

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. д-р Румяна Цонева

Лаборатория „Трансмембранна сигнализация”

Институт по биофизика и биомедицинско инженерство - БАН

Относно представения дисертационен труд от ас. Павел Веселинов Видев, докторант в СУ „Св. Климент Охридски” Биологически факултет, Катедра „Биохимия”, по професионално направление 4.3 Биологически науки (Молекулярна биология – Клетъчна поляризация и мембрани) на тема: „**Характеристика и роля на hBest1 и негови мутантни форми в еукариотни клетки и моделни мембранни структури**” за защита.

Представеният проект включва: Увод - 1стр.; Литературен обзор- 40стр.; Цели и задачи - 1стр.; Материали и методи – 5 стр., Резултати и дискусия – 37 стр.; Изводи – 1 стр.; Приноси – 1стр., Публикации по темата на дисертацията и участия в конференции – 1 стр., Приложение 1 – използвани разтвори – 1 стр. и Литературна справка, в която са цитирани 343 източника.

Темата на проекта за дисертация „**Характеристика и роля на hBest1 и негови мутантни форми в еукариотни клетки и моделни мембранни структури**“ е актуална и напълно дисертабилна. Мутации в гена *BEST1*, отговорен за синтеза на човешкия бестрофин-1 (hBest1), който е трансмембранен белтък и се експресира главно в ретинални епителни клетки (RPE), водят до различни дегенеративни състояния на ретината. Клиничните прояви на бестрофинопатиите и ролята на Best1 при тези заболявания продължават да бъдат обект на изследвания. Липсата на информация за точните механизми за развитието на бестрофинопатии обуславя и целта на настоящата дисертация.

Настоящия дисертационен труд е организиран и представен според приетите стандарти.

След кратък и информативен **Увод** запознаващ читателя със същността на поставения проблем, както и мотивацията за планираните научни изследвания, следва подробен **Литературен обзор**, в който последователно се разглеждат:

1. **Бестрофин (hBest1)** - направен е подробен преглед на структурата, функциите, експресията и локализацията на бестрофина. Обърнато е внимание на паралозите на бестрофина – тяхната локализация и роля.
2. **Бестрофинопатии** – Описани са шест от патологичните състояния дължащи се на мутации в гена отговорен за бестрофина - така наречените бестрофинопатии. Техният брой и значимостта им за увреждане на зрението потвърждават важността на поставената цел в настоящата дисертация.
3. **Биологични мембрани** – Обърнато е особено внимание на актуалния модел за структурата на биологичните мембрани, включително и на съвременните възгледи за съществуване на липидна асиметрия и латерална хетерогенност обуславяща съществуването на подредени и неподредени участъци в клетъчната мембрана и тяхната биологична роля. Изтъкната е структурната и функционална роля на основните липиди изграждащи предимно подредените участъци в мембраните като холестерола. Подробното описание на локализацията и функцията на холестерола в клетъчните мембрани спомага за по-късното (в дисертацията) описание и анализиране на получените резултати. Тук също е обърнато особено внимание на съществуващите фази в мембраните, както и на възможните фазови преходи. Описани са и мембранните структури наречани липидни рафтове и участието им в сигнални пътища опосредстващи различни клетъчни процеси като апоптоза например.
4. **Мембранни белтъци** – разгледана е тяхната роля в различни клетъчни процеси, както и тяхната класификация според разположението им в липидния бислой. Обърнато е внимание на ролята на белтъците за структурата на мембраната. Специално внимание е отделено на фосфолипазите A1 и A2 и ролята им в различни видове липиден метаболизъм. Подробно е разгледана ролята на мембранните белтъци в клетъчната поляризация.
5. **Подходи за анализиране на липид-липидни и липид-белтъчни взаимодействия чрез моделни мембранни системи** – приложени са интердисциплинарни подходи при решаване на поставените задачи включващи клетъчни, молекулярни и

биохимични методи. Подробно е описан подхода, който е използван за измерване на липид-липидните и липид-белтъчните взаимодействия.

Литературният обзор е задълбочен, изчерпателен и много добре структуриран, което го прави много лесен и приятен за четене. Направен е много компетентно, което показва, че авторът е запознат и борави добре със съвременната информация отразяваща изследванията в тази област. Отлично подбраните цветни фигури и схеми използвани в обзора допринасят за по-голямо онагледяване на изнесената информация и за удобство на читателя.

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

Чрез изследване на молекулните взаимодействия между hBest1, фосфатидилхолин, сфингомиелин и холестерол в Лангмюирови монослоеове, 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.

Получените данни биха могли да бъдат използвани, за да се определи връзката между структура и функция на hBest1 и ролята му при развитието на различни патологични процеси свързани с дегенерацията на ретината.

За постигането на тази цел логично следват и следните задачи:

1. Да се установят повърхностните свойства на hBest1 в дву- и трикомпонентни Лангмюирови монослоеове, 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 монослоеове в присъствие и отсъствие на калциеви йони;
3. Да се определи ефектът на Ca²⁺ и променливи количества холестерол върху морфологията на POPC, SM, hBest1/POPC и hBest1/SM монослоеове.
4. Да се сравни липидния състав на MDCKII клетки и на такива, експресиращи hBest1;
5. Да се определи влиянието на Glu, GABA, ATP 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.

7. Да се определи разпределението на hBest1 в L_o и L_d регионите в мембраните на трансфектирани MDCK-hBest1 клетки.

В частта **Материали и методи** са описани коректно и подробно използваните методики, както следва: приготвяне на клетъчни лизати, определяне на белтък по метода на Smith, молекулноситова и афинитетна хроматография за пречистване на hBest1, SDS-PAGE и имуноблот, получаване на липидни екстаркти, тънкослойна хроматография на липиди, физикохимични методи като построяване на Лангмюирови слоеве и изчисляване на модула на свиваемост, смесваемост, средната молекулна площ на компонентите в смесените филми и обща свободна енергия на Гибс, UltraVAM (микроскопия под ъгъл на Брюстер) микроскопия за визуализация на латералната доменна организация и морфология на изградените монослоеви, клетъчни и молекулярни методи като клетъчно култивиране, трансфекция, определяне на апоптоза чрез поточен цитометър, измерване на трансепителна резистентност (TER) на MDCKII и MDCKII-hBest1 клетки.

Разделът **Резултати и дискусия** включва шест подраздела: **1.** Тензиометрични изследвания на дву- и трикомпонентни монослоеви, съдържащи холестерол; **2.** Брюстер-ъглова микроскопия на монослоеви hBest/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol. Влияние на концентрация на холестерола; **3.** Смесваемост на hBest1 с двукомпонентни липидни монослоеви; **4.** Влияние на hBest1 върху липидния състав на трансфектирани с *BEST1* клетки; **5.** Влияние на hBest1 върху трансепителната резистентност на MDCKII клетките при наличие на Glu, GABA, ATP, PLA2; **6.** Влияние на мутантни форми на hBest1 върху MDCKII клетки.

Първият подраздел включва 10 фигури, които илюстрират резултатите свързани с определяне на ефекта на Ca^{2+} върху POPC/Chol, SM/Chol, hBest1/Chol, hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol Лангмюирови монослоеви.

Резултатите сочат, че при използване на бинарни смеси (POPC/Chol, SM/Chol и hBest1/Chol) изотермите на повърхностното налягане спрямо молекулната площ (π/A) на бинарните монослоеви показват постепенно повишаване на повърхностното налягане и уплътняване на монослоя, като в същото време се наблюдава съпътстващо намаляване на средната молекулна площ по времето на компресия, без да се наблюдават фазови преходи.

Присъствието на Ca^{2+} в POPC/Chol монослоя има кондензиращ ефект и води до намаляване на хистерезиса на бинарния монослой, което свидетелства за по-голяма компактизация на молекулите. Изказва се твърдение за ролята на холестерола върху кондензиращия ефект на Ca^{2+} в POPC/Chol монослоя. Освен това еластичността на слоя не се променя при добавяне на Ca^{2+} . При използването на SM/Chol монослоеве Ca^{2+} имат кондензиращ ефект и не водят до промяна на фазовото състояние. hBest1/Chol – при този бинарен монослой добавянето на Ca^{2+} води до изместване на изотермите към по-високи молекулни площи, за разлика от горните две бинарни смеси. Добавянето на Ca^{2+} води също и до подобряване на подредеността на монослоя и намаляване на еластичността.

При използването на по-сложни трикомпонентни системи се оказва, че Ca^{2+} довеждат до кондензация на слоеве hBest /POPC/Chol и hBest /SM/Chol.

Вторият подраздел съдържа 2 фигури, които представят резултатите от Брюстер-ъглова микроскопия на монослоеве hBest1/POPC/Chol и hBest1/SM/Chol и влияние на концентрацията на холестерола. Резултатите сочат, че при бинарната смес hBest/ Chol съществува по-кондензирана фаза с характерни много ярки домени с овална форма, като площта на тази фаза се увеличава право пропорционално с нарастване на моларната част на Chol. Добавянето на Chol в различни молни съотношения към бинарния hBest1/POPC монослой не води до промяна на морфологията. Демонстриран е кондензиращия ефект на Chol върху монослоеве hBest1/SM, изразен чрез образуването на множество малки ярки домени от силно кондензирана фаза, равномерно разпределени в компактният хомогенен монослой.

Третият раздел съдържа 2 фигури, които илюстрират резултатите от изследвания на смесваемостта на hBest1 с двукомпонентни липидни монослоеве. Резултатите сочат, че при тройните монослоеве hBest/POPC/Chol взаимодействията на привличане между hBest1 (при $X_{\text{hBest1}} < 0,02$) и липидните молекули са по-силни от взаимодействията hBest1-hBest1 и липид-липид, като по този начин уплътняват филма и увеличават смесваемостта. При $X_{\text{hBest1}} > 0,02$ привличането между подобни hBest1-hBest1 и липидно-липидните молекули е по-слабо в сравнение с привличането между hBest1 и липидите, което предполага фазово разделяне между hBest1 и липидите в монослоеве. При hBest/SM/Chol привличането

между подобни hBest1-hBest1 и липидно-липидните молекули също е по-слабо, което предполага фазово разделяне между белтъка и липидите в монослоеве. Добавянето на Ca^{2+} води до по-изявено разделяне в монослоя. Чрез изчисляване на свободната енергия на смесване за тройните монослоеве е показано, че те са по-стабилни от единичните липидни и белтъчни слоеве, което доказва, че смесването на hBest1 и липидните молекули е спонтанен и термодинамично изгоден процес и се влияе слабо от добавяне на Ca^{2+} . Доказана е положителната роля за увеличаване на смесваемостта и стабилността във филмите.

Четвъртият подраздел съдържа 2 фигури и разглежда влиянието на hBest1 върху липидния състав на трансфектирани с Best1 клетки. При сравняване на качествения състав на липидите в клетъчните мембрани на нетрансфектирани и трансфектирани клетки се наблюдава по-висок относителен дял на неутралните липиди, фосфатидилсерин и фосфатидилхолин. За разлика, при трансфектираните клетки се наблюдават по-големи количества на смесена фракция фосфатидилинозитол и фосфатидат, кардиолипин, както и лизолипиди. Тези резултати потвърждават флуидизацията ефект на бестрофина в клетъчната мембрана.

Петият подраздел съдържа 6 фигури, които илюстрират резултатите от изследванията на влиянието на hBest1 върху трансепителната резистентност на трансфектирани и нетрансфектирани MDCKII клетки при наличие на Glu, GABA, ATP и PLA₂.

Резултатите сочат по-ранно достигане на TER_{max} при MDCKII-hBest1 клетките за всички експериментални серии (5-6 ден), в сравнение с контролната клетъчна линия (7 ден). Наличието на Glu и GABA води до значително повишаване на TER_{max} , което предполага 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. От друга страна клетките третирани с ATP показват най-ниска стойност на TER, което предполага свързване на hBest1 с ATP и активирането на белтъка, като по този начин увеличеният поток на йони през клетката намалява съпротивлението на клетъчния слой.

Установено е, че 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 в тези клетки, спрямо които PLA₂ не проявява активност.

Шестият подраздел съдържа 2 фигури и разглежда влиянието на мутантни форми на hBest1 върху MDCKII клетки. Цитоксичното действие на мутантните белтъци (4 форми) е оценено чрез измерване нивото на възникнала апоптоза. Най-висока степен на апоптоза бе отчетена за мутнатната форма на бестрофин 1 Y227N, при която се забелязва най-малък дял на оцелелите клетки. Интересен резултат, е че мутантните форми на белтъка показват промяна на локализацията на белтъка в клетъчната мембрана. Докато дивият тип на hBest1 се разполага базолатерално, мутантите показват апикално разпределение. Насочването на hBest1 към апикалната мембрана може да доведе до липиден дисбаланс и дисфункция на мембраната.

В обобщение, темата на настоящия дисертационен труд е насочена към изясняване на връзката между структура и функция на hBest1 в клетъчната мембрана чрез изследване на молекулните взаимодействия на hBest1 с фосфатидилхолин, сфингомиелин и холестерол в Лангмюирови монослое, влиянието му върху липидния състав и поляризацията в hBest1 – експресиращи и hBest1-неекспресиращи клетки, както и цитотоксичността на негови мутанти.

Направените **Изводи** са адекватни и изчерпателни към посочената цел на дисертационния труд. **Приносите** свидетелстват за съществените постижения на настоящата дисертация във връзка с разкриване на взаимовръзката на калциевите йони и повърхностните характеристики на тройни монослое съдържащи бестрофин, охарактеризиране на смесваемостта на бестрофин в бинарни монослое и изясняване ролята на бестрофина за реорганизацията на мембраната. Акцентира се на възможността на hBest1 да влияе на формирането/моделването на липидните домени в мембраната, което вероятно се свързва с неговите биологични функции. Изключително интересни са резултатите свидетелстващи за различната локализация на мутантните форми на бестрофина в клетъчната мембрана, подсказвайки най-вероятно един от механизмите за възникване на бетсрофинобазираните патологии.

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

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

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

24.01.2023 г.

Проф. д-р Румяна Цонева

Институт по биофизика и биомедицинско инженерство-БАН

Въпрос към докторанта: Как може да се отрази промяната в мембранната локализация на мутантните форми на бестрофина на организацията и функцията на мембраната?