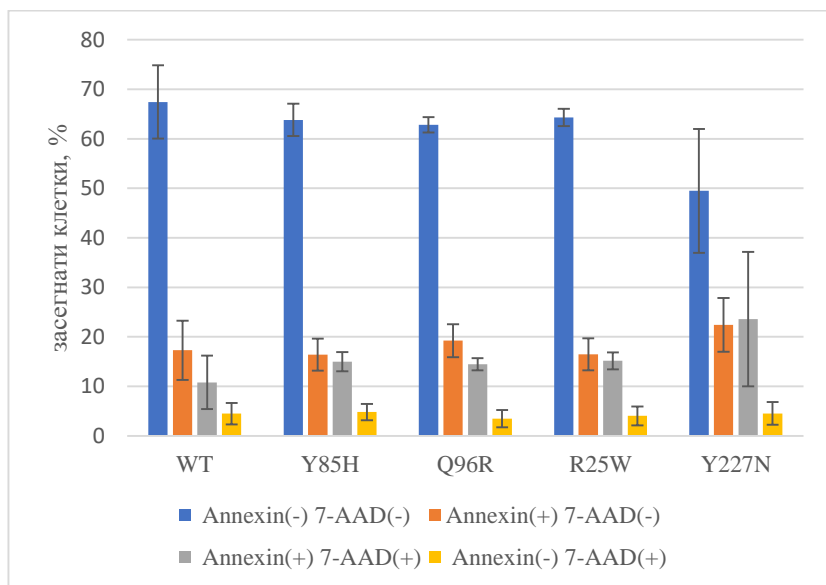
Получените резултати за влиянието на PLA₂ върху трансепителната резистентност на клетките от двете линии ясно показват, че трансфектираните клетки са по-устойчиви на въздействието на PLA₂. Третирането в деня на достигане на 100% конфлуентност разликите са най-отчетливи при двете линии – при MDCK има понижаване на TER, докато при трансфектираните клетки TER се повишава. Също така, нетрансфектираните клетки достигат TER_{max} по-късно (от 5-ти ден за контролните на 9-ти ден за третираните клетки), докато MDCKII-hBest1 клетките достигат TER_{max} по едно и също време с

контролите (7-ми ден). Влиянието на PLA₂ е по-силно изразено при третирането на клетките в деня на достигане 100% конfluентност, околното в деня на достигане на TER_{max}. Тези експерименти индиректно показват значението на мембранните реорганизации за структурирането и функцията на hBest1.

4.6. Влияние на мутантни форми на hBest1 върху MDCKII клетки

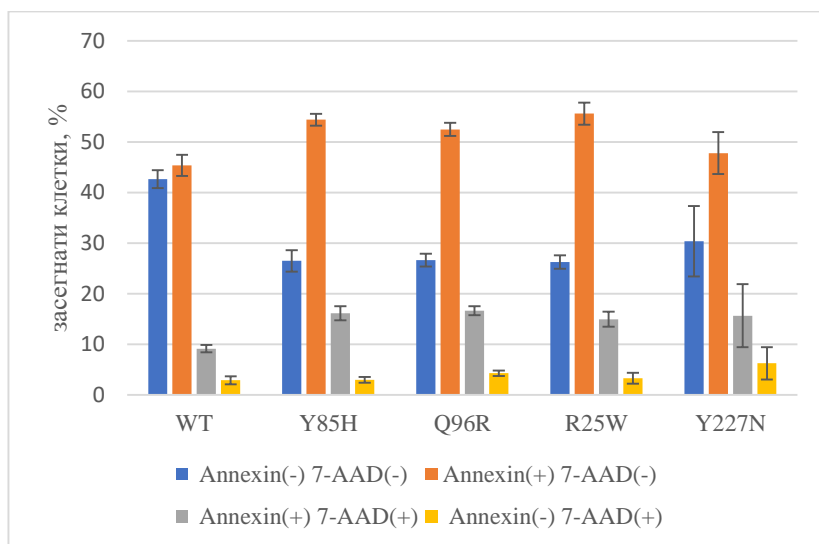
След опити за стабилна трансфекция на MDCKII клетки с мутантни форми на бестрофин бе установено, че клетките отмират в рамките на 2 седмици след пресяването им в селективна среда. Добавянето на 4-фенилбутират (молекулен/химичен шаперон, който има приложение в защитата на нервните и ретиналните клетки от фотострес [86]) и бортезомиб (протеазомен инхибитор, използван при терапии на невродегенеративни заболявания [87]) не доведе до по-добра преживяемост на клетките и до получаване на стабилна линия. Изследванията показват успехи при повишаване ефективността на експресията на L41P, R141H, R202W и M325T мутантни форми на бестрофин в транзитна трансфекция на MDCKII клетки с използването на 4-фенилбутират и бортезомиб [88]. Тези мутанти предизвикват ARB и се характеризират с намален транспорт на Cl⁻ в сравнение с нормалния hBest1 като сред тях единствено L41P се локализира в мембраната [89]. За нашите експерименти бяха подбрани Y85H, Q96R, R25W и Y227N мутантни форми на hBest1, които се свързват с развитие на BVMD и са в или в близост до потенциален базолатерален сортираш мотив [90-92]. Нашите опити за получаване на стабилни линии с помощта на гореспоменатите молекулни шаперони, не отбелязаха успех и MDCKII клетките не показаха жизненост, а отмираха в рамките на няколко дни като не преодоляваха етапа на селекция. За да се оцени преживяемостта

на клетките бе измерена степента на апоптоза с помощта на поточен цитометър easyCyte (Luminex) и кит GUAVA Nexin Reagent. При измерване на нивото на апоптоза в момента на пресяване в селективната среда, се забелязва най-висока преживяемост (около 75%) при клетките, трансфектирани с див тип hBest1 (WT) (Фиг. 25). С най-високи нива на апоптоза са Y227N мутантите, при които се забелязва най-малък дял оцелели клетки (Annexin(-) 7-AAD(-) и най-голям дял клетки в ранна (Annexin(+) 7-AAD(-), около 28%) и късна апоптоза (Annexin(+) 7-AAD(+), около 38%). Доказано е, че тази мутация води до нарушено сортиране на бестрофин-1 в RPE клетките [93] и токсичният ефект на мутантния белтък се проявява непосредствено след трансфекцията.



Фигура 25. Нива на апоптоза в различни етапи след трансфекция на MDCKII клетки с див тип hBest1 и мутантни форми. Етапите на апоптоза са както следва: незасегнати клетки – Annexin(-) 7-AAD(-), клетки в ранна апоптоза – Annexin(+) 7-AAD(-), клетки в късна апоптоза - Annexin(+) 7-AAD(+), клетъчни останки (дебри) – Annexin(-) 7-AAD(+).

Това измерване бе повторено на 3-тия ден след прехвърляне на клетките в селективната среда съдържаща G418 (Фиг. 26). Отново трансфектираните с WT hBest1 показват най-голямо количество незасегнати клетки ~40%. При всички трансфекции с мутанти незасегнатите клетки са под 30%. Също така при тях се наблюдават по-висок дял клетки в ранна апоптоза (над 50%) и два пъти повече клетки в късна апоптоза (около 15-20%). Количеството на клетъчните останки (Annexin(-) 7-AAD(+)) е съизмеримо при всички серии с изключение на Y227N, където този дял е около 2 пъти по-голям (до 10%). Видимо е токсичното действие на мутантните белтъци, като най-силна цитотоксичност проявява hBest1-Y227N. Тази ранна проява на токсичност (още при 3-тия ден от селекцията) направи невъзможно получаването на стабилна клетъчна линия при тези условия.



Фигура 26. Нива на апоптоза в различни етапи 3 дни след поставяне в селективна среда на MDCKII клетки с див тип hBest1 и мутантни форми. Етапите на апоптоза са както следва: незасегнати клетки – Annexin(-) 7-AAD(-), клетки в ранна

апоптоза – Annexin(+) 7-AAD(-), клетки в късна апоптоза - Annexin(+) 7-AAD(+), клетъчни останки (дебри) – Annexin(-) 7-AAD(+).

Флуоресцентно маркиране на hBest1 в транзитно трансфектирани с Y85H, Q96R и Y227N мутантни форми на белтъка МДСКII клетки показва промяна на разположението/локализирането на белтъка [94]. Чувствително по-високо количество от мутантните форми се експресира апикално в сравнение с дивия тип hBest1, който се разполага базолатерално. Изследване на апикалната мембрана на МДСКII клетки с използване на вируси показва, че в апикалната мембрана има по-малко сфингомиелин и фосфатидилетаноламин и повече фосфатидилхолин като процентно съотношение от останалите липиди в изолираната мембрана [95]. Насочването на hBest1 към апикалната мембрана може да доведе до липиден дисбаланс и промяна на фазовия профил на мембраната, което да предизвика дисфункция на апикалната мембрана. Предвид токсичното действие на тези мутантни форми на белтъка, не е изключено развитието на патологията да е свързано именно с промяната на фазовото състояние на апикалната мембрана под действие на бестрофина. Може да се търси връзка между обмяната на йони и дегенерацията на ретината, но е очевидно, че мутантните форми на белтъка проявяват цитотоксично действие и в *in vitro* условия (Фиг. 26). Този ефект е най-отчетлив при мутант Y227N. Доказано е, че тирозин 227 (Tyr227, Y227) е важен за базолатералното насочване [93] и при транзитна трансфекция апикалната експресия на Y227N мутанта се увеличава двойно в сравнение с дивия тип [94]. От представените на Фиг. 25 резултати се вижда ясно, че този мутант (от всички изследвани) индуцира най-високи нива на цитотоксичност след трансфекция. Псевдофосфорилиране на Tyr 227 (перманентно активен мутант Y227E) също води до апикално насочване, докато перманентно деактивирания мутантен бестрофин Y227F се експресира базолатерално

(няма промяна в сортирането). Това показва, че насочването на hBest1 може да има връзка с нивото на фосфорилиране на белтъка при Тур 227.

Аргинин 25 (Arg25, R25) се разполага в близост до N-края на белтъка, не е част от сортиращ сигнал, но е в близост до потенциален сортиращ сигнал и замяната на тази аминокиселина с друга също може да окаже влияние върху конформацията и насочването. При замяна на Arg25 (положително зареден) с хидрофобния триптофан (Trp, W) апикалната експресия на бестрофин се увеличава от 10% на 16% [96]. Разположението на белтъка в мембраните се определя от всички негови физикохимични и биохимични характеристики, като промяната на разтворимостта на белтъка (заместването на хидрофилна заредена аминокиселина с хидрофобна) силно повлиява взаимодействието с мембраната. Според двата модела – на Milenkovic и Tsunenari – Arg25 се разполага в директна близост до вътрешния монослой на мембраната. Заместването с Trp може да промени разположението на белтъка в мембрания бислой и/или да промени конформацията на белтъка, за да обезпечи хидрофобните взаимодействия с бислоя. Подобно развитие се наблюдава при D240I (Asp-Ile) мутация в трансмембрания лактозен транспортер LacY [97]. От друга страна, тази замяна на Asp (D)240 с изолевцин (Ile, I) може да индуцира преструктуриране на липидите в мембраната и промяна на липидния метаболизъм [98], включително до степен, в която оказва влияние на липидния състав на мембрани в различни клетъчни органели [99].

Проведените изследвания обобщават цитотоксичното действие на изследваните от нас мутантни форми на бестрофин върху MDCKII клетките, като от използваните мутанти най-силна токсичност се наблюдава при трансфекция с Y227N. Получените резултати показват силната зависимост на структурата, правилното насочване и

функционалната активност на hBest1 от функционално активния фолдинг на молекулата, което налага допълнителни изследвания свързани с изучаването на свойствата на тези мутантни форми. Това създава предпоставки за търсене на алтернативни подходи при оптимизирането на етапите на трансфекция и селекция с цел повишаване на преживяемостта на трансфектираните клетки и установяването на линия, стабилно експресираща мутантен бестрофин-1.

5. Изводи

На база на проведените експерименти и получените резултати могат да бъдат направени следните изводи:

1. Включването на холестерол в бинарния hBest1/SM монослой води до понижаване на подредеността на монослоя, но не променя подредеността на hBest1/POPC монослоя.

2. Включването на холестерол в бинарните hBest1/POPC и hBest1/SM монослоеве изравнява смесваемостта на hBest1 в POPC и SM монослоеве.

3. Включването на холестерол оказва влияние върху морфологията на hBest1 и hBest1/SM монослоеве (наблюдава се увеличаване на светлите домени с висока плътност), но не повлиява морфологията на hBest1/POPC монослоя.

4. Експресията на hBest1 в MDCKII клетките води до увеличаване на относителния дял на неламеларни лизолипиди в клетъчния липиден състав и предполага по-висока степен на флуидизиране на мембраната.

5. Glu, GABA и ATP предизвикват по-бързо достигане и повишаване на стойността на TER_{max} при трансфектираните с *HBEST1* MDCKII клетки в сравнение с нетрансфектираните. Третирането на MDCKII-hBest1 клетки с PLA₂ не повлиява значително стойностите на TER в сравнение с нетрансфектираните MDCKII клетки (наблюдава се рязък спад на TER след третиране и бавно възстановяване).

6. Чрез транзиентна трансфекция е показано, че изследваните мутантни форми на hBest1 (Y85H, Q96R, R25W и Y227N) водят до ранна и късна апоптоза на MDCKII клетките.

6. Приноси

Като приноси на настоящия дисертационен труд могат да бъдат определени:

1. За първи път е изследвано влиянието на калций върху повърхностните характеристики на тройни монослоеове, съдържащи hBest1.

2. За първи път е охарактеризирана смесваемостта на бестрофин-1 в бинарни монослоеове чрез прилагане на метода на Goodrich за намиране на ΔA и ΔG_{mix} на тройни монослоеове.

3. За първи път е изследван ефекта на реорганизиране на мембраната (чрез третиране с PLA_2) в присъствие и отсъствие на hBest1 в клетъчна моделна система.

4. За първи път са изследвани промените в липидния състав на МДСКII клетки предизвикани от hBest1.

Публикации

1. **P. Videv**, N. Mladenov, T. Andreeva, K. Mladenova, V. Moskova-Doumanova, G. Nikolaev, S.D. Petrova, J.A. Doumanov, „Condensing Effect of Cholesterol on hBest1/POPC and hBest1/SM Langmuir Monolayers“, Membranes (Basel), 11(1) :52, 2021, IF (4.106 - 2020), Q2 (2021);

2. N. Mladenov, S. Petrova, T. Andreeva, V. Moskova-Doumanova, **P. Videv**, K. Mladenova, J. Doumanov, Effect of cholesterol on mixed hBest1/lipid monolayers, FEBS Open Bio 11 (Suppl.1), 2021, pages :103-507, doi :10.1002/2211-5463.13205, Ref, IR , SCOPUS, SJR (0.72 – 2020), IF (2.693 - 2021), Q2 (2021) ;

3. **Павел Видев**, Кирилка Младенова, Светла Петрова и Йордан Думанов, Структура и функция на hBest1, експресиран в МДСКII клетки, Сборник доклади Том VII : Национална научна конференция с международно участие „Наука и общество 2019“ – Кърджали, 387-395, 2019г.

Участия в научни конференции

1. **П. Видев**, К. Младенова, Г. Аврамов, В. Дойчинов, Н. Младенов, Й. Думанов, Св. Петрова, Постер – Анализ на липидния състав в биологичните мембрани от гре-1 и аге-19 клетъчни линии. XXIX Международна Научна Конференция 06/06-07/06 2019

2. Н. Младенов, Св. Петрова, Т. Андреева, К. Младенова, В. Московска-Думанова, **П. Видев**, Т. Топузова-Христова, Й. Думанов, Постер - Ефекти на температурата върху монослое от човешки бестрофин-1. XXIX Международна Научна Конференция 06/06-07/06 2019

3. К. Младенова, Св. Петрова, В. Московска-Думанова, Т. Топузова-Христова, **П. Видев**, Х. Младенов, Р. Велева, Т. Андреева, Й. Думанов, Постер – Влияние на АТФ върху монослое от човешки бестрофин-1. XXIX Международна Научна Конференция 06/06-07/06 2019

4. **P. Videv**, K. Mladenova, T. Andreeva, N. Mladenov, J. H. Park, V. Moskova-Doumanova, S. Petrova, J. Doumanov, Постер – Morphology of composite hBest1/POPC and hBest1/sphingomyelin monolayers, Научна конференция Климентови дни, София, 2020

5. **Павел Видев**, Джонг Хун Парк, Никола Младенов, Тоня Андреева, Веселина Московска-Думанова, Кирилка Младенова, Светла Петрова, Йордан Думанов, Постер – Effect of CA2+ on composite bestrophin-1 langmuir monolayers. XXXI Международна Online Научна Конференция 03/06-04/06 2021

6. Jong Hun Park, Venelina Radeva, **Pavel Videv**, Kirilka Mladenova, Svetla Petrova, Jordan Doumanov. Постер - Miscibility Of Human Bestrophin-1 With Binary Lipid Monolayers. SCIENTIFIC CONFERENCE KLIMENT'S DAYS 04/11 2022

Приложение 1

Състав на използваните разтвори и на гелове за SDS-PAGE (полиакриламидна електрофореза в присъствие на натриев додецил сулфат):

1. RIPA-буфер (Radioimmunoprecipitation assay buffer): 50mM Tris HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 0.1% Igepal, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% SDS (натриев додецил сулфат), коктейл от протеазни инхибитори и PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)
2. PBS (Phosphate Buffer Saline): 0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M Na_2HPO_4 , 0.0018 M KH_2PO_4
3. PBS/CM PBS, който включва 0.1mM CaCl_2 и 1mM MgCl_2
4. TBS (Tris-Buffered Saline): 25mM Tris HCl, pH8, 150mM NaCl; TBS-T включва и 0.05% Tween-20
5. Sample Buffer за SDS-PAGE: 10ml 1.5M Tris HCl, pH 6.8, 6ml 20% SDS, 30ml glycerol, 15ml β -mercaptoethanol, 1.8mg bromophenol blue и вода до краен обем 100мл
6. Елуент за молекулноситова хроматография: 50mM Tris HCl, pH 7.4, 150mM NaCl
7. Елуенти за афинитетна хроматография: буфер 1 – 50mM Tris HCl, pH 8, 150mM NaCl, 0.05% Igepal и 5mM Imidasole; буфер 2 – 50mM Tris HCl, pH 8, 150mM NaCl, 0.05% Igepal и 10mM Imidasole
8. Буфер за SDS-PAGE (10x): 30.0 g Tris base, 144.0 g глицин, 10.0 g SDS за 1l H_2O .
9. Концентриращ гел за SDS-PAGE: 4ml H_2O , 313 μ l Tris HCl, pH 6.8, 625 μ l Protogel AA/Bis, 50 μ l 10% SDS, 30 μ l 10% APS (амониев персулфат) и 15 μ l Temed (тетраметилетилендиамин)
10. Разделящ гел за SDS-PAGE: 4.46ml H_2O , 2.9ml 1.5M Tris HCl, pH 8.8, 3.75ml Protogel AA/Bis, 113 μ l 10% SDS, 37.5 μ l 10% APS и 12.5 μ l Temed

Използвана литература

1. Bharill, S., et al., *Stoichiometry and specific assembly of Best ion channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(17): p. 6491-6.
2. Woo, D.H., et al., *TREK-1 and Best1 channels mediate fast and slow glutamate release in astrocytes upon GPCR activation*. Cell, 2012. **151**(1): p. 25-40.
3. Lee, S., et al., *Channel-mediated tonic GABA release from glia*. Science, 2010. **330**(6005): p. 790-6.
4. Walker, J.M., *The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation*. Methods Mol Biol, 1994. **32**: p. 5-8.
5. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical Biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
6. Mladenova, K., et al., *Interaction of Bestrophin-1 with 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) in surface films*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014. **122**: p. 432-438.
7. Deranieh, R.M., A.S. Joshi, and M.L. Greenberg, *Thin-layer chromatography of phospholipids*. Methods Mol Biol, 2013. **1033**: p. 21-7.
8. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
9. Touchstone, J.C., J.C. Chen, and K.M. Beaver, *Improved separation of phospholipids in thin layer chromatography*. Lipids, 1980. **15**(1): p. 61-62.
10. Dupuy, A.D. and D.M. Engelman, *Protein area occupancy at the center of the red blood cell membrane*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(8): p. 2848-2852.
11. Mladenova, K., et al., *Establishment and characterization of stably transfected mdck cell line, expressing hbest1 protein*. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 2013. **19**: p. 159-162.
12. Andreeva, T.D., et al., *Effects of Ca(2+), Glu and GABA on hBest1 and composite hBest1/POPC surface films*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2018. **161**: p. 192-199.
13. Mladenov, N., et al., *Miscibility of hBest1 and sphingomyelin in surface films – A prerequisite for interaction with membrane domains*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2020. **189**.
14. Melcrová, A., et al., *The complex nature of calcium cation interactions with phospholipid bilayers*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 38035.
15. П. Видев, К.М., С. Петрова, Й. Думанов, *Структура и функция на hBest1, експресиран в MDCK II клетки*, in *Национална научна конференция с международно участие "Наука и общество 2019"*. 2019: Кърджали, България. p. 387-359.
16. Davies, J.T.R.E.K., *Interfacial phenomena*. 1961, New York: Academic Press.

17. Krajewska, M., K. Dopierała, and K. Prochaska, *Lipid-Protein Interactions in Langmuir Monolayers under Dynamically Varied Conditions*. J Phys Chem B, 2020. **124**(1): p. 302-311.
18. Dynarowicz-Łątka, P., A. Wnętrzak, and K. Makyła-Juzak, *Cyclosporin A in Membrane Lipids Environment: Implications for Antimalarial Activity of the Drug-The Langmuir Monolayer Studies*. J Membr Biol, 2015. **248**(6): p. 1021-32.
19. Feng, R.J., et al., *Effect of Ca(2+) to Sphingomyelin Investigated by Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy*. Biophys J, 2017. **112**(10): p. 2173-2183.
20. Rujoi, M., et al., *Interactions of Ca(2+) with sphingomyelin and dihydrosphingomyelin*. Biophys J, 2002. **82**(6): p. 3096-104.
21. Del Castillo-Santaella, T., et al., *Specific Ion Effects in Cholesterol Monolayers*. Materials (Basel), 2016. **9**(5).
22. Mangiarotti, A., et al., *Hopanoids Like Sterols Form Compact but Fluid Films*. Langmuir, 2019. **35**(30): p. 9848-9857.
23. Fidalgo Rodriguez, J.L., et al., *New look for an old molecule – Solid/solid phase transition in cholesterol monolayers*. Chemistry and Physics of Lipids, 2019. **225**: p. 104819.
24. Mladenova, K., et al., *Effects of Ca(2+) ions on bestrophin-1 surface films*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2017. **149**: p. 226-232.
25. Baglioni, P., et al., *Monolayers of cholesterol at water-air interface: Mechanism of collapse*. Journal of Colloid and Interface Science, 1985. **104**(1): p. 143-150.
26. Zhang, L. and C. Hao, *Effects of Concentration and Surface Pressure on MBP Interaction with Cholesterol in Langmuir Films*. 2017. **2017**: p. 1542156.
27. Lee, A.G., *A Database of Predicted Binding Sites for Cholesterol on Membrane Proteins, Deep in the Membrane*. Biophys J, 2018. **115**(3): p. 522-532.
28. Sones, W.R., et al., *Cholesterol depletion alters amplitude and pharmacology of vascular calcium-activated chloride channels*. Cardiovasc Res, 2010. **87**(3): p. 476-84.
29. Wang, X.L., et al., *Caveolae targeting and regulation of large conductance Ca(2+)-activated K+ channels in vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(12): p. 11656-64.
30. Bravo-Zehnder, M., et al., *Apical sorting of a voltage- and Ca2+-activated K+ channel alpha -subunit in Madin-Darby canine kidney cells is independent of N-glycosylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13114-9.
31. Weaver, A.K., et al., *BK channels are linked to inositol 1,4,5-triphosphate receptors via lipid rafts: a novel mechanism for coupling [Ca(2+)](i) to ion channel activation*. J Biol Chem, 2007. **282**(43): p. 31558-68.
32. Babiychuk, E.B., et al., *Membrane cholesterol regulates smooth muscle phasic contraction*. J Membr Biol, 2004. **198**(2): p. 95-101.
33. Sampson, L.J., et al., *Caveolae localize protein kinase A signaling to arterial ATP-sensitive potassium channels*. Circ Res, 2004. **95**(10): p. 1012-8.
34. Shmygol, A., K. Noble, and S. Wray, *Depletion of membrane cholesterol eliminates the Ca2+-activated component of outward potassium current and decreases membrane capacitance in rat uterine myocytes*. J Physiol, 2007. **581**(Pt 2): p. 445-56.

35. Alioua, A., et al., *Slo1 caveolin-binding motif, a mechanism of caveolin-1-Slo1 interaction regulating Slo1 surface expression*. J Biol Chem, 2008. **283**(8): p. 4808-17.
36. Vial, C. and R.J. Evans, *Disruption of lipid rafts inhibits P2X1 receptor-mediated currents and arterial vasoconstriction*. J Biol Chem, 2005. **280**(35): p. 30705-11.
37. Brainard, A.M., et al., *Maxi-K channels localize to caveolae in human myometrium: a role for an actin-channel-caveolin complex in the regulation of myometrial smooth muscle K⁺ current*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(1): p. C49-57.
38. Sampson, L.J., et al., *Angiotensin II-activated protein kinase C targets caveolae to inhibit aortic ATP-sensitive potassium channels*. Cardiovasc Res, 2007. **76**(1): p. 61-70.
39. Absi, M., et al., *Effects of methyl beta-cyclodextrin on EDHF responses in pig and rat arteries; association between SK(Ca) channels and caveolin-rich domains*. Br J Pharmacol, 2007. **151**(3): p. 332-40.
40. Dam, V.S., et al., *TMEM16A knockdown abrogates two different Ca(2+)-activated Cl(-) currents and contractility of smooth muscle in rat mesenteric small arteries*. Pflugers Arch, 2014. **466**(7): p. 1391-409.
41. Dam, V.S., et al., *The bestrophin- and TMEM16A-associated Ca(2+)- activated Cl(-) channels in vascular smooth muscles*. Channels (Austin), 2014. **8**(4): p. 361-9.
42. Jiménez-Garduño, A.M., et al., *KV10.1 K⁺-channel plasma membrane discrete domain partitioning and its functional correlation in neurons*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2014. **1838**(3): p. 921-931.
43. O'Connell Kristen, M.S., R. Loftus, and M. Tamkun Michael, *Localization-dependent activity of the Kv2.1 delayed-rectifier K⁺ channel*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(27): p. 12351-12356.
44. Wong, W. and L.C. Schlichter, *Differential Recruitment of Kv1.4 and Kv4.2 to Lipid Rafts by PSD-95**. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(1): p. 444-452.
45. Zakany, F., et al., *Determining the target of membrane sterols on voltage-gated potassium channels*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2019. **1864**(3): p. 312-325.
46. Amsalem, M., et al., *Membrane cholesterol depletion as a trigger of Nav1.9 channel-mediated inflammatory pain*. Embo j, 2018. **37**(8).
47. Pristerà, A., M.D. Baker, and K. Okuse, *Association between Tetrodotoxin Resistant Channels and Lipid Rafts Regulates Sensory Neuron Excitability*. PLOS ONE, 2012. **7**(8): p. e40079.
48. Morenilla-Palao, C., et al., *Lipid Raft Segregation Modulates TRPM8 Channel Activity**. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(14): p. 9215-9224.
49. Zhu, D., W.C. Xiong, and L. Mei, *Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering*. J Neurosci, 2006. **26**(18): p. 4841-51.
50. Wang, H., et al., *Ouabain Assembles Signaling Cascades through the Caveolar Na⁺/K⁺-ATPase**. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(17): p. 17250-17259.
51. Wright, P.T., et al., *Caveolin-3 regulates compartmentation of cardiomyocyte beta2-adrenergic receptor-mediated cAMP signaling*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2014. **67**: p. 38-48.

52. MacDougall, D.A., et al., *Caveolae compartmentalise β_2 -adrenoceptor signals by curtailing cAMP production and maintaining phosphatase activity in the sarcoplasmic reticulum of the adult ventricular myocyte*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2012. **52**(2): p. 388-400.
53. Mañes, S., et al., *Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection*. EMBO Rep, 2000. **1**(2): p. 190-6.
54. Kumari, R., C. Castillo, and A. Francesconi, *Agonist-dependent signaling by group I metabotropic glutamate receptors is regulated by association with lipid domains*. J Biol Chem, 2013. **288**(44): p. 32004-19.
55. Eroglu, C., et al., *Glutamate-binding affinity of Drosophila metabotropic glutamate receptor is modulated by association with lipid rafts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10219-24.
56. Oddi, S., et al., *Effects of palmitoylation of Cys(415) in helix 8 of the CB(1) cannabinoid receptor on membrane localization and signalling*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(8): p. 2635-51.
57. Rogacki, M.K., et al., *Dynamic lateral organization of opioid receptors (κ , μ (wt) and μ (N40D)) in the plasma membrane at the nanoscale level*. Traffic, 2018. **19**(9): p. 690-709.
58. Rosenhouse-Dantsker, A., et al., *Identification of novel cholesterol-binding regions in Kir2 channels*. J Biol Chem, 2013. **288**(43): p. 31154-64.
59. Balajithy, A., et al., *Sterol Regulation of Voltage-Gated K(+) Channels*. Curr Top Membr, 2017. **80**: p. 255-292.
60. Singh, A.K., et al., *Multiple cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) motifs in cytosolic C tail of Slo1 subunit determine cholesterol sensitivity of Ca²⁺- and voltage-gated K⁺ (BK) channels*. J Biol Chem, 2012. **287**(24): p. 20509-21.
61. Yuan, P., et al., *Structure of the human BK channel Ca²⁺-activation apparatus at 3.0 Å resolution*. Science, 2010. **329**(5988): p. 182-6.
62. Hite, R.K., X. Tao, and R. MacKinnon, *Structural basis for gating the high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel*. Nature, 2017. **541**(7635): p. 52-57.
63. Picazo-Juárez, G., et al., *Identification of a binding motif in the S5 helix that confers cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel*. J Biol Chem, 2011. **286**(28): p. 24966-76.
64. Kumari, S., et al., *Influence of membrane cholesterol in the molecular evolution and functional regulation of TRPV4*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **456**(1): p. 312-9.
65. Baier, C.J., J. Fantini, and F.J. Barrantes, *Disclosure of cholesterol recognition motifs in transmembrane domains of the human nicotinic acetylcholine receptor*. Scientific Reports, 2011. **1**(1): p. 69.
66. Sharpe, L.J., et al., *Cholesterol sensing by the ABCG1 lipid transporter: Requirement of a CRAC motif in the final transmembrane domain*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1851**(7): p. 956-64.
67. Gál, Z., et al., *Mutations of the central tyrosines of putative cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC) sequences modify folding, activity, and*

- sterol-sensing of the human ABCG2 multidrug transporter*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1848**(2): p. 477-87.
68. Torrent-Burgués, J., *Lysozyme Influence on Monolayers of Individual and Mixed Lipids*. *Colloids and Interfaces*, 2022. **6**(1): p. 15.
69. Dynarowicz-Łatka, P. and K. Hac-Wydro, *Interactions between phosphatidylcholines and cholesterol in monolayers at the air/water interface*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2004. **37**(1-2): p. 21-5.
70. Videv, P., et al., *Condensing Effect of Cholesterol on hBest1/POPC and hBest1/SM Langmuir Monolayers*. 2021. **11**(1).
71. Wydro, P., *Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol monolayers--analysis of the interactions in model membranes and Brewster Angle Microscopy experiments*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012. **93**: p. 174-9.
72. *Posters*. *FEBS Open Bio*, 2021. **11**(S1): p. 103-507.
73. Fidalgo Rodriguez, J.L., et al., *New look for an old molecule - Solid/solid phase transition in cholesterol monolayers*. *Chem Phys Lipids*, 2019. **225**: p. 104819.
74. Goodrich, F.C., *Molecular Interaction in Mixed Monolayers*. *Proceedings of the Second International Congress of Surface Activity: Gas-liquid and liquid-liquid interface*, 1957.
75. Gülcan, H.G., et al., *Lipids of human retina, retinal pigment epithelium, and Bruch's membrane/choroid: comparison of macular and peripheral regions*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993. **34**(11): p. 3187-93.
76. Hansson, G.C., K. Simons, and G. van Meer, *Two strains of the Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line have distinct glycosphingolipid compositions*. *EMBO J*, 1986. **5**.
77. Guziewicz, K.E., et al., *Bestrophinopathy: An RPE-photoreceptor interface disease*. *Prog Retin Eye Res*, 2017. **58**: p. 70-88.
78. Falck, E., et al., *Impact of cholesterol on voids in phospholipid membranes*. *J Chem Phys*, 2004. **121**(24): p. 12676-89.
79. Grassi, S., et al., *Lipid rafts and neurodegeneration: structural and functional roles in physiologic aging and neurodegenerative diseases*. *J Lipid Res*, 2020. **61**(5): p. 636-654.
80. Mladenova, K., et al., *Transepithelial resistance in human bestrophin-1 stably transfected Madin-Darby canine kidney cells*. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2015. **29**(1): p. 101-104.
81. Zhang, Y., et al., *ATP activates bestrophin ion channels through direct interaction*. *Nature Communications*, 2018. **9**(1): p. 3126.
82. Bullock, J., et al., *Degradation of Photoreceptor Outer Segments by the Retinal Pigment Epithelium Requires Pigment Epithelium-Derived Factor Receptor (PEDF-R)*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2021. **62**(2): p. 30.
83. Zhu, D., et al., *Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 16): p. 3695-703.
84. Simonsen, A.C., *Activation of phospholipase A2 by ternary model membranes*. *Biophys J*, 2008. **94**(10): p. 3966-75.

85. Doumanov, J., et al., *Effects of vipoxin and its components on HepG2 cells*. *Toxicol*, 2015. **94**: p. 36-44.
86. Guzmán Mendoza, N.A., et al., *Neuroprotective Effect of 4-Phenylbutyric Acid against Photo-Stress in the Retina*. *Antioxidants* (Basel), 2021. **10**(7).
87. Joh, T., et al., *Dorsal Column Degeneration after Bortezomib Therapy in a Patient with Multiple Myeloma*. *Case Rep Oncol*, 2009. **2**(3): p. 184-188.
88. Uggenti, C., et al., *Restoration of mutant bestrophin-1 expression, localisation and function in a polarised epithelial cell model*. *Dis Model Mech*, 2016. **9**(11): p. 1317-1328.
89. Davidson, A.E., et al., *Functional characterization of bestrophin-1 missense mutations associated with autosomal recessive bestrophinopathy*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011. **52**(6): p. 3730-6.
90. Lotery, A.J., et al., *Allelic variation in the VMD2 gene in best disease and age-related macular degeneration*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000. **41**(6): p. 1291-6.
91. Petrukhin, K., et al., *Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy*. *Nat Genet*, 1998. **19**(3): p. 241-7.
92. Kramer, F., et al., *Mutations in the VMD2 gene are associated with juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best disease) and adult vitelliform macular dystrophy but not age-related macular degeneration*. *Eur J Hum Genet*, 2000. **8**(4): p. 286-92.
93. Mullins, R.F., et al., *Late development of vitelliform lesions and flecks in a patient with best disease: clinicopathologic correlation*. *Arch Ophthalmol*, 2005. **123**(11): p. 1588-94.
94. Doumanov, J.A., et al., *Disease-causing mutations in BEST1 gene are associated with altered sorting of bestrophin-1 protein*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(7): p. 15121-40.
95. Sampaio, J.L., et al., *Membrane lipidome of an epithelial cell line*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(5): p. 1903-7.
96. Moskova-Doumanova, V., et al., *Aminoacid exchange r25w affects proper cellular localisation of best1 protein in mdckii cells*. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, 2014. **67**: p. 231-236.
97. Bogdanov, M., et al., *To flip or not to flip: lipid-protein charge interactions are a determinant of final membrane protein topology*. *J Cell Biol*, 2008. **182**(5): p. 925-35.
98. Bogdanov, M. and W. Dowhan, *Lipid-dependent generation of dual topology for a membrane protein*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(45): p. 37939-48.
99. Xu, C., et al., *Mutation of a mitochondrial outer membrane protein affects chloroplast lipid biosynthesis*. *Plant J*, 2008. **54**(1): p. 163-75.