

СУ „Св. Климент Охридски”  
Биологически факултет  
Катедра „Биохимия”

СОФИЙСКИ  
УНИВЕРСИТЕТ



„СВ. КЛИМЕНТ  
ОХРИДСКИ”  
ОСНОВАН 1888 г.

Никола Йорданов Младенов

Взаимодействие на hBest1 с мембранни липиди и асоциирането му с детергент  
резистентни домени от еукариотни клетки

### **АВТОРЕФЕРАТ**

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

Научни ръководители:  
Доц. д-р Йордан Думанов  
Доц. д-р Тоня Андреева

София, 2020г.

Благодарности:

На първо място дължа голяма благодарност на научните си ръководители доц. д-р Йордан Думанов и доц. д-р Тоня Андреева за тяхната подкрепа и съвети, благодарение на които беше реализирана тази дисертация.

Изказвам благодарност и на проф. д-р Светла Петрова за нейната безценна помощ и насоки в експерименталната част.

Настоящата дисертация е реализирана с финансовата подкрепа на договори КП-06-Н23/7 от 2018г. и № ДН 19/8 от 2017г. към ФНИ и тематичен проект към СУ № 80-10-114/2018 г.

## I. Увод

Биологичните мембрани съдържат различни групи липиди, белтъци и въглехидрати. Молекулите им са свързани чрез специфични и регулирани взаимодействия, които определят структурата и функциите на мембраната. Резултатът от взаимодействията е съществуването на латерална хетерогенност и образуването на липидни домени с различни биофизични и биохимични свойства. В зависимост от състава (и физикохимичното си състояние) мембранните домени могат да бъдат в течно-подредена ( $L_o$ , *Liquide ordered*) и течно-неподредена ( $L_d$ , *Liquide disordered*) фаза. Едни от основните липиди, изграждащи  $L_o$  фазата, са холестерол и сфингомиелин, които могат да образуват микродомени или т. нар. липидни рафтове, определящи структурата и функцията на трансмембранните белтъци (включително и на йонните канали), разположени по плазмената мембрана [1-4].

Бестрофин-1 (*hBest1*), е трансмембранен белтък, който се експресира по базолатералната мембрана на клетките от ретиналния пигментен епител (*RPE, Retinal Pigment Epithelium*). Една от основните функции на бестрофин-1 е калциево-зависим пренос на хлорни йони [5]. Предполага се и ролята му като канал в централната нервна система, където би могъл да участва в транспорта на GABA ( $\gamma$ -аминобутират) в глиални клетки [6] и Glu (глутамат) [7] в астроцитите и неврони.

Мутации в гена *BEST1*, отговорен за синтезата на *hBest1* са отговорни за възникването на група заболявания на ретината при човек, наречени Бестрофинопатиите [8-10]. Тези заболявания се характеризират с широк набор от клинични прояви. Към бестрофинопатиите се отнася класическата вителиформна макулна дистрофия на Бест (*Best Vitelliform Macular Dystrophy, BVMD*). Тя е автозомно-доминантно заболяване на макулата, за което е характерно, че се проявява в детска или юношеска възраст [11-17]. Заболяването води до загуба на централното зрение и все още няма разработена терапия за лечението му [16].

Все още информацията за взаимодействието на *hBest1* с компонентите на клетъчната мембрана и как това повлиява функциите му са недостатъчни. При изучаването на мембранните белтъци специално внимание се отделя на взаимодействията им с мембранните липиди като се моделират системи, чрез които се извършват изследванията, които да са максимално близки до биологичните мембрани.

Изследването на междумолекулните взаимодействия между *hBest1*, сфингомиелин и холестерол е важно за по-пълното разбиране на асоциацията на *hBest1* с домени на клетъчната мембрана, което оказва влияние върху биологичните му функции. В настоящия дисертационен труд са извършени три групи изследвания: физикохимични (построяване на изотерми за

повърхностно налягане/средна молекулна площ ( $\pi/A$ ), хистерезисни криви на компресия/декомпресия, на монослоеве от hBest1/сфингомиелин (SM) и микроскопия под тъгъл на Брюстер (BAM, Brewster Angle Microscopy ) при температура  $35 \pm 2$  C°, биохимични (имунодетекция на белтъка от изолирани детергент-резистентни (DRM, Detergent Resistent Membranes) и детергент-разтворими мембранни фракции (DSM, Detergent Soluble Membranes) и биофизични (флуоресцентна колокализация на hBest1 и Laurdan в домени на плазмената мембрана от MDCK-hBest1 клетки). Получените резултати показаха, че  $Ca^{2+}$ , Glu и GABA взаимодействат със смесени hBest1/SM монослоеве, което вероятно води до промени в конформацията, структурата на hBest1 и повърхностната динамиката на монослоеве. Процесът на смесване в hBest1/SM монослоеве е термодинамично изгоден (спонтанен) с „флуидизиращ“ ефект на белтъка върху бинарните филми. В еукариотни клетки hBest1 е локализиран както в течно-подредената (35%) така и в течно-неподредената фаза (65%). Подобно е и разпределението на hBest1 в детергент-разтворимите (70%) и детергент-резистентните (30%) мембрани. Беше установен и кондензиращ ефект на холестерола върху монослоеве от hBest1 и върху смесени hBest1/SM и hBest1/ПОРС монослоеве

Спонтанната смесваемост на hBest1 и SM и кондензиращия ефект на холестерола са предпоставка за разнообразни взаимодействия на hBest1 с мембранните домени и различни структурни конформации на белтъка, които повлияват неговите функции.

## II. Цел и задачи

За да се изясни връзката структура-функция при hBest1 и за по-доброто разбиране на възникващите патологични състояния, свързани с мутации в гена му, е поставена целта на дисертационния труд: да се изследват молекулните взаимодействия между hBest1, сфингомиелин и холестерол, както и асоциацията на hBest1 с домени на клетъчната мембрана, оказващи влияние върху биологичните му функции.

За постигането на тази цел си поставихме следните задачи:

1. Да се установи ефектът на Ca<sup>2+</sup>, Glu и GABA върху повърхностната динамика на hBest1, SM и смесени hBest1/SM Лангмюирови монослоеве,
2. Да се определи смесваемостта на hBest1 и сфингомиелин в Лангмюирови монослоеве.
3. Да се установи ефектът на Ca<sup>2+</sup>, Glu и GABA върху морфологията на hBest1, SM и смесени hBest1/SM Лангмюирови монослоеве.
4. Да се определи кондензиращият ефект на холестерола върху монослоевете от ПОРС или SM в присъствие или отсъствие на Ca<sup>2+</sup> йони.
5. Да се установи кондензиращият ефект на холестерола върху монослоевете от hBest1/ПОРС и hBest1/SM в присъствие или отсъствие на Ca<sup>2+</sup> йони.
6. Да се определи асоциацията на hBest1 с детергент-резистентните и детергент-разтворимите домени на трансфектирани MDCK-hBest1 клетки.
7. Да се определи разпределението на hBest1 в Lo и Ld регионите в мембраните на трансфектирани MDCK-hBest1 клетки.

### III. Материали и методи

Беше използвана линия MDCKII, стабилно трансфектирана с гена за човешки hBest1. Клетките бяха култивирани при стандартни условия (37°C в овлажнена атмосфера, съдържаща 5% CO<sub>2</sub> в газовата фаза) в среда DMEM, обогатена с 10% FCS и селективен агент G418 (0.5mg/ml). След размразяване на линията, стабилността на експресията на hBest1 беше проверена чрез имунофлуоресценция с мише анти тяло срещу hBest1 и второ антимише козе IgG анти тяло, конюгирано с Alexa488.

За пречистването на hBest1 беше използван тотален клетъчен лизат от MDCK-hBest1, който беше подложен на: молекулно-ситова хроматография и афинитетна хроматография. Преди всяка стъпка пробите бяха диализирани срещу буфер. При определянето на фракциите, съдържащи hBest1, беше използвана имунодетекция чрез Western blot. След всяка стъпка на пречистване количеството на белтък в пробите беше определено чрез метода на Smith.

За определяне на повърхностните физикохимични характеристики на hBest1 и SM/hBest1 монослое в присъствие на компоненти (Ca<sup>2+</sup>, Glu или GABA) бяха измерени изотерми, хистерезисни криви на свиване и разширение чрез везна на Лангмюир, и беше изчислен модул на свиваемост. Чрез везна на Лангмюир беше определено и влиянието (кондензиращия ефект) на холестерола върху монослое от hBest1, SM/hBest1 и POPC/hBest1. Беше приложена Брюстер-ъглова микроскопия за визуализирана морфологията на Лангмюирови монослое от hBest1 и SM/hBest1 в присъствие на компоненти.

За определяне на разпределението на hBest1 в клетъчната мембрана на трансфектирани MDCKII клетки бяха използвани:

- Биохимичен подход - определяне на разпределението на белтъка в детергент-резистентни, DRM, и детергент-разтворими, DSM, мембранни домени чрез Western blot анализ
- Биофизичен подход - колокализация на белтъка с течно-подредени, Lo, и течно-неподредени, Ld, мембранни домени чрез маркиране на белтъка с анти тела и оцветяване на мембраната с виталното багрило Laurdan.

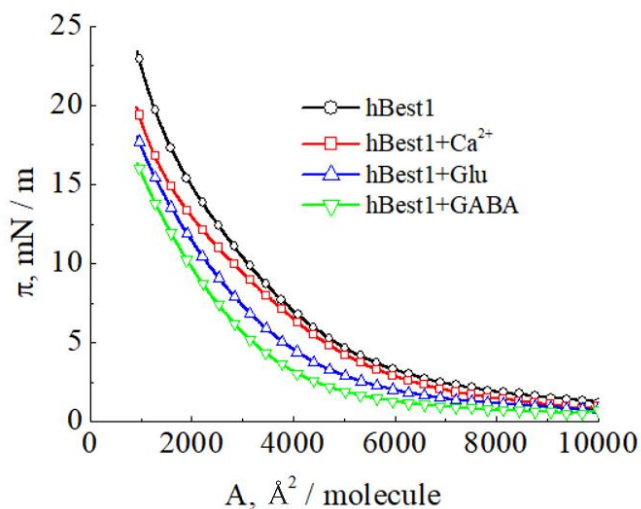
#### IV. Резултати и дискусия

### 1. Ефекти на $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA върху повърхностната динамика на hBest1, SM, и смесени hBest1/SM Лангмюирови монослое

#### 1.1. Ефекти на $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA върху Лангмюирови монослое

В предхождащо изследване на нашата научна група бе направена оценка на ефектите на калций, глутамат и гама-аминобутират върху повърхностното поведение на hBest1 монослое при температура 25°C [18]. Следваща логична стъпка бе получаване и изследване на  $\pi/A$  изотермите на hBest1 в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA, както и на hBest1 в присъствието само на NaCl при условия, близки до физиологичните. Всички изследвания бяха проведени при  $35 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Получените изотерми са с идентична форма и намаляването на средната молекулна площ по време на компресиране доведе до плавно покачване на повърхностното налягане, без образуване на плата или пикове, които са типичните индикации за промени във фазовото състояние (Фиг. 1).



Фиг. 1  $\pi/A$  изотерми на монослоеве от hBest1 в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA при температура  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Субфазата съдържа 150 mM NaCl.

Монослоевите не достигнаха точката на колапс, поради ограниченията на използваната апаратура, изразяващи се в лимит на максималния ход на подвижните бариери. Началното повърхностно налягане на монослой от hBest1 след достигане на равновесие беше  $\pi_0 = 1.2 \text{ mN/m}$ . Незначително понижаване се наблюдава при добавяне на калций ( $\pi_0 = 0.9 \text{ mN/m}$ ), глутамат ( $\pi_0 = 0.8 \text{ mN/m}$ ) и GABA ( $\pi_0 = 0.7 \text{ mN/m}$ ). Като резултат в компресионните изотерми на hBest1<sup>Ca</sup>, hBest1<sup>Glu</sup> и hBest1<sup>GABA</sup> се наблюдава изместване към пониско повърхностно налягане при еднаква молекулна площ, както и към пониска молекула площ при определено повърхностно налягане  $\pi$  ( $A_\pi$ ), в сравнение с изотермите, получени при изследване на монослой, съставен само



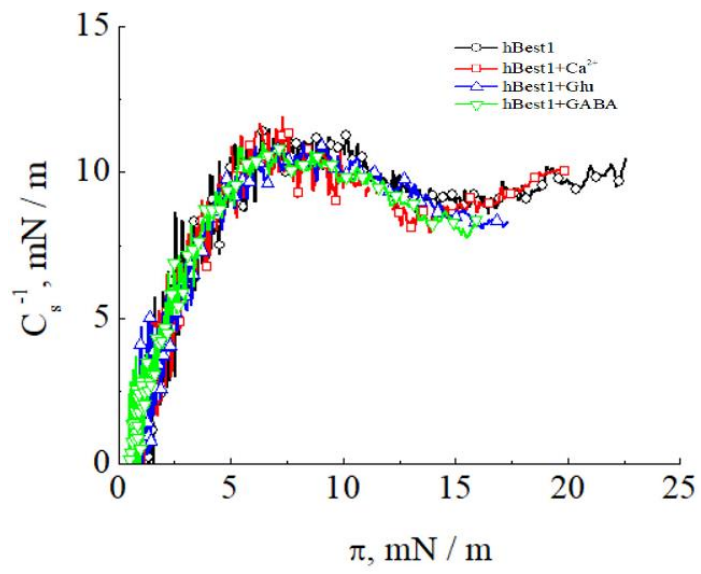
от hBest1.  $\pi/A$  изотермите показват, че добавянето на  $Ca^{2+}$ , Glu и GABA предизвиква промени в  $A_{\pi}$  на hBest1 както следва:  $A^{NaCl} > A^{Ca^{2+}} > A^{Glu} > A^{GABA}$ . Намалването на молекулната площ може да се дължи различните на взаимодействия между изследвания белтък и  $Ca^{2+}$ , Glu и GABA, които водят до:

- Промени в третичната структура на hBest1;
- Промени в самоорганизирането на hBest1 молекули на фазовата граница въздух/вода.

Добавянето на  $Ca^{2+}$ , Glu и GABA във водната субфаза променят заеманата от hBest1 молекулите площ при 15 mN/m ( $A_{15}$ ), както следва:  $A_{15}^{GABA}$  (1120  $\text{\AA}^2/\text{молекула}$ )  $< A_{15}^{Glu}$  (1350  $\text{\AA}^2/\text{молекула}$ )  $< A_{15}^{Ca}$  (1570  $\text{\AA}^2/\text{молекула}$ )  $< A_{15}^{NaCl}$  (1990  $\text{\AA}^2/\text{молекула}$ ). Тези измервания демонстрират намаляване на площта в сравнение с изчислената кристалографска площ от 3850  $\text{\AA}^2/\text{мономер}$  (за изследванията са използвани chBest1 в комплекс с Fab). Наблюдаваните различия се дължат на взаимодействия на белтъка hBest1 с  $Ca^{2+}$ , Glu или GABA, които променят конформацията, реорганизируют нековалентните междубелтъчни взаимодействия, експонират и „потопят“ - протеиновите молекули във водната фаза по време на компресиране. Подобни наблюдения са направени и на моделни системи, съдържащи други белтъци (например bR – бактерио-родопсин), които имат хидрофилни участъци от двете страни на монослоя [19, 20]. По този начин повърхностното съотношение хидрофобни/хидрофилни участъци се измества в полза на хидрофилните, което води до повишаване на сходството на молекулите към подложката и навлизането им във водната фаза. Получените резултати при изследването на hBest1<sup>NaCl</sup>, могат да бъдат обяснени с отсъствието на промените предизвикани

от  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA свързани с увеличеното отношение между хидрофобни/хидрофилни участъци и намалената възможност за навлизане във водната фаза поради „скриването“ на част от хидрофилните региони във вътрешността на молекулата.

Повърхностната еластичност и структурата на монослоевете от hBest1 бяха анализирани чрез построяване и изследване на кривите на модулите на свиваемост спрямо повърхностното налягане ( $C_s^{-1}/\pi$ ) (Фиг 2) [21].

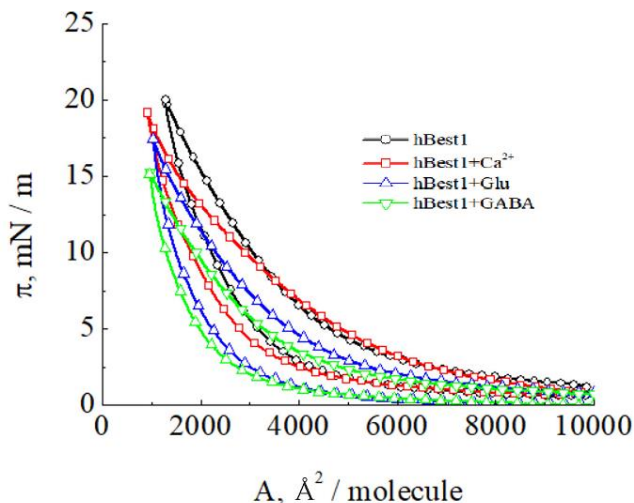


Фиг. 2 Модул на свиваемост като функция от повърхностното налягане ( $C_s^{-1}/\pi$ ) на монослоевете от hBest1 в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA при температура  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Кривите се припокриват и демонстрират аналогичен ход, характеризиращ се с плавно увеличаване на  $Cs^{-1}$  с увеличаване на стойностите на повърхностно налягане от 0 до 10 mN/m (дължи се на уплътняването на протеиновите монослое), последвано от минимално понижаване (1.8 mN/m, повишаване на еластичността на монослоеве), което може да се обясни с реориентацията на протеиновите молекули на повърхността или с тяхното потъване в субфазата.

Хистерезисът на даден монослой представлява разликите в молекулните площи в  $\pi/A$  кривите на свиване и разширяване при дадено повърхностно налягане.

$\pi/A$  хистерезисните криви на монослое на hBest1 върху различни подложки са представени на Фиг. 3.



Фиг. 3  $\pi/A$  хистерезисни криви на монослое от hBest1 в присъствие на  $Ca^{2+}$ , Glu и GABA при температура  $35 \pm 2^\circ C$ .

Разликите в заеманата площ в участъците на хистерезисната крива, индикиращи свиване и разпускане при фиксирани повърхностно налягане от 5 и 10 mN/m  $\Delta A$  ( $\Delta A^5$  и  $\Delta A^{10}$  хистерезиси), са представени в Таблица 1.

Моделна система	$\Delta A_5, \text{\AA}^2/\text{молекула}$	$\Delta A_{10}, \text{\AA}^2/\text{молекула}$
hBest1 <sup>NaCl</sup>	2160±160	1180±160
hBest1 <sup>Ca</sup>	2500±100	1300±160
hBest1 <sup>GLU</sup>	1450±90	730±70
hBest1 <sup>GABA</sup>	1120±15	520±10

Таблица 1. Стойности на хистерезиса на монослоеве от hBest1 при повърхностно налягане 5 и 10 mN/m.

И в двата типа експериментални постановки ( $\Delta A^5$  и  $\Delta A^{10}$ ) се наблюдава значителен хистерезис. Разликата между стойностите на хистерезисните бримки образувани при свиване и разширение при фиксирано повърхностно налягане от 5 mN/m и 10 mN/m намаляват в следния ред:  $\Delta A^{\text{Ca}} > \Delta A^{\text{NaCl}} > \Delta A^{\text{Glu}} > \Delta A^{\text{GABA}}$ . Всички криви на свиване са по-стръмни и локализирани при повисоки молекулни площи в сравнение с кривите на разширение. Това свидетелства за различни механизми на взаимодействие между молекулите по време на компресия и декомпресия, както и за промяна във физикохимичните характеристики на самия монослой. Физикохимичните промени се дължат на необратимите процеси по време на свиване и разширяване на филма (и/или на частично необратимия ефект на „потъване“ на белтъчни молекули в субфазата).

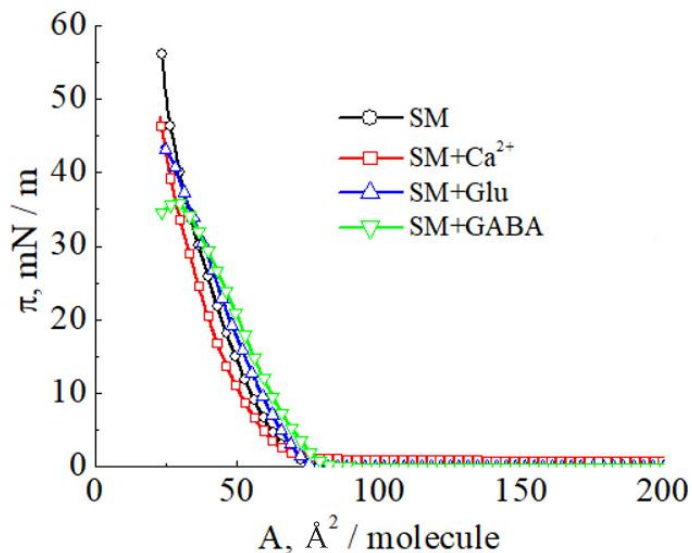
Въпреки приликите, установени при сравнението на кривите на компресиране и разпускане, при четирите експериментални постановки (при „чист“ NaCl и при добавяне на Ca<sup>2+</sup>, Glu, и GABA) се наблюдават и някои значителни разлики. При hBest1<sup>Ca</sup> и hBest1<sup>Glu</sup> се наблюдава съвпадение по хоризонталата на  $\pi/A$  кривите на компресия и декомпресия (което е индикация, че крайното състояние на слоя при декомпресия е същото, както началното състояние на слоя при компресия). При hBest1<sup>NaCl</sup> и hBest1<sup>GABA</sup> такова съответствие не се наблюдава - монослой е по-релаксиран след разширение, отколкото в началното си състояние (преди свиване), което предполага необратима преориентация на молекулите hBest1 в интерфазата въздух/вода и необратими промени в структурата на слоя.

Въздействието на Ca<sup>2+</sup>, Glu и GABA върху монослой от hBest1 при стайна температурата (около 20-25°C), дава различни резултати [18]. Началната стойност ( $\pi_0 = 0.7$  mN/m) на повърхностното налягане при нанасяне на монослоеве от hBest1 при около 25 °C се различава от измерената начална стойност ( $\pi_0 = 1.2$  mN/m) при 35±2 °C. Молекулните площи на hBest1 при дадено налягане и стойностите на хистерезисите също се променят в различен ред при добавяне на компоненти към подложката, което се дължи на различното физикохимично състояние на монослойа и влиянието на топлинните ефекти, определящи различна конформация на белтъка и различна „склонност“ за встъпване във взаимодействия с Ca<sup>2+</sup>, Glu и GABA.

Различните стойности в  $\pi/A$  изотермите, хистерезисните криви и кривите на модула на свиваемост на hBest1 при 25 °C в сравнение с тези при 35 °C показва различно повърхностно поведение на белтъка, свързано с промени в конформацията и организацията на молекулите в монослойа.

## 1.2 Ефекти на $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA върху Лангмюирови монослоеове от сфингомиелин.

$\pi/A$  изотермите получени при компресирането на монослоеове от сфингомиелин върху подложка от физиологичен разтвор при температура от  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  и в присъствието на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu или GABA са представени във фигура 4.



Фиг. 4  $\pi/A$  изотерми на монослоеове от SM в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu или GABA при температура  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

При температура близка до физиологичната монослоеве от сфингомиелин със средна дължина на веригите на мастната киселина (от 14:0 до 26:0) претърпяват фазов преход от течна-разтегната (LE, liquid-expanded, произволно ориентирани въгледородни вериги) към течна-кондензирана (LC, подредени вериги) фаза. За сравнение – при SM с по-къса мастна киселина (12:0) се наблюдава само LE състояние в целия температурен диапазон 10–30°C, при което отсъстват индикации за двуизмерни фазови преходи. Повърхностното налягане, при което се наблюдава фазов преход ( $\pi_{tr}$ ), е силно зависимо от температурата и дължината на ацилните вериги. Колкото по-висока е температурата и колкото по-къси са ацилните вериги, толкова по-високо е  $\pi_{tr}$  [22].

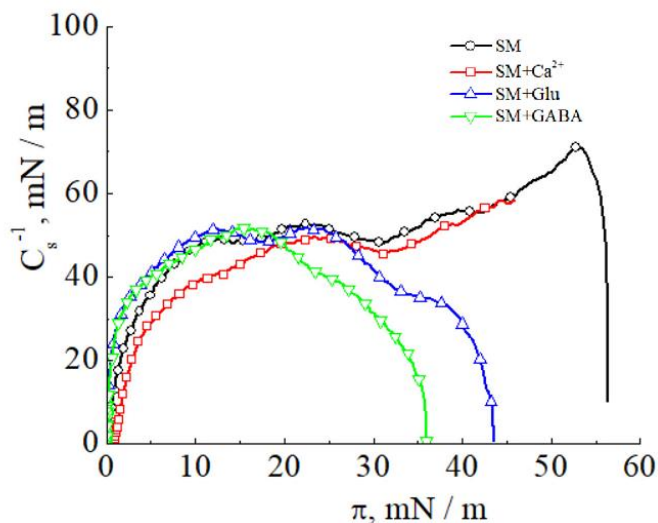
При монослоеве от SM на подложка от NaCl и в присъствие на  $Ca^{2+}$  (16:0 SM и  $35 \pm 2^\circ C$ ) LE-LC фазов преход се наблюдава при относително високо повърхностно налягане  $\pi_{tr} = 46.8 \text{ mN/m}$ . Поради факта, че монослоеве от SM в присъствие на Glu или GABA претърпяват колапс при по-ниско повърхностно налягане от стойността на  $\pi_{tr}$  ( $\pi_{col} < \pi_{tr}$ ), те се намират само в LE състояние и не се наблюдават никакви други фазови преходи.

Това би могло да се дължи на свързването на Glu и GABA към полярната глава на SM, което води до увеличаване на нейната площ и намаляване на кондензацията на веригите характерна за LC фазовото състояние.

За разлика от белтъчните монослоеве, добавянето на компоненти към подложката не повлиява началната стойност на повърхностното налягане след разтичане на SM. Всички изотерми показват подобен ход до достигане на около 30 mN/m. В литературата се срещат данни, че Glu и GABA могат да

взаимодействат с разнообразни по вид фосфолипиди, включително SM [23]. Добавянето на Glu и GABA води до промяна в наклона на изотермите към високи стойности на молекулната площ и колапсът се установява при по-ниско повърхностно налягане (Фиг. 4). Тези разлики са най-отчетливи при изотермите на  $SM^{GABA}$ . При прибавянето на  $Ca^{2+}$  се наблюдава противоположен ефект върху изотермите – средната молекулна площ се измества към по-ниски стойности, както беше установено и при монослоеве от hBest1.

При промяна на състава на подложката,  $C_s^{-1}/\pi$  зависимостите на монослоеве от SM показват различен ход (Фиг. 5).





*Фиг. 5 Модул на свиваемост като функция от повърхностното налягане на ( $Cs^{-1}/\pi$ ) на монослоеве от SM в присъствие на  $Ca^{2+}$ , Glu и GABA при температура  $35\pm 2^\circ C$ .*

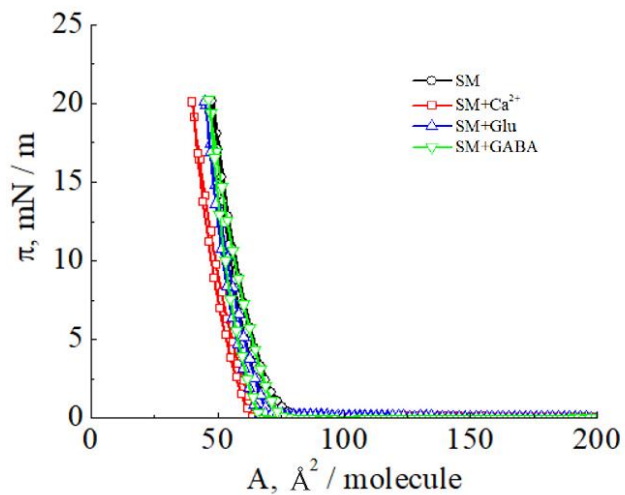
При подложка от NaCl в присъствие и отсъствие на  $Ca^{2+}$ , монослоеве се характеризират с начално увеличаване на модула на свиваемост от 0 до 50 mN/m (което отговаря на LE фаза), което е придружено с увеличаване на повърхностното налягане до 12 mN/m (за  $SM^{NaCl}$ ) и до 24 mN/m (за  $SM^{Ca}$ ). По време на компресия на  $SM^{NaCl}$  и  $SM^{Ca}$  до 30 mN/m,  $Cs^{-1}$  остава константен ( $50 \pm 3$  mN/m). При продължаване на свиването се наблюдава рязко покачване на  $Cs^{-1}$ , като се достига максимум от 70 mN/m при повърхностно налягане от 53 mN/m, което съответства на фазов преход от LE към междинна/интермедиерна (M) фаза (която е смес от LE и LC фази). Получените данни съответстват на резултати, докладвани от Ли и съавтори [24]. Крайният рязък спад в  $Cs^{-1}$  се наблюдава при колапс на монослоя.

При изследване на зависимостите  $Cs^{-1}/\pi$  на монослоеве от  $SM^{Glu}$  и  $SM^{GABA}$  се установява само един максимум. След увеличаване на  $Cs^{-1}$  от 0 до 50 mN/m (което съответства на LE фаза) се отчита намаляване до 0, което се дължи на колапс на монослоеве. Платата, наблюдавани при 35 mN/m и 25 mN/m съответно, представляват инфлексни точки в изотермите, където монослоеве от  $SM^{Glu}$  и  $SM^{GABA}$  се дестабилизира. Тази зависимост е допълнително потвърждение, че тези две моделни системи съществуват единствено в LE фаза и не претърпяват други фазови преходи.

На фиг. 6 са представени хистерезисните криви на сфингомиелин получени при свиване на слоя до 20 mN/m и последващо релаксиране до

началната площ (експерименталната постановка е сходна с тази за hBest1). Всички получени  $\pi/A$  криви на разширение са сходни и аналогични на кривите на свиване, но изместени към по-ниски средни молекулни площи. Тази тенденция е индикация за разлика в състоянието на уплътняване, реорганизация, реориентация на монослоеве при свиване и разширяване, но стойностите на началното повърхностно налягане и на крайните стойности след разширение на слоя са еднакви, което показва обратимост на протичащите реорганизационни процеси.

$\pi/A$  кривите на свиване и разширение на SM показват малък хистерезис, независимо от състава на подложката (Таблица 2). Стойностите на хистерезиса на монослоеве от SM са между между 5 и 10% от площта, заемана от 1 молекула SM и показват, че подравняването, ориентацията и конформацията на молекулите в монослоя са еднакви при компресия и декомпресия, в сравнение с монослоеве от hBest1 (при подложка NaCl и при добавяне на Ca, Glu или GABA), където се наблюдава значителен хистерезис (между 50% и 100% от площта заемана от една hBest1 молекула).



Фиг. 6  $\pi/A$  хистерезисни криви на монослоеве от SM в присъствие на  $Ca^{2+}$ , Glu и GABA при температура  $35 \pm 2^\circ C$ .

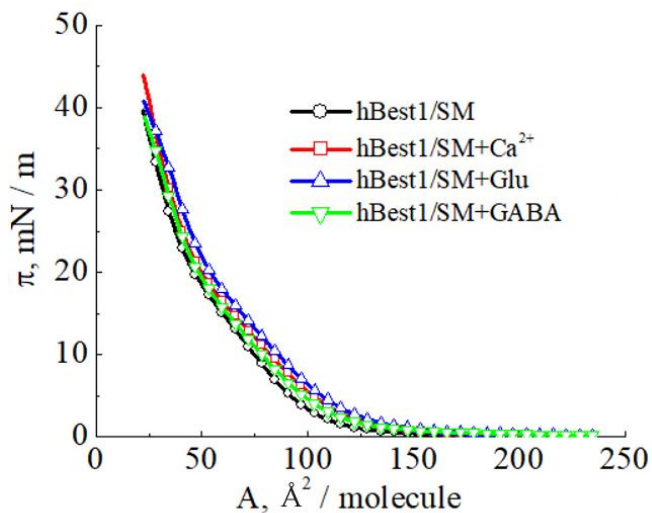
Моделна система	$\Delta A_5, \text{\AA}^2/\text{молекула}$	$\Delta A_{10}, \text{\AA}^2/\text{молекула}$
SM <sup>NaCl</sup>	3±1	2±1
SM <sup>Ca</sup>	3±1	2±1
SM <sup>GLU</sup>	5±1	3±1
SM <sup>GABA</sup>	7±1	5±1

Таблица 2. Стойности на хистерезиса на монослоеве от сфингомиелин при стойности на повърхностно налягане 5 и 10 mN/m.

### 1.3 Ефекти на Ca<sup>2+</sup>, Glu и GABA върху смесени hBest1/SM Лангмюирови монослоеве

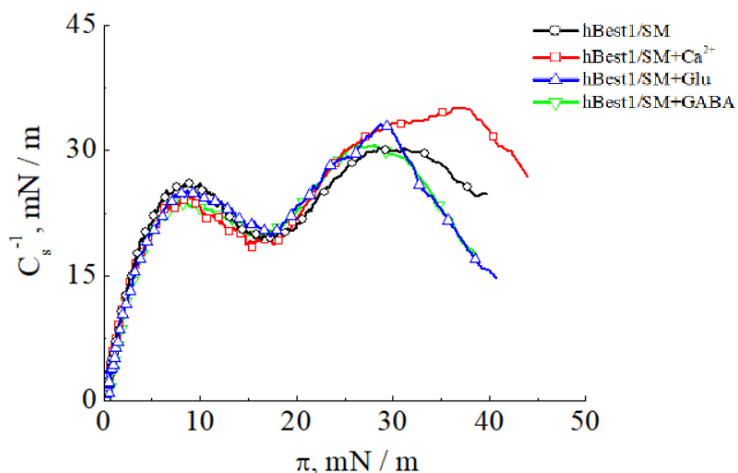
В смесените монослоеве, съдържащи hBest1 и SM, е избрано съотношение от 1/3 между площта, която заемат белтъчните молекули, към тази, която заемат липидните. Подобно е съотношението белтък/липид при мембраната на човешките еритроцити [25]. При повърхностно налягане от 20 mN/m площта, заемана от една hBest1 молекула (Фиг.1) е 28,5 пъти по-голяма от площта, заемана от една молекула SM (Фиг. 4). Това определя моларно съотношение на двата компонента е 1/86 (това е отношението на hBest1 и SM, което е използвано в нашите изследвания, освен ако не е опоменато друго).

За разлика от монослоевите от hBest1 (Фиг. 1), двукомпонентните hBest1/SM филми (1/86) в присъствие на Ca<sup>2+</sup>, Glu и GABA показват идентичен ход на  $\pi/A$  изотермите, който е сходен с този на изотермите, получени при изследване на SM (Фиг 7).



Фиг. 7  $\pi/A$  изотерми на hBest/SM1 монослоеве в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA при температура  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

След нанасяне на компонентите и установяване на равновесие, началното повърхностно налягане клони към 0, което също е сходно с началното състояние на монослоеве от SM. Два региона с различни наклони се дефинират ясно в  $\pi/A$  кривите като преходът между тях се наблюдава при  $\pi_{tr}$  около 20 mN/m. Точната стойност на  $\pi_{tr}$  може да бъде установена от  $Cs^{-1}/\pi$  зависимостите (Фиг 8), където има два ясно изразени максимума на модула на свиваемост, между които се наблюдава минимум от 17 mN/m.



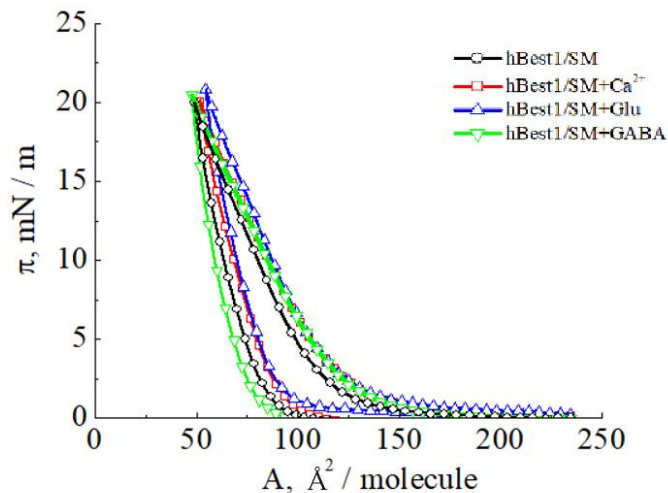
Фиг. 8 Модул на свиваемост като функция от повърхностното налягане ( $C_s^{-1}/\pi$ ) на *hBest1/SM* монослое в присъствие на  $Ca^{2+}$ , *Glu* и *GABA* при температура  $35 \pm 2^\circ C$ .

По правило минимумът представлява преходът между две фазови състояния, които се обособяват като двата максимума в  $C_s^{-1}/\pi$  кривите. Въпреки това, стойността на модула на свиваемост и на двата пика е областта от 10-50 mN/m (LE фаза), което означава, че двукомпонентната монослойна *hBest1/SM* система не претърпява промяна във фазовото си състояние. Стойностите на  $\pi$ , при които се наблюдава първият максимум (около 8 mN/m) съответства на резултатите получени при изследване на чисти слоеве *hBest1*, следователно най-вероятно този пик се дължи на промяна в състоянието на белтъчните молекули. Вторият максимум се наблюдава при  $\pi$  от около 28-30

mN/m. Тези стойности са значително по-ниски в сравнение с  $\pi/A$  изотермите на монослой от SM, което може да се обясни с процесите на колапс на смесения монослой.

Стойността на  $\pi_{tr}$  не се повлиява при прибавянето на  $Ca^{2+}$ , Glu или GABA. hBest1 намалява общата стойност на модула на свиваемост на SM монослоеве, което предполага „втечняване“ на SM филмите и би могло да предотвратява LE-M фазов преход, който се наблюдава при монослоеве  $SM^{NaCl}$  и  $SM^{Ca^{2+}}$  поради повишаване на еластичността (Фиг 5).

$\pi/A$  кривите на свиване и разширяване (Фиг. 9) показват ход, много подобен на този при hBest1.



e

Фиг. 9  $\pi/A$  хистерезисни криви на hBest\SM монослоеве в присъствие на  $Ca^{2+}$ , Glu и GABA при температура  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Кривите на декомпресия са по-стръмни и се намират при по-ниски молекулни площи, отколкото тези на свиване. Наблюдава се значителен хистерезис достигащ 40% от средната молекулна площ (Таблица 3). Изследванията са проведени при различни моларни съотношения, които са указани в таблицата.

Моделна система	$\Delta A_5, \text{\AA}^2/\text{молекула}$	$\Delta A_{10}, \text{\AA}^2/\text{молекула}$
hBest1/SM <sup>NaCl</sup> (1/86)	24 ± 2	16 ± 1
hBest1/SM <sup>Ca</sup> (1/86)	27 ± 1	18 ± 1
hBest1/SM <sup>GLU</sup> (1/86)	26 ± 1	19 ± 1
hBest1/SM <sup>GABA</sup> (1/86)	40 ± 1	26 ± 1
hBest1/SM <sup>NaCl</sup> (1/45)	40 ± 2	26 ± 1
hBest1/SM <sup>Ca</sup> (1/45)	46 ± 5	33 ± 3
hBest1/SM <sup>GLU</sup> (1/45)	40 ± 3	27 ± 1
hBest1/SM <sup>GABA</sup> (1/45)	65 ± 4	43 ± 2
hBest1/SM <sup>NaCl</sup> (1/1)	1140 ± 90	620 ± 60
hBest1/SM <sup>Ca</sup> (1/1)	980 ± 30	530 ± 20
hBest1/SM <sup>GLU</sup> (1/1)	730 ± 10	370 ± 10
hBest1/SM <sup>GABA</sup> (1/1)	1110 ± 80	580 ± 50



Таблица 3: Стойности на хистерезиса на двукомпонентни hBest1/SM монослоеве при повърхностно налягане 5 и 10 mN/m.

Възможни причини за възникването на такъв хистерезис са необратимите конформационни промени и изтласкването на белтъчните молекули във водната фаза по време на свиване на филма. Стойностите на хистерезиса на двукомпонентните монослоеве се увеличават в обратен ред на тези, които се наблюдават при hBest1 монослоеве:  $\Delta A^{GABA} > \Delta A^{Glu} > \Delta A^{NaCl} > \Delta A^{Ca}$ . Това би могло да се дължи на по-голямото количество (по-голяма молна част) на SM в изучаваните двукомпонентни монослоеве.

По-рязкото увеличаване на повърхностното налягане след преминаване на  $\pi_{tr}$  наподобява изотермите на SM. В допълнение, екстраполацията на тези стръмни участъци на изотермите за SM и hBest1/SM към абсцисата показва същата стойност на молекулна площ, както при отсъствие на компресия,  $A_0 = 60 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$ , което демонстрира, че само молекулите от SM присъстват на повърхността при стойности надвишаващи  $\pi_{tr}$ .

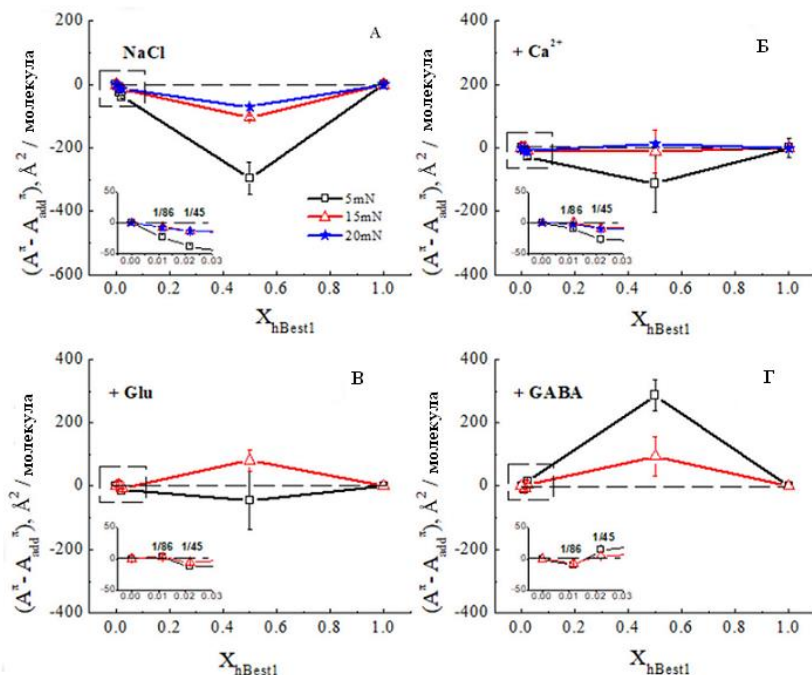
При предишната работа на колектива беше изследвано взаимодействието между hBest1 и POPC при 25 °C, подложка от NaCl и при добавяне на компоненти ( $Ca^{2+}$ , Glu и GABA). При тези експерименти беше използвано аналогично съотношение по площ белтък/липид, съответно 1/3.

При повърхностно налягане под  $\pi_{tr}$ ,  $\pi/A$  изотермите на бинарните hBest1/POPC филми силно наподобяват тези при hBest1 монослоеве докато при  $\pi > \pi_{tr}$  (над 35 mN / m) изотермите се припокриват с тези на POPC. При

изследване на  $Cs^{-1}/\pi$  кривите на hBest1/POPC (1/45) и hBest1/SM монослоеве се наблюдават значителни различия в зависимост от използвания липид. При филмите с POPC не се наблюдават ясно изразени пикове и плата, а постепенно изкачване на кривите до достигане на повърхностно налягане от около 31 mN/m, след което рязко покачване до около 35 mN/m, което съответства на инфлексната точка в  $\pi/A$  изотермите (индикация за начало на колапс на монослоя). При филмите със SM се наблюдават два пика на  $Cs^{-1}/\pi$  кривите (около 8 mN/m и 28-30 mN/m), което показва различните физикохимични свойства на монослоеве, разлика във взаимодействията белтък липид, и различна молекулна организация. Значителен хистерезис се наблюдава и при двата двукомпонентни монослоя. Добавянето на  $Ca^{2+}$ , Glu и GABA към монослоеве hBest/POPC не води до значителни промени в хистерезисните криви, което показва, че POPC елиминира ефекта на  $Ca^{2+}$ , Glu и GABA [18]. Значително по-ниските крайни стойности на повърхностното налягане след декомпресия на монослоя, сравнено с началните, са индикация за необратими промени, настъпващи в неговата структура. При монослоеве от hBest1 и SM хистерезисните криви имат по-стръмен ход (което може да се обясни с по-голямото моларно отношение (1/86) и силно изразен ефект на  $Ca^{2+}$ , Glu и GABA [26].

## 2. Смесваемост на hBest1 и SM в Лангмюирови монослоеве.

За изследване на смесваемостта и поведението на двукомпонентни hBest1/SM монослоеве, бяха използвани средните молекулни площи ( $A^{\pi}$ ) получени от  $\pi/A$  изотермите при налягания от 5, 15 и 20 mN/m (стойности под  $\pi_{tr}$ ) (Фиг 7). Тъй като изотермите на hBest1<sup>Glu</sup> и hBest1<sup>GABA</sup> не достигат 20 mN/m,  $A^{\pi}$  при тези повърхностни налягания не са включени в изследванията.



Фиг 10: Графики, описващи отклоненията по адитивната линия на експериментално установената молекулна площ  $A^{\pi}$  спрямо молната част на компонентите в hBest/SM монослоеве в присъствие на подложка от NaCl (A) и при добавяне на  $Ca^{2+}$  (Б), Glu (В) и GABA (Г) при повърхностни налягания от 5 mN/m, 15 mN/m и/или 20 mN/m и температура  $35 \pm 2^{\circ}C$ . Данните са представени като средна стойност  $\pm SE$ .

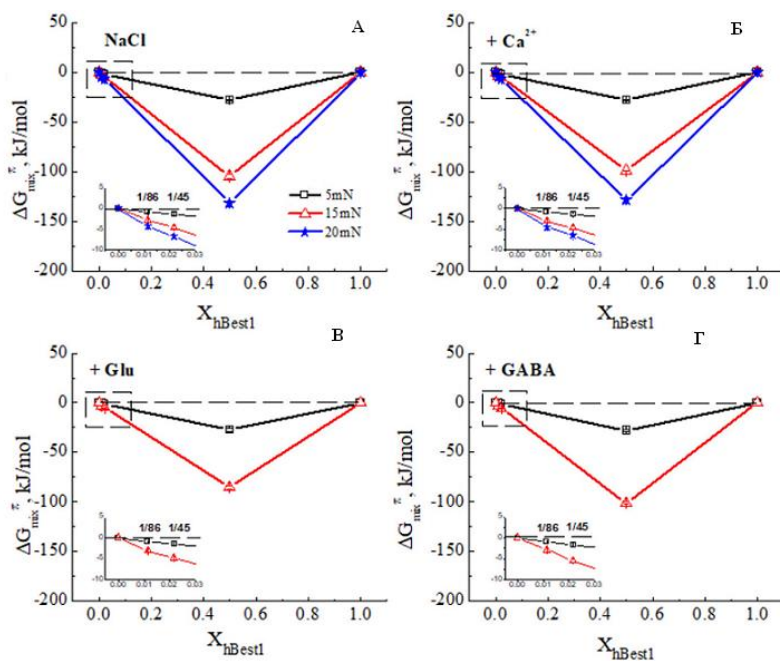
Изчислените теоритични молекулни площи  $A_{add}^{\pi}$  съответстват или на пълно смесване или на пълно фазово разделяне на hBest1 и SM в монослоеве. Средната площ  $A^{\pi}$  на двуконпонентната hBest1/SM моделна

система върху подложка от NaCl показва отрицателни стойности от адитивната линия при всички моларни отношения на компонентите (1/86, 1/45 и 1/1) (Фиг. 10 А). Това предполага, че междумолекулните взаимодействия между hBest1 и SM са по-силни от взаимодействията между hBest1 - hBest1 или SM - SM, което най-ясно се демонстрира при молно отношение 1:1. Това означава, че „неидеалното“ молекулно смесване преобладава в hBest1/SM монослоеве (фиг 10 А). При увеличаване на повърхностното налягане  $A^\pi$  стойностите клонят към  $A_{add}^\pi$ , което предполага увеличаване на смесваемостта.

Средната молекулна площ  $A^\pi$  на hBest1/SM монослоеве, нанесени върху подложка с  $Ca^{2+}$ , нараства линейно с увеличаване на молната част на hBest1, като следва адитивната линия при 15 и 20 mN/m (Фиг 10 Б). В този случай може да се предположи, че междумолекулните взаимодействия между hBest1 и SM са почти равни на тези между hBest1-hBest1 и SM-SM, което показва идеално смесване или пълно фазово разделяне. В присъствие на Glu, при ниско повърхностно налягане взаимодействието между hBest1-SM е относително по-силно от това между hBest1-hBest1 и SM-SM. При по-високи стойности на повърхностното налягане (при около 15 mN/m) това взаимодействие отслабва и в стойностите за молекулната площ се отчита положително отклонение спрямо адитивната линия, което е индикация за увеличаване силите на отблъскване между молекулите на hBest1 и SM (Фиг 10 В). Добавянето на GABA също води до „разделяне“ на белтъчните и липидните молекули (Фиг. 10 Г). Този ефект намалява с увеличаването на повърхностното налягане. Взаимодействието на Glu и GABA с полярните глави на SM би могло да доведе до възникване на сили на отблъскване между hBest1 и SM или до сили на привличане и „включването“ на Glu и GABA в двукомпонентните монослоеве. Това е възможно обяснение за наличието на

по-голяма площ за молекула, която се отчита при hBest1/SM<sup>Glu</sup> и hBest1/SM<sup>GABA</sup> монослоевете.

Смесването между hBest1 и SM в двукомпонентни монослоевете беше определено количествено по метода на Гудрич [27] чрез изчисляване на остатъчната (excess  $\Delta G_{\text{exc}}^\pi$ ) и тоталната свободна енергия на Гибс на смесване  $\Delta G_{\text{mix}}^\pi$ . Тъй като енергията при идеално смесване е пренебрежимо малка в сравнение с остатъчната енергия на смесване, може да приемем стойностите на  $\Delta G_{\text{exc}}^\pi$  и  $\Delta G_{\text{mix}}^\pi$  за равни. По тази причина са описани само  $\Delta G_{\text{mix}}^\pi$ , която е показана на Фигура 11.



Фиг. 11: Графики, описващи отклоненията по адитивната линия на стойностите на тоталната свободна енергия на Гибс (на смесване,  $\Delta G_{\text{mix}}^{\pi}$ ) спрямо молната част на компонентите в hBest/SM монослое в присъствие на подложка от NaCl (А), при добавяне на  $\text{Ca}^{2+}$  (Б), Glu (В) и GABA (Г) при повърхностно налягане от 5 mN/m, 15 mN/m и/или 20 mN/m и температура  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Данните са представени като средна стойност  $\pm \text{SE}$ .

Изотермите на hBest1<sup>Glu</sup> и hBest1<sup>GABA</sup> не достигат до 20 mN/m, затова за тях не са изчислявани  $\Delta G_{\text{exc}}^{\pi}$  и  $\Delta G_{\text{mix}}^{\pi}$ . Тоталната свободна енергия на смесване зависи от състава на монослоя и стойността на повърхностното налягане, като не се повлиява от присъствието на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu или GABA. Отрицателните стойности на  $\Delta G_{\text{exc}}^{\pi}$  and  $\Delta G_{\text{mix}}^{\pi}$  предполагат, че двукомпонентната моделна система hBest1/SM е по-стабилна от едноконпонентните hBest1 или SM монослое. И смесването между hBest1 и SM при дадените условия е спонтанно. При увеличаване на повърхностното налягане се понижава още повече стойността на  $\Delta G_{\text{exc}}^{\pi}$  и  $\Delta G_{\text{mix}}^{\pi}$ , което допълнително повишава стабилността на слоевете и смесваемостта между белтъка и липида – межумолекулните взаимодействия са по-силни, когато двукомпонентните системи са в условия на по-„кондензирано“ състояние. Минималната стойност на свободната енергия на Гибс е при  $X_{\text{hBest1}} = 0.5$ , което показва, че еквимоларното смесване е най-термодинамично стабилно.

При изследване на hBest1/ПОРС монослое при моларни съотношения 1/45 и 1/1 бяха установени положителни стойности на свободната енергия  $\Delta G_{\text{mix}}^{\pi}$ , което е индикация за фазово разделяне, както и негативни стойности на свободната енергия при съотношение 1/15, което е

индикация за смесваемост. Смесваемостта между hBest1 и SM най-вероятно е свързана с взаимодействие на amidните и хидроксилните групи на SM, които изпълняват ролята на донори и акцептори за водородни връзки, докато фосфатидилхолинът изпълнява роля единствено на акцептор (естерните карбонилни групи) в белтък-липидните взаимодействия [18].

Спонтанната смесваемост на hBest1 и SM в монослой е тяхно основно физикохимично свойство и е предпоставка за силни белтък-липидни взаимодействия.

Различното повърхностно поведение на hBest1/SM монослоя при различни моларни съотношения и при добавянето на различни компоненти показва възможността за промяна в конформацията, динамиката, стабилността, и организацията на белтъка в клетъчната мембрана. Промяната в липидното съотношение в нативните биологични мембрани, нивата на биосинтеза на липидите и таргетирането им към определени мембранны участъци, което генерира и поддържа мембранната хетерогенност, е начин за регулация на активността и функциите на hBest1.

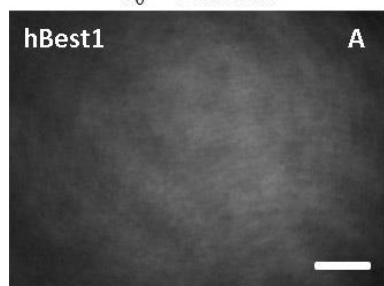
### **3. Ефект на $Ca^{2+}$ , Glu и GABA върху морфологията на hBest1, SM, и смесени hBest1/SM Лангмюирови монослоеве**

**3.1 Ефект на  $Ca^{2+}$ , Glu и GABA върху морфологията на Лангмюирови монослоеве от hBest1** За анализране на морфологията на монослоеве от hBest1 при 35°C и с променлив състав ( $Ca^{2+}$ , Glu или GABA) на подложката беше използван ВМ. След всяко нанасяне на белтъка слой се оставяше в покой 30 минути за достигане на равновесие. Изображенията бяха заснемани при повърхностни налягания от 0 mN/m и 15 mN/m (Фиг. 12). При монослоеве от

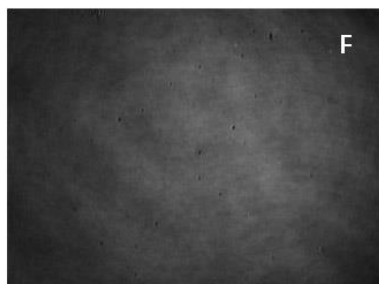
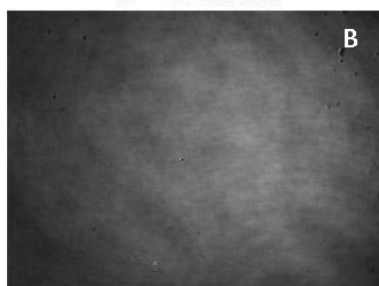
$hBest1^{NaCl}$  и  $hBest1^{GABA}$  се наблюдаваше хомогенност. При  $hBest1^{Ca^{2+}}$  и  $hBest1^{Glu}$ , монослоевеите демонстрират ясна хетерогенност, с различни по интензитета области на изображението. По-светлите области представляват струпвания от молекули, като разликите в интензитета предполагат различни нива на компактизация и молекулна плътност. По-тъмните участъци представляват незаетите от молекулите места.



$\pi_0 \sim 0$  mN/m



$\pi = 15$  mN/m



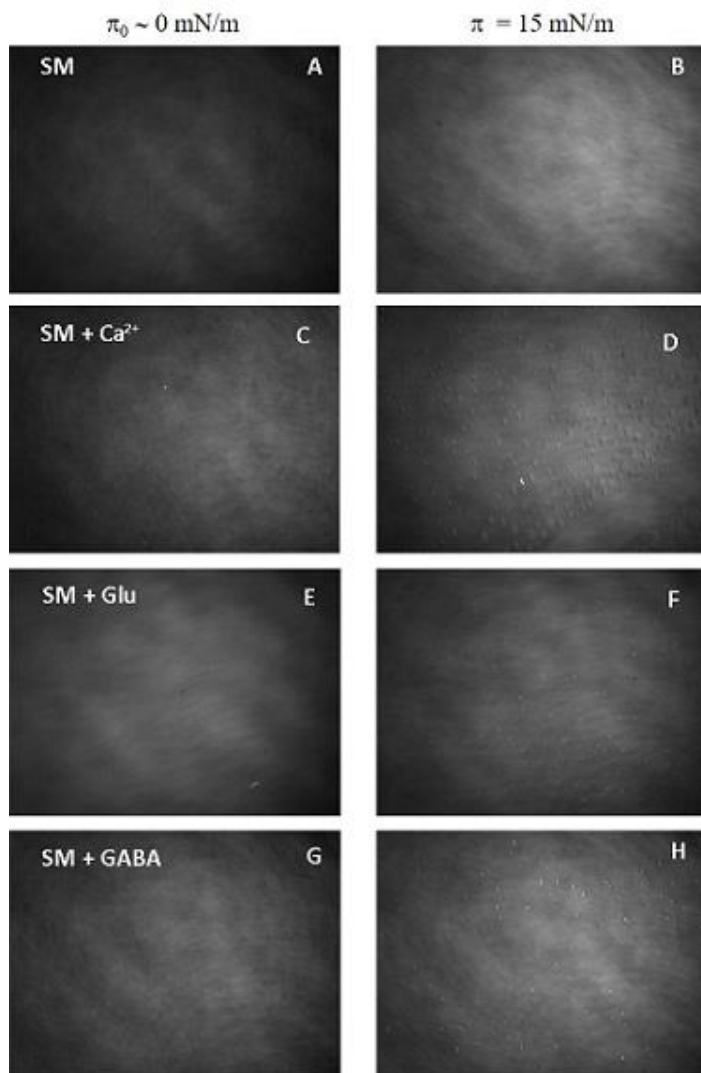
Фиг. 12 ВМ изображения на монослоевете от *hBest1*, върху подложка от 150 mM NaCl (А и В) и в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  (С и D), Glu (Е и F) или GABA (G и H) при некомпресирани слоеве (лява колона), и след компресия (дясна колона) при температура  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Мащабна линия (scale bar) = 100  $\mu\text{m}$ .

С увеличаване на повърхностното налягане се наблюдава намаляване на количеството на тъмните (незаети) участъци, но запазване на хетерогенността (Фиг 12 D, F). Образоването на молекулни струпвания в *hBest1* монослоя при добавяне на  $\text{Ca}^{2+}$  и Glu биха могли да обяснят изместването на изотермите към по-ниски молекулни площи, макар че при добавяне на GABA, хомогенността се запазва. Получените резултати предполагат разлики във взаимодействията между молекулите на липида и белтъка в зависимост от наличието на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu или GABA, водещи до промяна в конформацията, ориентацията и организацията на молекулите на фазовата граница вода/въздух.

Подобни резултати са получени при изследванията на колектива за *hBest1* монослоевете при различни повърхностни налягания (0 mN/m и 20 mN/m) и при  $25^\circ\text{C}$ . При монослоевете на подложка от чист NaCl и при добавяне на GABA се наблюдава хомогенна морфология. При добавяне на  $\text{Ca}^{2+}$  и Glu слоевете са хетерогенни с ясно видими по-тъмни овални региони (показват наличие на фаза с по-ниска плътност, газова фаза). Свиването на *hBest1*<sup>Ca<sup>2+</sup></sup> и *hBest1*<sup>Glu</sup> монослоевите води до намаляване на тъмните участъци (уплътняване на монослоя), но запазване на хетерогенността.

### ***3.2 Ефект на $Ca^{2+}$ , Glu и GABA върху морфологията на Лангмуирови монослоеве от сфингомиелин***

*ВАМ изображенията на монослоеве съдържащи SM бяха направени при температура от  $35\pm 2C^{\circ}$ . След нанасяне на липида слоевете се оставяха в покой 30 минути за достигане на равновесие. Повърхностните налягания, при заснемането бяха  $0\text{ mN/m}$  и  $15\text{ mN/m}$  при еднокомпонентни монослоеве от SM върху подложка от NaCl и при добавяне на  $Ca^{2+}$ , Glu и GABA (Фиг. 13).*



Фиг 13: BAM изображения на морфологията на монослоеве от SM, върху подложка от 150 mM NaCl (A и B) и в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  (C и D), Glu (E и F)

*или GABA (G и H) при некомпресирани слоеве (лява колона), и след компресия (дясна колона) при температура  $35\pm 2^\circ\text{C}$ . Мащабна линия (scale bar) = 100  $\mu\text{m}$ .*

При ниско налягане монослоевите от SM демонстрират очаквана хомогенна структура [28]. Не се наблюдават съществени разлики при повишаване на налягането до 15mN/m. При дадените условия филмът се намира в течно-разтегната фаза, което кореспондира с получените резултати от изотермите и хистерезисните криви (не се наблюдава рязка промяна в хода на графиката). Добавянето на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA не води до съществена промяна в морфологията при ниски налягания. При достигане на налягане от 15mN/m се наблюдават ярки домени, поради появата на относително малки участъци от по-кондензирана фаза. Получените домени са овални и със сходни размери. Появата им може да бъде обяснена с взаимодействието, което възниква между полярните глави на липида и добавянето на компоненти  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu или GABA. В свое проучване Руджой и колектив стигат до заключението, че  $\text{Ca}^{2+}$  си взаимодейства с полярните глави, което води до дехидратация. Също така, според Руджой и колектив добавянето на  $\text{Ca}^{2+}$  води до по-силно свързване на съседни сфингомиелинови молекули чрез образуване на „по-здрави“ водородни връзки между amidните групи [29].

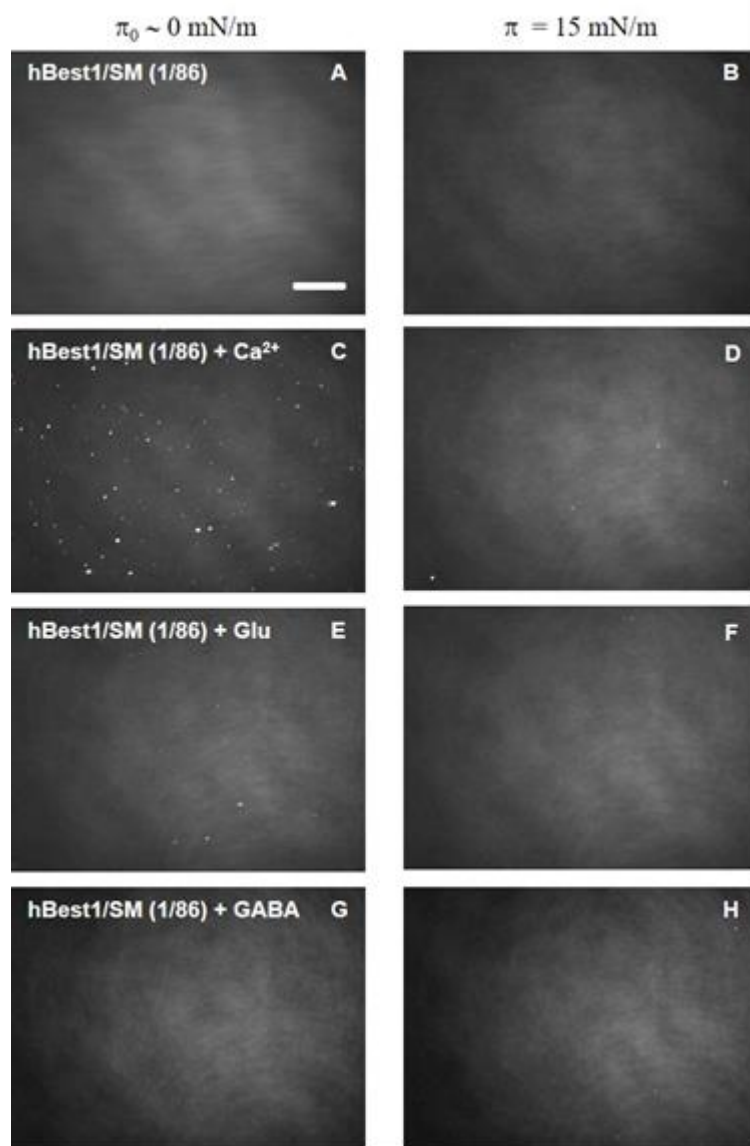
Наблюдаваните домени биха могли да са резултат от локално уплътняване на монослоя, което се дължи на взаимодействията, предизвикани от  $\text{Ca}^{2+}$ , без да се наблюдава промяна във фазовото състояние на монослоя, което се доказва от изотермите. В литературата отсъстват данни за взаимодействието на GABA и Glu със сфингомиелин при условия, сходни с експерименталните. Въпреки това, Белтрамо и колектив доказват взаимодействието на GABA със сфингомиелин, сулфатид, фосфатидилхолин,

фосфатидилсерин, фосфатидилетаноламин и фосфатидилова киселина и липсата на взаимодействие с холестерол и церамид, в милимолярни концентрации, но при различни условия [30].

### **3.3 Ефект на $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA върху морфологията на hBest1/SM Лангмюирови монослоеве**

ВМ изображенията на бинарни монослоеве от hBest1/SM при съотношение 1/86 показват компактност и хомогенност, както при 0 mN/m, така и при 15mN/m (Фиг. 14 А, В). Не се наблюдават индикации на фазово разделяне, формиране на домени или фазови преходи. Добавянето на GABA не води до промяна в морфологията на монослоеве (Фиг 14 G, H). Добавянето на  $\text{Ca}^{2+}$  води до частично фазово разделяне на hBest1 и SM. След нанасяне на слоя и постигане на равновесие се наблюдава появата на малки заоблени домени (визуализират се като ярки формирования) с микрометрични размери (Фиг 14 С). При увеличаване на повърхностното налягане броя и размера на домовете намалява и те вече не се наблюдават (изчезват) при 15mN/m (Фиг 14 D). При монослоеве с добавен Glu също се наблюдава известно фазово разделяне, но размерите, броя на домовете и интензитета на светене са значително по-малки, в сравнение с добавени  $\text{Ca}^{2+}$  йони (Фиг 14 E). При достигане на 15 mN/m микродомите изчезват (Фиг 14 F). Тези резултати отговарят на резултатите, получени при термодинамичните анализи за смесваемостта на hBest1 и SM като демонстрират, че смесването и межумолекулните взаимодействия в бинарните монослоеве се увеличават с нарастване на повърхностното налягане. Предишни изследвания на морфологията на hBest1/POPC монослоеве (от нашата работната група) доказват, че добавянето на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA към монослоеве при компресия до 20 mN/m води до образуването на хомогенни сиви зони, съдържащи

равномерно разпределени ярки домени с различна големина, но с еднаква отражателна способност. Морфологичните изследванията показват преобладаващ липиден състав на домените и фазово разделяне в hBest1/POPC монослоевете при високо повърхностно налягане т.е. по-силни протеин-протеинови и липид-липидни взаимодействия в сравнение с липид-белтъчните взаимодействия [18].





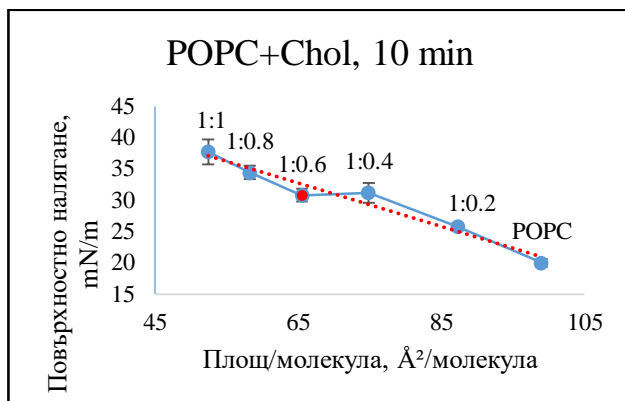
Фиг. 14 ВМ изображения на морфологията на смесени монослоеве от hBest1 и SM в съотношение 1:86, върху подложка от 150 mM NaCl (A и B) и в присъствие на  $Ca^{2+}$  (C и D), Glu (E и F) или GABA (G и H) при некомпресирани слоеве (лява колона), и след компресия (дясна колона) при температура  $35\pm 2^\circ C$ . Мащабна линия (scale bar) = 100  $\mu m$ .

#### **4. Кондензиращ ефект на холестерола върху SM, POPC, hBest1/SM и hBest1/POPC монослоеве**

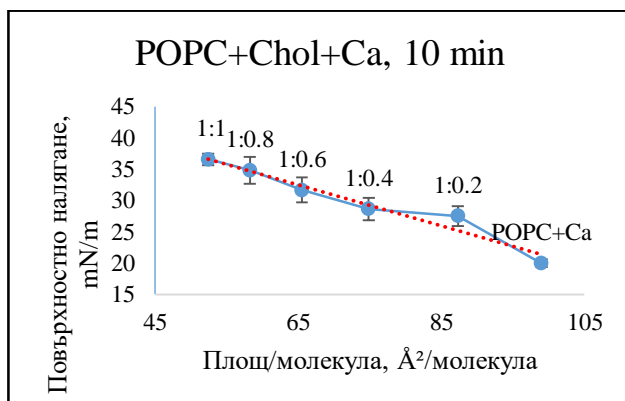
В проведените от нашия колектив експерименти количеството hBest молекули към POPC и SM е изчислено да бъде в съотношение 1:3 спрямо заеманата площ.

##### **4.1 Кондензиращ ефект на холестерола върху монослоеве от POPC**

При добавяне на холестерол към монослоеве от POPC се наблюдаваше ефект на кондензация при съотношение POPC:Chol от 1:0.4 до 1:0.6. (Фиг. 15) Кондензиращ ефект на холестерола е наблюдаван и от Сайто и колектив, като в техните изследвания се използва бислой от POPC [31]. Ефект на кондензация не се наблюдаваше в монослой с прибавен  $Ca^{2+}$ , независимо от концентрацията на холестерола. (Фиг. 16)



Фиг. 15 Влияние на холестерола върху повърхностното налягане на монослоеве от POPC (при молни съотношения POPC:Chol 1:0,2; 1:0,4; 1:0,6; 1:0,8; 1:1 и температура  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Данните са представени като средна стойност  $\pm SE$ ,  $n = 7$



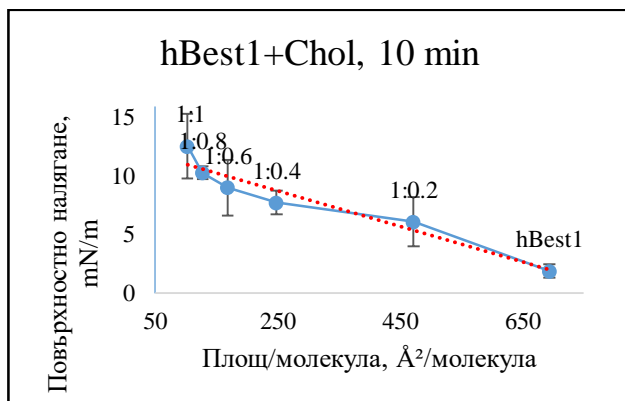
*Фиг. 16: Влияние на на холестерол върху повърхностното налягане на монослоевете от POPC в присъствие на  $Ca^{2+}$  (при молни съотношения POPC:Chol 1:0,2; 1:0,4; 1:0,6; 1:0,8; 1:1 и температура  $35 \pm 2^\circ C$ ). Данните са представени като средна стойност  $\pm SE$ ,  $n = 7$*

Вероятна причина за кондензиращия ефект е интеркалирането на холестерол между въглеродните опашки на POPC, което освен намаляване на свободния обем (виж по-горе) може да доведе и до намаляването на силата на взаимодействията между полярните глави на POPC и  $Na^+$  йони в подложката поради сближаването на полярните глави (по-малка свободната повърхност за взаимодействие между липида и подложката) [32, 33]. От друга страна, отсъствието на кондензиращ ефект при съотношения 1:0,6, 1:0,8 и 1:1 би могло да бъде, защото интеркалираният холестерол е заел вече свободния обем при съотношение от 1:0,4 до 1:0,6 и затова добавянето на допълнително количество води единствено до увеличаване на повърхностното налягане на монослоя. Взаимодействията между  $Ca^{2+}$  и POPC водят до намаляване на взаимодействието POPC и Chol и броя на интеркалираните молекули холестерол, което може да обясни отсъствието или намаляването на кондензиращия ефект при прибавянето на  $Ca^{2+}$ . В свое изследване Мелкрова и колеktiv доказват взаимодействието между POPC и  $Ca^{2+}$  използвайки едно- (POPC) и двукомпонентни (POPS/DOPC) везикули. При изследване на zeta-потенциала на везикули от POPC те доказват, че той се изменя от около 0 mV до около 15 mV след добавяне на  $CaCl_2$ , което е индикация за абсорбцията на  $Ca^{2+}$ . В допълнение, везикулите с абсорбирани катиони променят поведението си и склонността си да встъпват във взаимодействия с други везикули [34]. От друга страна, при изследване на монослоевете от чист холестерол не се наблюдават значителни преструктурирания в присъствието на  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  или

$\text{Ca}^{2+}$ . Кастило-Сантаела и колектив изказват предположение, че е термодинамично по-изгодно  $\text{Ca}^{2+}$  да запази хидратната си обвивка, отколкото да встъпва във взаимодействие с хидроксилната група на холестерола [35].

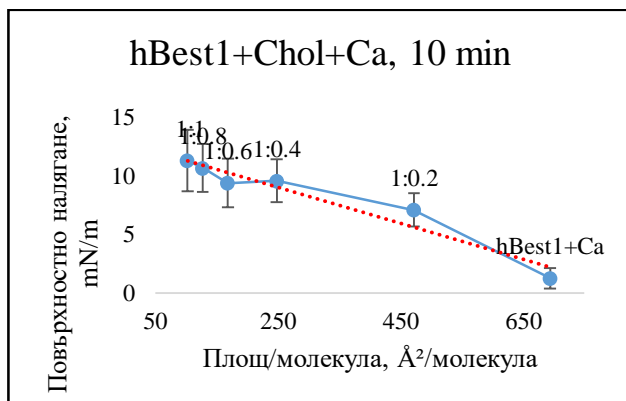
#### **4.2 Кондензиращ ефект на холестерола върху монослоеве от hBest1**

При изследване на ефекта на холестерола върху монослоеве от hBest1 не се наблюдава кондензация при отсъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  йони. Може да се предположи, че добавянето на Chol не води до конформационни промени (например до промяна на местата на хидрофилни и/или хидрофобни домени) в молекулата на hBest1 и олигомеризация (кондензация) и/или до потъване на протеина във водната подложка (фиг. 17). Най-често срещаните холестерол-свързващи домени са CRAC (Cholesterol Recognition / interaction Amino acid Consensus sequence), CARC (буквално „обратното“ на CRAC) и TP (tilted peptide) като един белтък може да има една, две или няколко холестерол-свързващи последователности [36]. В литературата отсъстват данни, че в структурата на hBest1 съществуват такива домени. Въпреки това, според Лии и колектив, взаимодействието холестерол и hBest1 е възможно да се извърши във вътрешността на белтъка с аминокиселината Ala73, което би дало възможност за пространствено сближаване на холестерола със следните аминокиселини: Asn70, Ser71, Ala73, Glu 74 [37]. Получените резултати не опровергават тази възможност, но дори при наличие на директно свързване на холестерола с hBest1, конформационните промени, които настъпват в белтъчната молекула не предизвикват промяна в поведението на белтъчния монослой.



Фиг. 17: Влияние на холестерол върху повърхностното налягане на монослоеве от hBest при отсъствие на  $Ca^{2+}$  и температура  $35 \pm 2^\circ C$ . Данните са представени като средна стойност  $\pm SE$ ,  $n = 7$

При hBest1 монослоеве в присъствие на  $Ca^{2+}$  се наблюдава ефект на кондензация при съотношение от 1:0.4 до 1:0.6 (фиг. 18). Вероятно това се дължи на димеризирането на hBest при свързването му с  $Ca^{2+}$ . Възможно е при ди- или олигомеризиране на hBest да се установяват нови взаимодействия и възможности за подредбата на Chol и hBest в монослоя, при което се наблюдава кондензация. Намалването на концентрацията на свободния  $Ca^{2+}$  би могло да обясни отсъствието на допълнителна кондензация, сходно с получените резултати в система с отсъстващ  $Ca^{2+}$ .

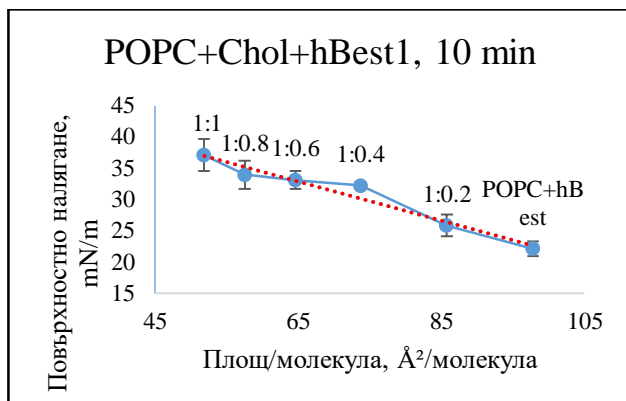


Фиг. 18: Влияние на холестерол върху повърхностното налягане на монослоеве от hBest в присъствие на  $Ca^{2+}$  и температура  $35 \pm 2^\circ C$ . Данните са представени като средна стойност  $\pm SE$ ,  $n = 7$

### 4.3 Кондензиращ ефект на холестерола върху hBest1/POPC монослоеве

При hBest1/POPC монослоеве без добавен  $Ca^{2+}$  се наблюдава кондензиращ ефект на холестерола при съотношения от 1:0.4 до 1:0.8 (Фиг. 19). Тези резултати са подобни на получените при монослоеве в отсъствие на човешки бестрофин-1. Допълнителна степен на кондензация (при 1:0,8) може да се дължи на конформационни промени на молекулата на hBest1, при взаимодействието му с холестерола и/или POPC. В своите изследвания на Лангмюирови монослоеве с различен състав, Трегер и колектив проследяват ефекта на холестерол върху друг белтък – МВР (Myelin Basic Protein) и ефекта върху взаимодействието му с липиди (монослоеве изградени от смес от PC, PS, PE, SM и PI). Резултатите до голяма степен са аналогични с получените от нашия колектив, тъй като при нарастване на концентрацията на холестерол от 0 до 100%, максимална кондензация се наблюдава при средните стойности

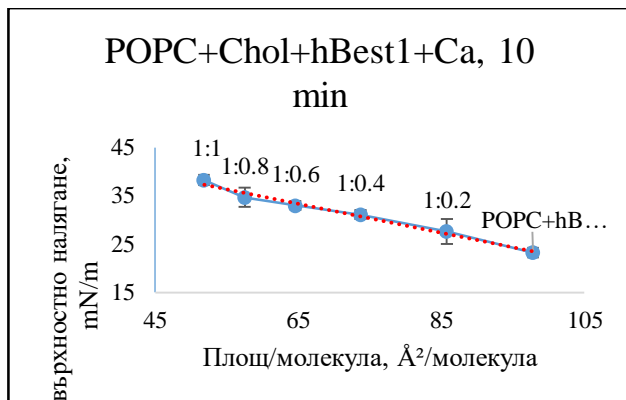
(около 44%). Авторите предполагат, че кондензиращият ефект е свързан с повлияване взаимодействието на белтъка с липида. Трегер достига до заключението, че няма правопрпорционална връзка между кондензацията на слоя и количеството холестерол (което се потвърждава от проведените от нас изследвания) [26, 38].



Фиг. 19: Влияние на на холестерол върху повърхностното налягане на монослоевете от hBest/POPC (при молни съотношения POPC:Chol 1:0,2; 1:0,4; 1:0,6; 1:0,8; 1:1 и температура  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Данните са представени като средна стойност  $\pm SE$ ,  $n = 7$ .

Кондензиращ ефект на холестерола не се наблюдава в монослоевете с добавени  $\text{Ca}^{2+}$  йони. (Фиг. 20) Липсата на такъв ефект може да се дължи на „предизвикана“ от  $\text{Ca}^{2+}$  йони промяна в междумолекулните взаимодействия между холестерола, POPC и hBest1.  $\text{Ca}^{2+}$  йони водят до промяна в конформацията на hBest1, неговото олигомеризиране (димеризиране/тетрамеризиране) и увеличаване на фазовото разделяне между

молекулите на холестерола, POPC и hBest1 и невъзможност за участие на холестерола в допълнителна кондензация на монослоя [18, 39].

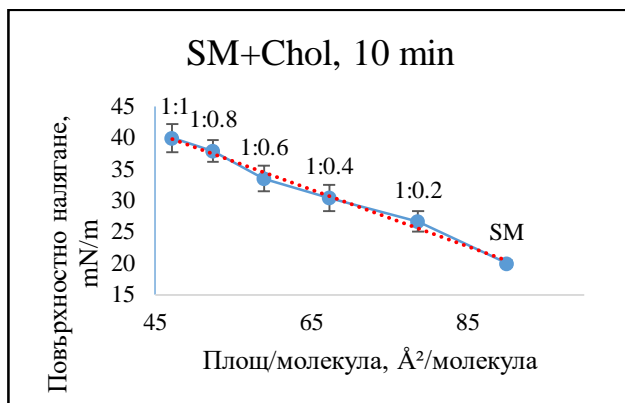


Фиг. 20: Влияние на холестерол върху повърхностното налягане на монослоеве от hBest/POPC в присъствие на  $Ca^{2+}$  (при молни съотношения POPC:Chol 1:0,2; 1:0,4; 1:0,6; 1:0,8; 1:1 и температура  $35 \pm 2^\circ C$ ). Данните са представени като средна стойност  $\pm SE$ ,  $n = 7$

#### 4.4 Кондензиращ ефект на холестерола върху монослоеве от SM

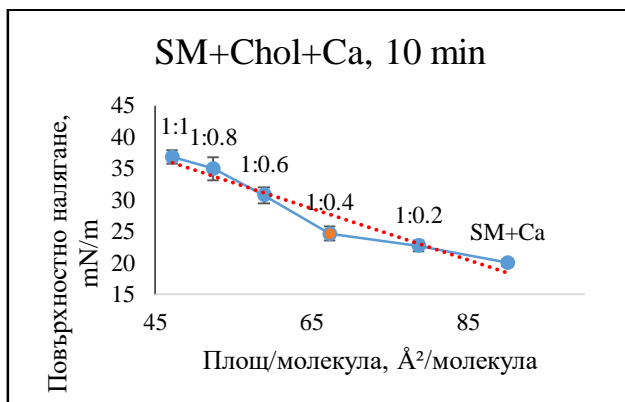
В монослоеве от SM, в които не присъства  $Ca^{2+}$ , не се наблюдава ефект на кондензация, независимо от концентрацията на холестерола (Фиг. 21). Това най-вероятно се дължи на високия афинитет на холестерола към SM [40], което води до значителна подреденост още при съотношение 1:0.2 (SM:Chol) и липса на възможност за допълнителна кондензация при увеличаване на съотношението.





Фиг. 21: Влияние на холестерол върху повърхностното налягане на монослоевете от SM. (при молни съотношения SM:Chol 1:0,2; 1:0,4; 1:0,6; 1:0,8; 1:1 и температура  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ) Данните са представени като средна стойност  $\pm$  SE,  $n = 7$

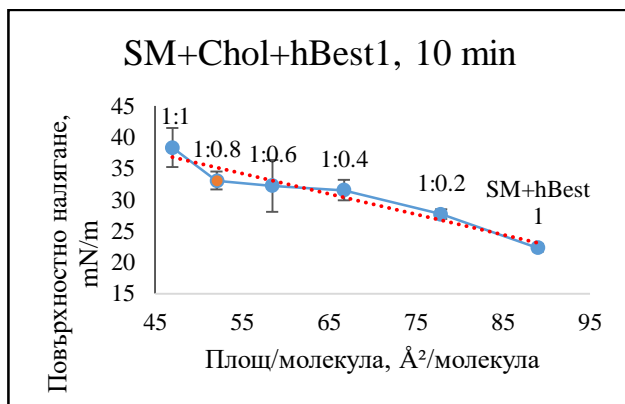
В SM монослой с добавени  $\text{Ca}^{2+}$  йони се наблюдава кондензация още при ниските концентрации на холестерол. (Фиг. 22).



*Фиг 22: Влияние на различни концентрации на холестерол върху монослоеве от SM в присъствие на  $Ca^{2+}$  (при молни съотношения SM:Chol 1:0,2; 1:0,4; 1:0,6; 1:0,8; 1:1 и температура  $35\pm 2^\circ C$ ). Данните са представени като средна стойност  $\pm SE$ ,  $n = 7$*

Вероятно слабият кондензиращ ефект на холестерола, който се наблюдава в присъствието на  $Ca^{2+}$  йони, се дължи на увеличаване на афинитета между главите на холестерол и SM, което се дължи на промяна в пространственото разположение на атомите (без това да е свързано с разкъсване или възникване на ковалентни връзки) и поради увеличаване в подредеността на опашките на церамидите. Според редица автори концентрацията на  $Ca^{2+}$  има пряко отношение към структурата на SM и този тип взаимодействия са от основно значение за обезпечаване на функцията на нативните мембрани. При бислойни моделни системи е доказано, че  $Ca^{2+}$  може да си взаимодейства, както с полярните глави на SM, водейки до „заставяване“ на водородните връзки, така и с хидрофобния участък, водейки до конформационни промени [29, 41, 42]. До подобно заключение достигат Фенг и колеktiv, които изследват ефекта на  $Ca^{2+}$  върху монослоеве от SM [43]. Те предполагат, че  $Ca^{2+}$  йони от подложката свързват фосфата, което води до разрушаване на водородната връзка между 3-хидроксилната група и кислороден атом от фосфата. Това от своя страна води до промяна в конформацията на хидрофобните участъци въпреки отсъствието на пряко им взаимодействие с  $Ca^{2+}$  йони [43]. Резултатите при използването на бислоеве и монослоеве са сходни, поради малката вероятност за включване на  $Ca^{2+}$  във вътрешността на липидния бислой в биологичните мембрани [44].

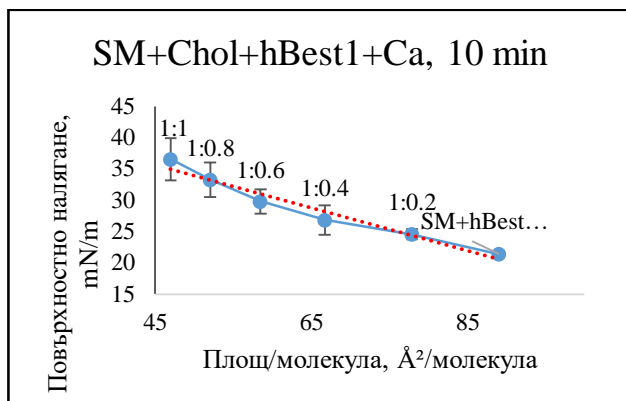
**4.5 Кондензиращ ефект на холестерола върху hBest1/SM монослоеве** При hBest1/SM монослоеве, в отсъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  йони се наблюдава отчетлив кондензиращ ефект при съотношения SM:Chol 1:0.4 и 1:0.8 (Фиг. 23). Тези резултати се различават значително от получените при монослоеве SM/Chol. Вероятно, в кондензиращия ефект на холестерола участват и молекулите на hBest1 чрез промяна в силите на взаимодействие между сфингомиелин и холестерол и/или чрез пряко взаимодействие на hBest1 с холестеролните молекули. Възможно е кондензирането да се дължи на потъването и на част от белтъчните молекули във водната подложка.



Фиг. 23: Влияние на различни концентрации на холестерол върху монослоеве от SM/hBest в отсъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  (при молни съотношения SM:Chol 1:0,2; 1:0,4; 1:0,6; 1:0,8; 1:1 и температура  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Данните са представени като средна стойност  $\pm SE$ ,  $n = 7$

При hBest1/SM монослоеве в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  не се наблюдава кондензиращ ефект на холестерола (Фиг. 24). Вероятна причина е

олигомеризирането (димеризирането) на hBest1, намаляване на ефекта на белтъка върху физикохимичните характеристики на монослоя, което позволява взаимодействие между SM и холестерол, сходно с това при SM монослоеве, където не се наблюдава кондензиращ ефект (фиг. 22). В свои изследвания на Лангмюирови монослоеве от фосфатидилинозитол-ди-фосфат, Левентал и колектив стигат до извода, че добавянето на калций води до спад в повърхностното напрежение, който е право пропорционален на концентрацията на  $\text{Ca}^{2+}$  йони в диапазона  $1\mu\text{M}$ - $1\text{mM}$ . При увеличаване на концентрацията на  $\text{Ca}^{2+}$  над  $1\text{mM}$  не се наблюдава допълнителна кондензация на липидните молекули, което се дължи на насищане на системата с катиони [45]. Добавянето на NaCl в близки до физиологичните концентрации силно намалява ефекта на  $\text{Ca}^{2+}$  върху монослоя, което авторите отдават на конкуренция между катионите. Вероятно концентрацията на  $\text{Ca}^{2+}$  йони пада под минималната, която би довела до кондензиращ ефект. За получаване на сходен ефект на кондензация е необходима повече от стократно по-висока концентрация на  $\text{Ca}^{2+}$  [45]. Следователно, намаляване на концентрацията на  $\text{Ca}^{2+}$  йони в подложката в следствие свързването им с hBest1 и като резултат промяна в катионната конкуренция, както и олигомеризирането на hBest1 са вероятни причини за липсата на кондензиращ ефект на холестерола при монослоеве hBest1/POPC и hBest1/SM в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  йони.



Фиг. 24: Влияние на различни концентрации на холестерол върху монослоевете от SM/hBest в присъствие на  $Ca^{2+}$  (при молни съотношения SM:Chol 1:0,2; 1:0,4; 1:0,6; 1:0,8; 1:1 и температура  $35 \pm 2^\circ C$ ). Данните са представени като средна стойност  $\pm SE$ ,  $n = 7$

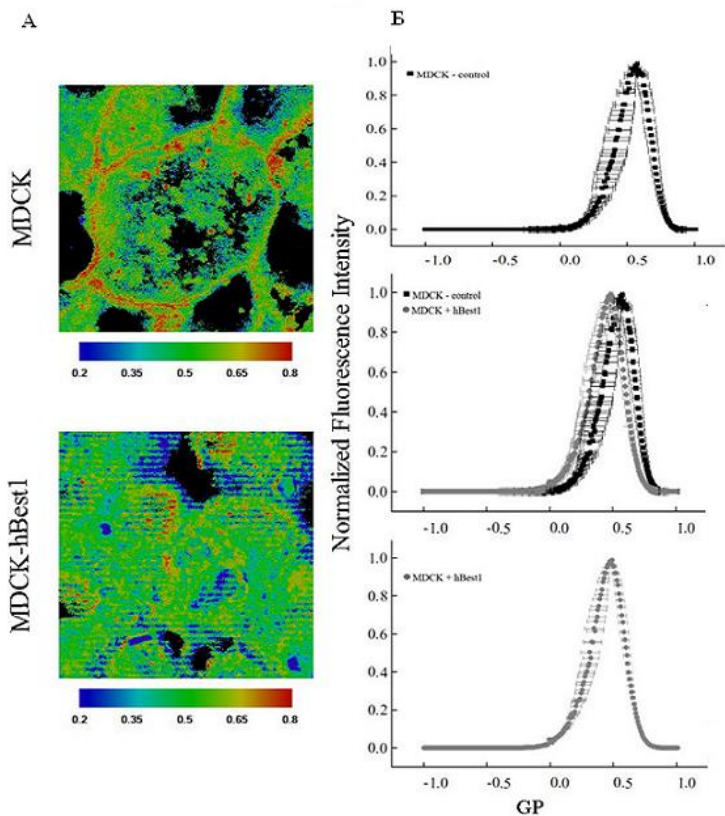
## 5. Асоцииране на hBest1 с мембранни домени в стабилно трансфектирани MDCKII клетки.

Структурата и функцията на hBest1, както и взаимодействието му с обкръжаващите липиди, са все още дискуссионни. Динамиката на взаимодействието между сфингомиелин и холестерол и участието им в образуването на различни по подреденост участъци в мембраната с участието на различни белтъци имат значително отношение към поддържането на хомеостазата в клетката [46, 47].

Мембранната хетерогенност беше изследвана допълнително, като за целта беше използван Лаурдан за витално оцветяване на еукариотни клетки. Експериментите бяха проведени с нетрансфектирани MDCK II и със стабилно трансфектирани MDCK II - hBest1 клетки. При трансфектираните клетки се

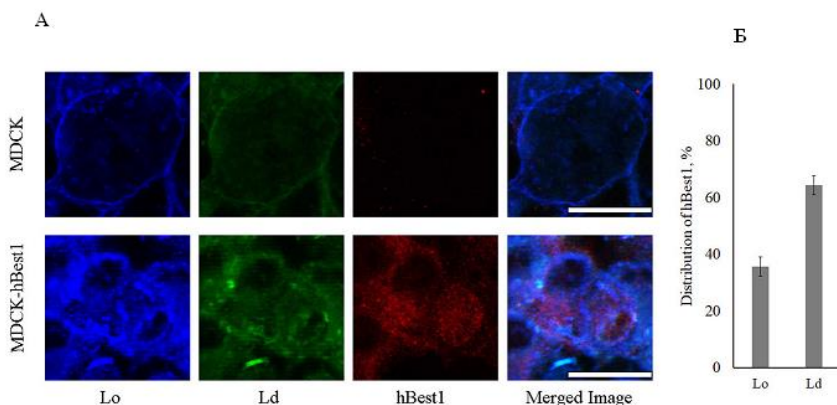
наблюдаваше увеличаване на течно-неподредените мембрани домени в сравнение с контролите (Фиг 25).

GP изображенията и GP стойностите получени от хистограмата демонстрираха по-ниска степен на молекулното подреждане на MDCK II-hBest1 клетъчните мембрани (увеличение на зеления сигнал, който се свързва с по-ниски GP стойности - 0,472) в сравнение с нетрансфектираните клетки от същата линия (увеличение на жълто-червения сигнал, който кореспондира на по-високи GP стойности – 0,575) (фиг 25).



Фиг.25: GP изображения (А) и хистограми (Б), които показват по-неподредените ( $L_d$  в зелено, с по-ниски стойности на GP) и по-подредените ( $L_o$  в жълто-червен цвят, с по-високи стойности на GP) региони от клетъчната мембрана на живи MDCK II и MDCK-hBest1 клетки. Данните са представени като средна стойност  $\pm$  SE,  $n = 30$ ,  $p < 0.01$ . Стойността на  $p$ -value е определяна само за максималните стойности на GP за MDCK II и MDCK-hBest1 клетки.

hBest1 се локализираше предимно в по-неподредените мембранни региони, което се доказва от колокализацията на Лаурдан и hBest1 (35% в течно-подредената и 65% в течно-неподредената фаза на мембраните) (Фиг 26 А; Б), Тези резултати са в съответствие с данните получени при физикохимичните изследвания на hBest1/SM филми, където се наблюдаваше, че hBest1 оказва „втечняващ“ ефект на монослоя (Фиг 9).



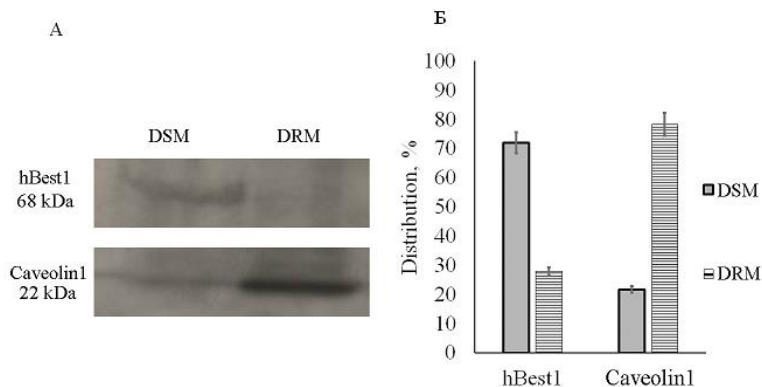
Фиг. 26: А: Флуоресценция на hBest1 (в червено) и Лаурдан в  $L_o$  (в синьо) и  $L_d$  (в зелено) региони на мембраните на MDCK II и MDCK-hBest1 клетки. Б: Разпределение на hBest1 в  $L_o$  и  $L_d$  региони на клетъчни мембрани на живи

*MDCK II* и *MDCK II-hBest1* клетки. Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  SE,  $n = 6$ ,  $p < 0.001$ , Скала = 10  $\mu$ m.

Частичното разпределение на hBest1 в течено-подредената и течено-неподредената фракция зависи от физикохимичните и биохимични свойства на нативните мембрани: липидния и белтъчен състав, латералното повърхностно напрежение, температурата, дебелината, извивката [48-50], съществуването на липидни нанодомени (при мембрани богати на холестерол) [23] и фазовите преходи. Физиологичната динамика на плазмената мембрана е от основно значение за регулацията на активността на йонните канали. Асоциацията на редица йонни канали с нано-/микродомени оказва пряк ефект върху тяхната функция. Например: KcsA ( $K^+$  channel of *Streptomyces A* се деактивира при локализиране в микродомени; Kir (potassium inward-rectifier) каналите – Kir2 се активира при напускане на рафтовете; Kir4 – се деактивира напълно при напускане на холестерол-богатите домени; епителните (ENaC)  $Na^+$  канали – апикалното таргетиране е насочено към рафтовете, но за активиране на канала е необходимо неговото напускане на холестерол-богатите домени и др. [51-54].

За потвърждаване на смесваемостта на hBest1 и SM беше изследвано разпределението на молекулите hBest1 в DRM и DSM след третиране на клетъчните мембрани на MDCK II и MDCK II-hBest1 клетки с нейонния детергент Triton X-100 [22, 48]. При така зададената експериментална постановка се наблюдаваше хетерогенност на разпределението, като hBest1 се асоциираше предоминантно в DSM (70%) и в по-малка степен в DRM (30%) (фиг. 27).





Фиг. 27: А: Western blot анализ на разпределението на hBest1 и Кавеолин 1 в DRM и DSM. Б: Количествено охарактеризиране на разпределението на hBest1 и Кавеолин 1 в DRM и DSM. Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  SE,  $n = 3$ ,  $p < 0.005$ .

Според редица автори използването на детергенти за изолиране на мембранни домени и охарактеризиране на техния белтъчен и липиден състав е недостатъчно поради редица физикохимични особености на взаимодействието детергент-мембрана и ограниченията в експерименталните постановки [22]. При работа с детергенти, температурата е един от основните фактори за получаването на различни резултати при изолиране на мембрани. Например получените резултати при  $4\text{C}^\circ$  се различават значително от тези при  $37\text{C}^\circ$  [1]. Освен това, моделни мембрани с различен липиден състав реагират по различен начин на присъствието на детергент с повишаване на температурата. Например, при увеличаване на температурата се налага увеличаване на концентрацията на детергент (Triton X-100) при обработката на мицели от

POPC. Това означава, че те придобиват детергентна резистентност при по-високи температури. Обратна зависимост се наблюдава при мицели от DPPC – с повишаване на температурата количеството необходим детергент намалява [55, 56]. Интересен е случаят с използването на сфингомиелин, където при ниски температури (около 4С°) в началото на експеримента, с повишаване на температурата се наблюдава обратнопропорционална зависимост (по-висока температура означава намаляване на количеството Triton X-100 необходимо за третиране, но при начално високи температури и температури близки до физиологичните с покачване на температурата се наблюдава право пропорционална зависимост като за постигане на същия ефект са необходими по-високи концентрации детергент) [57-59]. Хетерогенността на установените зависимости вероятно се дължи на два основни противопоставящи се фактора – 1) с повишаване на температурата се променя извивката (кривината) на мембраната (става енергитично по-малко изгодно взаимодействието липид – детергент), което обяснява необходимостта от увеличаване на концентрацията на детергента, и 2) взаимодействието мембрана-детергент има термодинамично неизгоден аспект – извиването на липидния слой под действието на детергента води до образуването на празнини между липидните молекули. „Затварянето“ на празнините се улеснява при покачване на температурата, което се дължи на по-голямата енергия в системата и обяснява необходимостта от намаляване на концентрацията на детергента [22]. Друг основен фактор, който има отношение към получаването на различни резултати, е типа на използвания детергент. При третирането на мембраните с по-„меки“ детергенти (по-малък флуидизиращ ефект – например Lubrol) се осъществява по-слабо взаимодействие с мембранните участъци богати на фосфатидилхолин в сравнение с взаимодействието със SM богатите домени, което би довело до

увеличаване на смесваемостта на различните липиди и разрушаване на латералната хетерогенност на мембраната и съответно на липидите домени [60]. При използването на детергента Lubrol се получават качествено (различен белтъчен състав на DRM) и количествено различни резултати от тези получени с Triton X-100 [22]. Някои автори предполагат съществуването на различни по вид рафтове, които влизат в състава на различни мембранны фракции в зависимост от използвания детергент (например Лубролни рафтове) [22]. На този етап съществуването на подобни рафтове не е доказано и разликите в резултатите се отдават единствено на различията във взаимодействието детергент-мембрана [1].

Хирклоц и колектив изказват предположението, че при третирането на мембраните с детергенти се увеличава количеството на DRM поради придвижването на липиди като SM от по-неподредените към по-подредените мембранны участъци поради термодинамично неизгодното взаимодействие на SM с детергентите [61].

Въпреки посочените ограничения, третирането с детергенти се разглежда като важен подход не само за охарактеризирането на разпределението на белтъците и липидите в DRM и DSM, но и като потенциален метод за определянето на взаимодействията белтък-липид [1].

Резултатите, получени от нашия научен колектив при обработката на трансфектирани MDCK клетки с Тритон X-100 са аналогични с резултатите, получени при експерименти с виталното оцветяване (с Лаурдан) на клетъчни мембрани и локализирането на hBest1 в  $L_o$  и  $L_d$ .

При използването на физикохимичния подход с участието на Лангмюирови филми беше доказано, че смесваемостта на hBest1 и SM, е

термодинамично изгоден процес, което определя афинитета между hBest1 и SM в биологичните мембрани.

Локализирането на hBest1 преобладава в DSM (70%) и  $L_d$  регионите (65%) има основно значение за правилното функциониране на белтъка и неговата регулация. От друга страна, хетерогенното разпределение на hBest1 в мембраната предполага съществуването на повече от една възможна конформация и вероятно белтъкът се среща в мономерно, димерно или олигомерно (пентамерно) състояние. Според Лихтенберг и колектив [22],  $L_o$  фракцията е богата на сфингомиелин, което предполага локализирането на hBest1 да бъде основно в  $L_o$ . Според нашия научен колектив възможни обяснения на разликите в очакваните и получените резултати са:

- Използването на Лангмюирови монослоеве доказва смесваемостта на hBest и SM, но използваните филми са дву- или трикомпонентни, което не отразява комплексността на взаимодействията между hBest1, SM и останалите липиди (над 2000) и белтъци в биологична мембрана.
- Това, че  $L_o$  домени са богати на SM не изключва възможността в  $L_d$  също да се наблюдават високи SM концентрации. От голямо значение е вида на SM таргетиращите вещества. В свое изследване, използвайки гигантски унимеларни везикули, Макино и колектив доказват, че при използването на токсина lysenin се визуализират предимно  $L_o$  регионите, където имаме по-високо ниво на уплътняване на SM, но при използване на equinotoxin (EqfII) се визуализира SM в  $L_d$ . При третирането на живи клетки с тези токсини се наблюдава тяхната различна асоциация в мембранните домени, което показва локализирането на SM както в  $L_o$  така и в  $L_d$  [62].
- Разпределението на SM в клетките е различно и зависи от етапа на клетъчния цикъл, полярността на клетките и развитието на патологии. По

вереме на цитокинезата SM са намира най-вече в срединната линия на клетката, което вероятно е свързано с реорганизации в мембраната във връзка с предстоящото делене. В епителните поляризиращи клетки (клетъчни линии HeLa, COS-7, MDCK II, MEB4 и GM95) се наблюдава хомогенно разпределение на SM между  $L_d$  и  $L_o$  на апикалната мембрана и концентрирането на почти всички SM в по-подредените  $L_o$  домени на базолатералната мембрана [62].

По какъв начин hBest1 се асоциира с липидите в течно - подредените и течно - неподредените региони на мембраната, как това се отразява на неговата конформация, молекулярна организация (свързване в олигомерни комплекси) и по какъв начин се променя неговата активност (например преноса на йони) е обект на дискусия и допълнителни експерименти. Вероятно различното разпределение на липидите и hBest1 в мембранните рафтове в епителните и нервните клетки е предпоставка за изпълняване на различна функция на hBest1 ( $Cl^-$  канал в RPE и транспортер на Glu и GABA в нервните клетки).

Въздействието на липидното обкръжение върху структурата и функцията на белтъците в липидните рафтове е изследвано за редица йонни канали, фактори свързани с фагоцитозата, белтъци, участващи в клетъчната сигнализация, фактори, участващи в имунния отговор и др. В едни случаи, включването на определен белтък в мембранен рафт води до неговото активиране. Така например, позиционирането на никотиновите ацетилхолинови рецептори в рафтове богати на холестерол води до увеличаване на функционалната им активност [63]. Обработката на мембраните с холестерол-отнемащия MBC води до значителен спад в активността на епителните  $Na^+$  канали (aNaC) и GABA<sub>A</sub> рецепторите [63].

Поради локализирането на около 70 % от hBest1 в L<sub>o</sub> и DSM можем да предположим, че позитивния ефект на рафтовете върху активирането на белтъка е по-малко вероятен. От друга страна, увеличаването на концентрацията на холестерол има негативен ефект върху функцията на редица йонни канали – различни видове K<sup>+</sup> канали (K<sup>+</sup> importers), Ca<sup>2+</sup> зависими K<sup>+</sup> канали, потенциал зависими Na<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup> канали и други [63]. Следователно разположението на белтъците в богатите на холестерол липидни рафтове може да има както позитивен, така и негативен ефект върху тяхната функция. Интересен е случаят със семейството на Kir (inwardly-rectifying K<sup>+</sup> channels) каналите, при които асоциирането с липидните рафтове често има противоположен ефект върху тяхната функция (един представител на Kir се активира, а друг се инактивира) [64].

Съществуват много литературни данни за възможния ефект на холестерола върху функцията на определени белтъци в липидните рафтове, който може да е пряк или косвен. В първия случай холестеролът се свързва директно с белтъка латерално или във вътрешността на молекулата, което води до конформационни промени и промяна в активността/функцията на белтъка [63]. Въпреки, че е теоритично възможно холестеролът да се свърже с hBest1 [37], в литературата все още отсъстват експериментални данни, които да подкрепят тази хипотеза (виж по-горе). Най-вероятно влиянието на холестерола върху функцията на hBest1 в холестерол-богатите липидни рафтове е косвено – наличието на голямо количество холестерол води до промяна във физикохимичното обкръжение на белтъка, свързано с увеличаване на дебелината на слоя, ефект на кондензация, намаляване на вертикалната еластичност на мембраната, намаляване на свободния обем и генериране на хидрофобен miss-match, който води до конформационни

промени в молекулата на белтъка. Лундбак и колектив стигат до сходни заключения изследвайки ролята на холестерола при активацията на  $\text{Ca}^{2+}$  канали [65].

Класическите липидни рафтове са мембранни образувания богати на SM и холестерол, но нови изследвания доказват съществуването на изцяло сфинголипидни домени (виж Литературен обзор). Интерес представлява и работата на Бук и колектив, които изследват функцията на CNTF (ciliary neurotrophic factor) рецептора, който се среща в мембраните на поляризирани нервни клетки. За модел те използват трансфектирани MDCK II клетки и достигат до заключението, че дори при използване на високи количества детергент не се наблюдава разрушаване на DRM. При друг свой експеримент, дори след отнемане на над 70% от холестерола липидните рафтове по повърхността на клетките съдържащи CNTF рецептора продължават да съществуват [66]. Вероятно тези холестерол-бедни липидни рафтове имат голямо отношение към функцията на hBest1. Може да се спекулира, че има връзка между експресията на hBest1 по базолатералната повърхност на RPE и значителните разлики в разпределението на SM по апикалните и базолатерални мембрани на поляризираните клетки). SM е хомогенно разпределен по апикалната повърхност и се намира във високо подредени домени по базолатералната повърхност [62]. Това, обаче не може да даде обяснение на различните функции на hBest1 в ретината и нервните клетки. И двата типа клетки са поляризирани, като при нервните се наблюдават значителни разлики в липидния и белтъчния състав в плазмените мембрани на дендритите и клетъчните тела от една страна и аксоните от друга, които са аналози съответно на базолатералната и апикалната мембрана на RPE. Според Дотти и колектив сортирането на протеините в мембраните на нервните клетки

е сходно със сортирането им в епителните клетки [67]. Това не означава, че липидният състав на таргетните мембрани в нервните и епителните клетки е сходен. Вероятно липидното обкръжение на hBest1 в клетките е от основно значение за промяната на неговата функция в различните тъкани. Това се подкрепя от факта, че определени мутации в гена за hBest не водят до засягане на неговата функция в ретината и до развитие на макулна дегенерация, но има предположения, че различно от физиологичното разпределение на hBest по плазмената мембрана в нервните клетки и следващата от това промяна в липидното обкръжение би могло да има връзка с развитието на заболявания на нервната система [68].

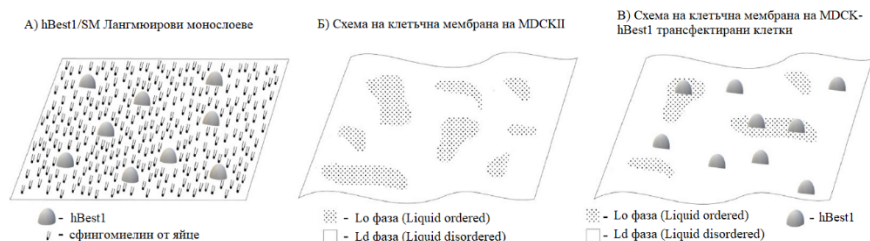
## ***V. Обобщение***

*В настоящия труд са представени резултати (изотерми, хистерезисни криви и модулите на свиваемост на монослоеве от hBest1, SM и двукомпонентни hBest/SM филми в присъствие на  $Ca^{2+}$ , Glu и GABA при температура  $35 \pm 2C^\circ$ ) от изследвания на Лангмюирови монослоеве. Беше определена смесваемостта на hBest1 и SM при различни молни съотношения. Чрез БАМ беше визуализирана морфологията на монослоеве от hBest1, SM и hBest/SM филмите в присъствие на  $Ca^{2+}$ , Glu, GABA. Беше определен кондензиращият ефект на холестерола върху монослоеве от hBest, hBest/SM и hBest/POPC. Чрез експерименти с клетъчни култури беше установено разпределението на hBest в DRM и DSM и беше направено флуоресцентно*



колокализиране на *hBest1* в мембранни региони с различна подреденост. Установено беше частично асоцииране на *hBest1* с  $L_o$  (35%) и  $L_d$  (65%) домените както и повишаване на количеството на  $L_d$  домените в трансфектирани MDCK-*hBest1* клетки. Асоциацията на *hBest1* с  $L_o$  и  $L_d$  домените е представена чрез схематично обобщение на Фиг. 28.

Взаимодействието между *hBest1* и SM предоставя важна информация за ефекта на липидната среда върху регулацията на физиологичните активности на белтъка.



Фиг. 28. Схема на: А) Смесване на *hBest1* и SM на Лангмюирови монослоеве; Б)  $L_o$  и  $L_d$  региони на клетъчната мембрана на MDCKII клетки; В) Частично асоцииране на *hBest1* с  $L_o$  и  $L_d$  региони на клетъчната мембрана на MDCKII-*hBest1* клетки. *hBest1* увеличава площта на  $L_d$  регионите.

## Изводи

**Въз основа на получените резултати могат да бъдат направени следните изводи:**

1. hBest1 повишава подредеността на смесени монослоевете от hBest1 и сфингомиелин при 35°C.
2. Смесваемостта между hBest1 и сфингомиелин при 35°C е спонтанна.
3. Холестеролът не оказва кондензиращ ефект върху монослоевете от hBest1. Но при добавянето на  $\text{Ca}^{2+}$  йони такъв ефект се наблюдава.
4. Холестеролът оказва кондензиращ ефект върху монослоевете от hBest1 и POPC, а също и върху монослоевете от hBest1 и сфингомиелин. При добавянето на  $\text{Ca}^{2+}$  йони не се наблюдава кондензиращ ефект.
5. Разпределението на hBest1 в DRM и DSM в MDCK II-hBest1 клетки е съответно 30% и 70%.
6. Наличието на hBest1 молекули в мембраните на стабилно трансфектирани MDCK II-hBest1 клетки води до увеличаване на  $L_d$  областите.
7. hBest1 преимуществено се асоциира с  $L_d$  областите (65%) и по-малко с  $L_o$  областите (35%) в мембраните на MDCK II-hBest1 клетки.

## **Приноси:**

1. За първи път са определени подредеността и смесваемостта на hBest1 и сфингомиелин в Лангмюирови монослоеве.
2. За първи път е определен кондензиращ ефект на холестерола върху монослоеве от hBest1, hBest1 и POPC, както и hBest1 и сфингомиелин .
3. За първи път е доказано, че hBest1 води до увеличаване на течно-неподредените домени в мембраните на еукариотни клетки и приоритетното му локализиране в тях.

## Публикации, свързани с темата на дисертационния труд:

1. **N. Mladenov**, S.D. Petrova, K. Mladenova, D. Bozhinova, V. Moskova-Doumanova, T. Topouzova-Hristova, P. Videv, R. Veleva, A. Kostadinova, G. Staneva, T.D. Andreeva, J.A. Doumanov, "Miscibility of hBest1 and sphingomyelin in surface films - A prerequisite for interaction with membrane domains", *Colloids Surf B Biointerfaces*, Feb 21;189:110893. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.110893.2020; (IF: 3.973); <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32113084>
2. T. D. Andreeva, S. D. Petrova, K. Mladenova, V. Moskova-Doumanova, T. Topouzova-Hristova, Y. Petseva, **N. Mladenov**, K. Balashev, Zdravko Lalchev, Jordan A. Doumanov, "Effects of Ca<sup>2+</sup>, Glu and GABA on hBest1 and composite hBest1/POPC surface films", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 161, 192–199, 2018; (IF: 3.973); <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29080503>

## Участия в научни форуми:

1. **Н. Младенов**, С. Петрова, Т. Андреева, К. Младенова, В. Московска-Думанова, П. Видев, Т. Топузова-Христова, Й. Думанов, Постер, „Ефекти на температурата върху монослоеве от човешки бестрофин-1“, XXIX Международна Научна Конференция на Съюз на учените - Стара Загора, 05/06-07/06 2019
2. **Nikola Mladenov**, Kirilka Mladenova, Pavel Videv, Veselina Moskova-Doumanova, Tanya Topouzova-Hristova, Zdravko Lalchev, Tonya Andreeva, Svetla Petrova, Jordan Doumanov, Постер, "Tensiometric investigations of hBest1 and SM monolayers", Youth Scientific Conference "Kliment's Days", Sofia, 16/11-17/11 2017
3. **Н. Младенов**, С. Петрова-Чанкова, Т. Андреева, К. Младенова, Т. Топузова-Христова, В. Московска-Думанова, Ю. Пецева, З. Лалчев, Й. Думанов, Секционен доклад, "Изследване на монослоеве от hBest1 и сфингомиелин чрез AFM и BAM", XII Национална Конференция по Медицинска Биология, 08/09-10/09 2017

## Цитирана литература:

1. Sezgin, E., et al., *The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(6): p. 361-374.
2. Dart, C., *Lipid microdomains and the regulation of ion channel function*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 17): p. 3169-78.
3. Barenholz, Y., *Liposomology*. Prog Lipid Res, 2000. **39**(1): p. 1-2.
4. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. **175**(4023): p. 720-31.
5. Sun, H., et al., *The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 4008-13.
6. Lee, S., et al., *Channel-mediated tonic GABA release from glia*. Science, 2010. **330**(6005): p. 790-6.
7. 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.
8. Burgess, R., et al., *Biallelic mutation of BEST1 causes a distinct retinopathy in humans*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(1): p. 19-31.
9. Hartzell, H.C., et al., *Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies*. Physiol Rev, 2008. **88**(2): p. 639-72.
10. Marmorstein, A.D., H.E. Cross, and N.S. Peachey, *Functional roles of bestrophins in ocular epithelia*. Prog Retin Eye Res, 2009. **28**(3): p. 206-26.
11. Boon, C.J., et al., *The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene*. Prog Retin Eye Res, 2009. **28**(3): p. 187-205.
12. Querques, G., et al., *Functional and clinical data of Best vitelliform macular dystrophy patients with mutations in the BEST1 gene*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 2960-72.
13. Mohler, C.W. and S.L. Fine, *Long-term evaluation of patients with Best's vitelliform dystrophy*. Ophthalmology, 1981. **88**(7): p. 688-92.
14. Clemett, R., *Vitelliform dystrophy: long-term observations on New Zealand pedigrees*. Aust N Z J Ophthalmol, 1991. **19**(3): p. 221-7.
15. Seddon, J.M., et al., *Assessment of mutations in the Best macular dystrophy (VMD2) gene in patients with adult-onset foveomacular vitelliform dystrophy, age-related maculopathy, and bull's-eye maculopathy*. Ophthalmology, 2001. **108**(11): p. 2060-7.
16. Renner, A.B., et al., *Late onset is common in best macular dystrophy associated with VMD2 gene mutations*. Ophthalmology, 2005. **112**(4): p. 586-92.
17. Wabbels, B., et al., *Genotype-phenotype correlation and longitudinal course in ten families with Best vitelliform macular dystrophy*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2006. **244**(11): p. 1453-66.
18. 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.
19. Methot, M., et al., *In situ characterization of functional purple membrane monolayers at the air-water interface*. Langmuir, 2004. **20**(3): p. 934-40.
20. Andreeva, T.D., et al., *Protonation-induced changes in the macroorganization of LHCII monolayers*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2014. **460**: p. 196-203.
21. Hutchinson, E., *Interfacial Phenomena*. J. T. Davies and E. K. Rideal. Academic Press, New York, 1961. xiii + 474 pp. Illus. \$14. Science, 1961. **134**(3490): p. 1611.
22. Lichtenberg, D., F.M. Goni, and H. Heerklotz, *Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(8): p. 430-6.
23. Weinrich, M., D.L. Worcester, and S.M. Bezrukov, *Lipid nanodomains change ion channel function*. Nanoscale, 2017. **9**(35): p. 13291-13297.
24. Li, X.M., et al., *Sphingomyelin interfacial behavior: the impact of changing acyl chain composition*. Biophysical journal, 2000. **78**(4): p. 1921-1931.

25. Dupuy, A.D. and D.M. Engelman, *Protein area occupancy at the center of the red blood cell membrane*. 2008. **105**(8): p. 2848-2852.
26. Mladenov, N., et al., *Miscibility of hBest1 and sphingomyelin in surface films - A prerequisite for interaction with membrane domains*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2020. **189**: p. 110893.
27. Goodrich, F.C., *Molecular Interaction in Mixed Monolayers*

Proceedings of the Second International Congress of Surface Activity: Gas-liquid and liquid-liquid interface, 1957.

28. Tsanova, A., et al., *Interaction of methionine-enkephalins with raft-forming lipids: monolayers and BAM experiments*. Amino Acids, 2014. **46**(5): p. 1159-68.
29. Rujoi, M., et al., *Interactions of Ca(2+) with sphingomyelin and dihydrosphingomyelin*. Biophys J, 2002. **82**(6): p. 3096-104.
30. Beltramo, D., et al., *GABA interaction with lipids in organic medium*. Life Sci, 1987. **41**(6): p. 733-9.
31. Saito, H., et al., *Molecular dynamics study of binary POPC bilayers: molecular condensing effects on membrane structure and dynamics*. Journal of Physics: Conference Series, 2018. **1136**: p. 012022.
32. Magarkar, A., et al., *Cholesterol level affects surface charge of lipid membranes in saline solution*. Scientific Reports, 2014. **4**(1): p. 5005.
33. Yeagle, P.L., et al., *Phospholipid head-group conformations; intermolecular interactions and cholesterol effects*. Biochemistry, 1977. **16**(20): p. 4344-4349.
34. Melcrová, A., et al., *The complex nature of calcium cation interactions with phospholipid bilayers*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 38035.
35. Del Castillo-Santaella, T., et al., *Specific Ion Effects in Cholesterol Monolayers*. Materials (Basel, Switzerland), 2016. **9**(5): p. 340.
36. Fantini, J. and F.J. Barrantes, *How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 31.
37. Lee, A.G., *A Database of Predicted Binding Sites for Cholesterol on Membrane Proteins, Deep in the Membrane*. Biophysical Journal, 2018. **115**(3): p. 522-532.
38. Träger, J., K. Widder, and A. Kerth, *Effect of Cholesterol and Myelin Basic Protein (MBP) Content on Lipid Monolayers Mimicking the Cytoplasmic Membrane of Myelin*. 2020. **9**(3).
39. Bharill, S., et al., *Stoichiometry and specific assembly of Best ion channels*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(17): p. 6491.
40. Nicolson, G.L., *The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years*. Biochimica et biophysica acta, 2014. **1838**(6): p. 1451-1466.
41. Tang, D., et al., *Influence of age, diabetes, and cataract on calcium, lipid-calcium, and protein-calcium relationships in human lenses*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(5): p. 2059-66.
42. Kooijman, E.E., et al., *Structure of ceramide-1-phosphate at the air-water solution interface in the absence and presence of Ca2+*. Biophys J, 2009. **96**(6): p. 2204-15.
43. Feng, R.-J., et al., *Effect of Ca(2+) to Sphingomyelin Investigated by Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy*. Biophysical journal, 2017. **112**(10): p. 2173-2183.
44. Watson, H., *Biological membranes*. Essays in Biochemistry, 2015. **59**: p. 43-69.
45. Levental, I., et al., *Calcium-dependent lateral organization in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)- and cholesterol-containing monolayers*. Biochemistry, 2009. **48**(34): p. 8241-8.
46. Ohvo-Rekila, H., et al., *Cholesterol interactions with phospholipids in membranes*. Prog Lipid Res, 2002. **41**(1): p. 66-97.

47. Zhang, Z., S.Y. Bhide, and M.L. Berkowitz, *Molecular dynamics simulations of bilayers containing mixtures of sphingomyelin with cholesterol and phosphatidylcholine with cholesterol*. J Phys Chem B, 2007. **111**(44): p. 12888-97.
48. Turnheim, K., et al., *Membrane phospholipid composition affects function of potassium channels from rabbit colon epithelium*. Am J Physiol, 1999. **277**(1): p. C83-90.
49. Lundbaek, J.A. and O.S. Andersen, *Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers*. J Gen Physiol, 1994. **104**(4): p. 645-73.
50. Seeger, H.M., et al., *Phase-transition-induced protein redistribution in lipid bilayers*. J Phys Chem B, 2009. **113**(52): p. 16654-9.
51. Seeger, H.M., et al., *Changes in single K(+) channel behavior induced by a lipid phase transition*. Biophys J, 2010. **99**(11): p. 3675-83.
52. Kimchi, O., S.L. Veatch, and B.B. Machta, *Ion channels can be allosterically regulated by membrane domains near a de-mixing critical point*. 2018. **150**(12): p. 1769-1777.
53. Butterworth, M.B., *Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by membrane trafficking*. Biochimica et biophysica acta, 2010. **1802**(12): p. 1166-1177.
54. Levitan, I., *Cholesterol and Kir channels*. IUBMB life, 2009. **61**(8): p. 781-790.
55. Tamm, L.K. and H.M. McConnell, *Supported phospholipid bilayers*. Biophysical journal, 1985. **47**(1): p. 105-113.
56. Schnitzer, E., D. Lichtenberg, and M. Kozlov, *Temperature-dependence of the solubilization of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) by the non-ionic surfactant Triton X-100, kinetic and structural aspects*. Chemistry and physics of lipids, 2003. **126**: p. 55-76.
57. Keller, H., M. Lorizate, and P. Schwille, *PI(4,5)P2 degradation promotes the formation of cytoskeleton-free model membrane systems*. Chemphyschem, 2009. **10**(16): p. 2805-12.
58. Patra, S.K., et al., *Liposomes Containing Sphingomyelin and Cholesterol: Detergent Solubilisation and Infrared Spectroscopic Studies*. Journal of Liposome Research, 1999. **9**(2): p. 247-260.
59. Sot, J., et al., *Triton X-100-Resistant Bilayers: Effect of Lipid Composition and Relevance to the Raft Phenomenon*. Langmuir, 2002. **18**(7): p. 2828-2835.
60. Schuck, S., et al., *Resistance of cell membranes to different detergents*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(10): p. 5795.
61. Heerklotz, H., *Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures*. Biophysical journal, 2002. **83**(5): p. 2693-2701.
62. Makino, A., et al., *Visualization of the heterogeneous membrane distribution of sphingomyelin associated with cytokinesis, cell polarity, and sphingolipidosis*. The FASEB Journal, 2014. **29**(2): p. 477-493.
63. Levitan, I., D.K. Singh, and A. Rosenhouse-Dantsker, *Cholesterol binding to ion channels*. Frontiers in physiology, 2014. **5**: p. 65-65.
64. Rosenhouse-Dantsker, A., et al., *Comparative analysis of cholesterol sensitivity of Kir channels: Role of the CD loop*. Channels, 2010. **4**(1): p. 63-66.
65. Lundbaek, J.A., et al., *Membrane Stiffness and Channel Function*. Biochemistry, 1996. **35**(12): p. 3825-3830.
66. Buk, D.M., et al., *Polarity and lipid raft association of the components of the ciliary neurotrophic factor receptor complex in Madin-Darby canine kidney cells*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 10): p. 2063-75.
67. Dotti, C.G., R.G. Parton, and K. Simons, *Polarized sorting of glypiated proteins in hippocampal neurons*. Nature, 1991. **349**(6305): p. 158-61.
68. Jo, S., et al., *GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease*. 2014. **20**(8): p. 886-96.