

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

СОФИЙСКИ  
УНИВЕРСИТЕТ



„СВ. КЛИМЕНТ  
ОХРИДСКИ”  
ОСНОВАН 1888 г.

Ас. Кирилка Стефанова Младенова

Изследване на взаимодействието на белтъка бестрофин-1 с  
моделни мембранни структури и поведението му в еукариотни  
клетки

## **АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертация за присъждане на научната и образователна  
степен „доктор”

Научни ръководители:  
Член кор. проф. д-р Здравко Лалчев, дбн  
Доц. д-р Йордан Думанов

София, 2016

### Благодарности:

На първо място дължа голяма благодарност на научните си ръководители доц. Йордан Думанов и проф. Здравко Лалчев за тяхната подкрепа и съвети, благодарение на които беше реализирана тази дисертация.

Изказвам благодарност и на проф. Светла Петрова и доц. Тоня Андреева за тяхната помощ и насоки в експерименталната част.

Част от материалите за изготвяне на настоящата дисертация са закупени по проекти за подкрепа на докторанти към СУ: № 60/2015г. и № 93/2016г

## I. Увод

Болестта на Бест (**Best Vitelliform Macular Dystrophy, BVMD**) е автозомно доминантно наследствено заболяване, засягащо централното зрение при човек [1-3]. Проявява се като увреждане на ретиналния пигментен епител и е втората най-разпространена форма на наследствена макулна дегенерация в младежка възраст, която е все още нелечима. BVMD спада към бестрофинопатиите – различни макулни дегенерации, причинени от мутации в гена *BEST1*, който е отговорен за синтеза на белтъка бестрофин-1 (human Best1, hBest1) [4-6]. hBest1 се експресира предимно в клетките на ретиналния пигментен епител (РПЕ) [6]. Експресия на белтъка е установена и в астроцити, глиални клетки и неврони от централна нервна система [7, 8]. Въз основа на аминокиселинната му последователност са предложени два пространствени модела, според които той е трансмембранен белтък с 6 хидрофобни участъка [9, 10].

Структурата и функцията на белтъка са все още дискуссионни. Експериментални данни показват, че hBest1 участва в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависим транспорт на  $\text{Cl}^-$  и през клетъчната мембрана в епителни клетки, на  $\text{HCO}_3^-$ , на  $\gamma$ -аминобутирилова киселина (GABA) в глиални клетки и глутамат [7] в астроцити и неврони на централна нервна система [5, 7, 8, 11, 12].

Клетките на РПЕ губят експресията hBest1 при *in vitro* култивиране, което затруднява неговото изучаване. Това наложи подбор на подходящи моделни системи, чрез които този белтък да бъде изследван.

Беше създадена моделна система от стабилно трансфектирана MDCK II-hBest1 клетъчна линия [13]. Това даде възможност за въвеждането на метод за получаване и пречистване на hBest1. Високият добив позволи провеждане на поредица *in vitro* изследвания.

Бяха определени вторични структури на чист белтък (3<sub>10</sub>-спирали (helices),  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -извивки (turns) и примки (loops)) чрез инфрачервена спектроскопия. Поради факта, че hBest1 е калциево-зависим канал беше определено влиянието на  $\text{Ca}^{2+}$  върху вторичните структури.

hBest1 е трансмембранен белтък и неговите конформация и структура зависят от липидното обкръжение в клетъчната мембрана. 1 - палмитоил – 2 – олеоил – sn – глицеро – 3 – фосфохолин (POPC) е мононенаситен фосфолипид (с характеристики между наситен и полиненаситен фосфолипид), който принадлежи към класа на глицерофосфохолините – едни от основните липиди в мембраните на еукариотните клетки [14]. Това го прави подходящ за формиране на белтък-липидни монослоеове с hBest1, които да бъдат изследвани чрез използването на везна на Лангмюир, микроскоп под ъгъл на Брюстер (Brewster angle microscope, BAM) и атомно силова микроскопия (Atomic force microscopy, AFM). Бяха определени ефектите на  $Ca^{2+}$  йони върху повърхностната активност ( $\pi/A$  изотерми и хистерезисни криви), олигомеризацията, молекулярната и макро-организация от „чисти“ белтъчни и смесени белтък-липидни Лангмюирови и Лангмюир-Блоджетови (ЛБ) филми. Поради описаната функция на hBest1 като транспортер на сигнални молекули в централната нервна система бяха извършени подобни изследвания върху ефектите на Glu и GABA върху белтъка. При транспортери промяната в конформацията им под влияние на сравнително големите молекули на невротрансмитерите има роля при преноса на последните през мембраната [15].

Използваната моделна система от MDCK II клетки не е физиологична за бестрофин-1, който ендогенно не се експресира в тези клетки. Поради тази причина бяха създадени стабилно трансфектирани клетки от човешки ретинален епител, които да експресират hBest1 (RPE1-hBest1). Беше изследвано поведението и влиянието на експресията на hBest1 върху жизнения цикъл и метаболизма на RPE-клетките.

## **II. Цели и задачи**

Цел на дисертационния труд е да се изследва връзката между структура и функция на hBest1 чрез установяване на: вторичните

структурни елементи на hBest1; взаимодействието на белтъка с моделни мембранни структури, неговата повърхностната активност и характеристики при вграждане в моделни мембрани в присъствие/отсъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA; както и влиянието на неговата експресия и поведение, върху жизнения цикъл и метаболизма на еукариотни клетки, свързано с мембранната му локализация и поляризация. Тези изследвания създават възможностите за изучаването на функционалната активност на hBest1 и молекулярните механизми, определящи патогенезата на бестрофинопатиите.

За осъществяване на целта, трябваше да бъдат изпълнени следните задачи:

- да се създаде и оптимизира метод за изолиране и пречистване на hBest1,
- да се определят и анализират елементи на вторичната структура на hBest1 и ролята на  $\text{Ca}^{2+}$  при тяхното формиране чрез FTIR,
- да се изследват повърхностните физикохимични характеристики и морфология на Лангмюирови монослоеви и Лангмюир-Блоджетови филми от пречистен hBest1 с/без участието на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA,
- чрез БАМ и AFM да се изследват повърхностните физикохимични характеристики и морфология на Лангмюирови монослоеви и Лангмюир-Блоджетови филми от hBest1 и POPC (1-палмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин) смеси с/без участието на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA и
- да се създаде и характеризира клетъчна линия произлизаща от ретинален епител, която стабилно експресира hBest1.

### III. Материали и методи

Бяха използвани следните клетъчните линии: RPE-1 (човешка, с произход от ретинален пигментен епител) и MDCK-hBest1 (линия от бъбречен епител от куче, която е стабилно трансфектирана с гена за човешки бестрофин-1). Всички клетки бяха отглеждани при стандартни условия при 37°C в овлажнена атмосфера, съдържаща 5% CO<sub>2</sub> в газовата фаза. За RPE-1 беше използвана хранителна среда DMEM-F12 HAM обогатена с 10% FCS, а за MDCK-hBest1 – DMEM, обогатена с 10% FCS и G418 (0.5mg/ml). След трансфекция с гена за hBest1 към средата за RPE-1-hBest1 беше добавен G418 в концентрация 0.3mg/ml. За провеждане на трансфекцията в RPE-1 клетките беше използван вектор pReceiver-Best1HisMycTag (Gene Copoeia TM). Трансфекцията беше извършена с Effectene (Qiagen, България), съгласно инструкциите на производителя. За определяне на клетъчната морфология бяха изготвени препарати с Giemsa. За установяване на степента на трансфекция се проведе имунофлуоресценция с мише антитяло срещу hBest1 и второ антимише козе IgG антитяло. При определяне на метаболитната активност на трансфектирани и нетрансфектирани RPE-1 беше използван МТТ-тест за 10 последователни дни. Измерването на трансепителна резистентност също се проведе за 10 дни, като клетките бяха култивирани върху ямки с полупропусклива мембрана (transwells).

Пречиштането на hBest1 се извърши от тотален клетъчен лизат от MDCK-hBest1 на две стъпки: афинитетна хроматография и молекулно-ситова хроматография. Преди всяка стъпка пробите бяха диализирани. За определянето на фракциите, съдържащи hBest1, се приложи имунодетекция чрез Western blot. Количеството белтък в пробите беше определено по метода на Smith. Добивът на пречистен hBest1 беше изчислен спрямо тоталното количество белтък в лизата.

Определянето на вторичните структури на hBest1 беше извършено чрез инфрачервена спектроскопия с фурие-трансформация (FTIR) на разтвор на чист белтък и в присъствие на Ca<sup>2+</sup>.

За да се определят повърхностните физикохимични характеристики на монослоеве от „чист“ hBest1 и hBest1/POPC смеси и влиянието на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA върху повърхностното им поведение бяха измерени изотерми и хистерезисни криви на свиване и разширение на Лангмюирови монослоеве и от тях бяха изчислени модулите на свиваемост като функция от площта за молекула. Монослоеве от чист hBest1 и hBest1/POPC смеси на подложка от NaCl и в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA бяха визуализирани посредством ВАР. За изследване на повърхностната структура и топология на белтъка бяха изготвени Лангмюир-Блоджетови филми от hBest1 и hBest1/POPC смеси, в присъствие и отсъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA. От тях бяха получени изображения чрез АFМ-система в интермитентен (tapping) режим непосредствено след прехвърляне на монослоеве.

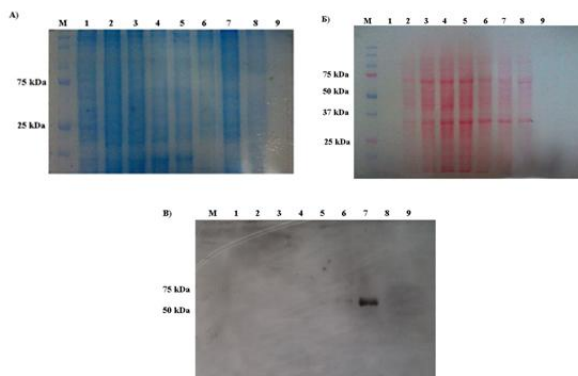
#### **IV. Резултати и дискусия**

##### **Създаване на метод за изолиране и пречистване на hBest1**

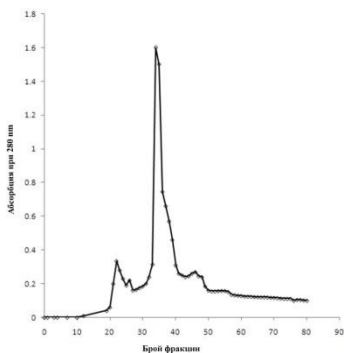
За реализирането на задачите в дисертационен труд беше необходимо получаването на пречистен белтък hBest1. За тази цел беше използвана стабилно трансфектираната линия MDCKII-hBest1. Преди всяка съпка беше извършвана диализа на пробата. Като първа стъпка на пречистване беше приложена афинитетна хроматография на тотален клетъчен лизат. Беше използвана HisTrap колона, която беше елуирана с градиент от имидазол (от 5 до 50 mM), Igepal (1%), саркозил (1%), На-деоксихолат (0.5%), NaCl (0.15M) и SDS (0.1%). Чрез имунодетекция бяха анализирани всички събрани проби, като фракциите, съдържащи hBest1, бяха визуализирани на имуноблот (Фиг.1).

Като втора стъпка/метод за пречистване след афинитетната хроматография беше приложена молекулно-ситова хроматография на фракциите, съдържащи hBest1. Беше използвана колона Superose 12 и елуент PBS (pH 7.4). Профилът на елуиране беше проследен чрез измерване на абсорбцията при

280 nm (Фиг.2). Фракциите бяха анализирани чрез имунодетекция (Фиг.3).

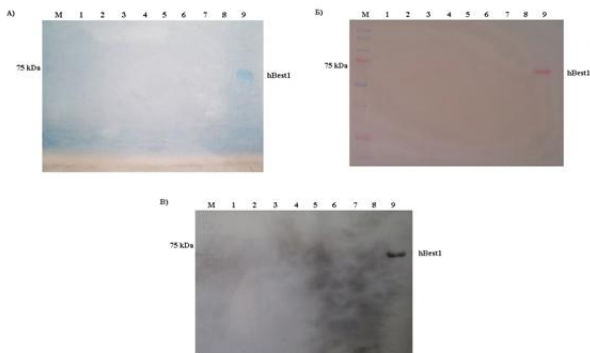


Фигура 1. Детектиране на hBest1 във фракциите след афинитетна хроматография А) Оцветяване на 10% полиакриламиден електрофоретичен гел чрез Coomassie; М- маркер за молекулна маса, 1-9 – номер на изследваните проби. Б) Оцветяване на нитроцелуозна мембрана след трансфер на белтъците. Оцветяване с Ponceau S. В) Детекция на hBest1 на филмова плака.



Фигура 2. Профил на елуиране по време на молекулно-ситова хроматография. Профилът на елуиране е наблюдаван при 280 nm.



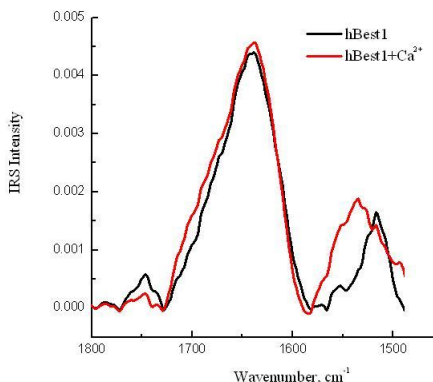


Фигура 3. Детектиране на hBest1 във фракциите след молекулно-ситова хроматография А) Оцветяване на 10% полиакриламиден електрофоретичен гел чрез Coomassie; М-маркер за молекулна маса, 1-9 – номер на изследваните проби. Б) Оцветяване на нитроцелуозна мембрана след трансфер на белтъците. Оцветяване с Ponceau S. В) Детекция на hBest1 на филмова плака.

По метода на Smith беше установено, че добивът на пречистения His-tagged hBest1 (крайна белтъчна концентрация - 412  $\mu\text{g/ml}$ ), изолиран от MDCK II – hBest1 клетки е 2,8% (установен въз основа на количеството белтък, отчетено в тоталните клетъчни лизати).

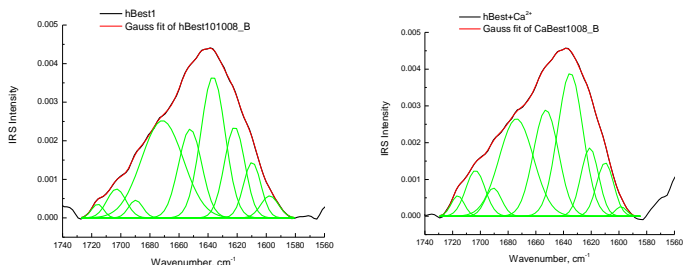
### **Определяне на елементите на вторичната структура на чист hBest1и в присъствие на калций**

Една от основните задачи поставени в дисертационния труд е да се определят елементите на вторичната структура и тяхното относително съдържание в молекулата на hBest1 в разтвор, което все още не е описано в литературата. Тъй като по литературни данни белтъкът е калциево-зависим канал, неговата вторична структура беше изследвана в отсъствие и в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  чрез инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация, FTIR (Фиг.4).



Фигура 4. FTIR спектри на чист бестрофин-1 (в черно) и в присъствие на калций (в червено) представени в областта на амид I (1638  $\text{cm}^{-1}$ ) и амид II (1534  $\text{cm}^{-1}$  (за чист бестрофин) или 1517  $\text{cm}^{-1}$  (в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ ) ивиците.

Спектрите показват известни различия. Откриват се четири основни абсорбционни ивици: амид I (произлизаща от валентното  $\text{C}=\text{O}$  трептене) при 1638  $\text{cm}^{-1}$ , амид II (смесено трептене  $\delta(\text{N-H}) + \nu(\text{C-N})$ ) при 1517  $\text{cm}^{-1}$  (за чист бестрофин) и 1534  $\text{cm}^{-1}$  (в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ ), „ножично“ деформационно трептене на  $-\text{CH}_2$ -групите (bending mode) при 1463  $\text{cm}^{-1}$  (за чист бестрофин) и 1431  $\text{cm}^{-1}$  (в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ ) и ивица на валентното трептене на страничните карбоксилни  $\text{C}=\text{O}$  групи на аспаратат и глутамат при 1746  $\text{cm}^{-1}$ . За да се идентифицират отделните елементи на вторичната структура в молекулата на hBest1 и да се определи количествено относителното им съдържание, беше проведено математическо декомпозиране на амид I ивицата в областта от вълнови числа от 1730  $\text{cm}^{-1}$  до 1580  $\text{cm}^{-1}$  (Фиг.5). На база на математическото декомпозиране беше изчислен относителния процент на вторичните структури на чистия hBest1 и в присъствие на калций (Таблица 1).



Фигура 4. FTIR спектър (в черно), Гаусов фит на спектъра (в червено, корелационен фактор на спектъра и фита  $\geq 0.9998$ ) и елементи на Гаусовото декомпозиране (в зелено) на чист hBest1 (А) и на hBest1 присъствие на калций (Б), представени в областта от вълнови числа между  $1730\text{ cm}^{-1}$  и  $1580\text{ cm}^{-1}$ .

**Таблица 1. Вторични структури на чист бестрофин-1 и в присъствие на калций**

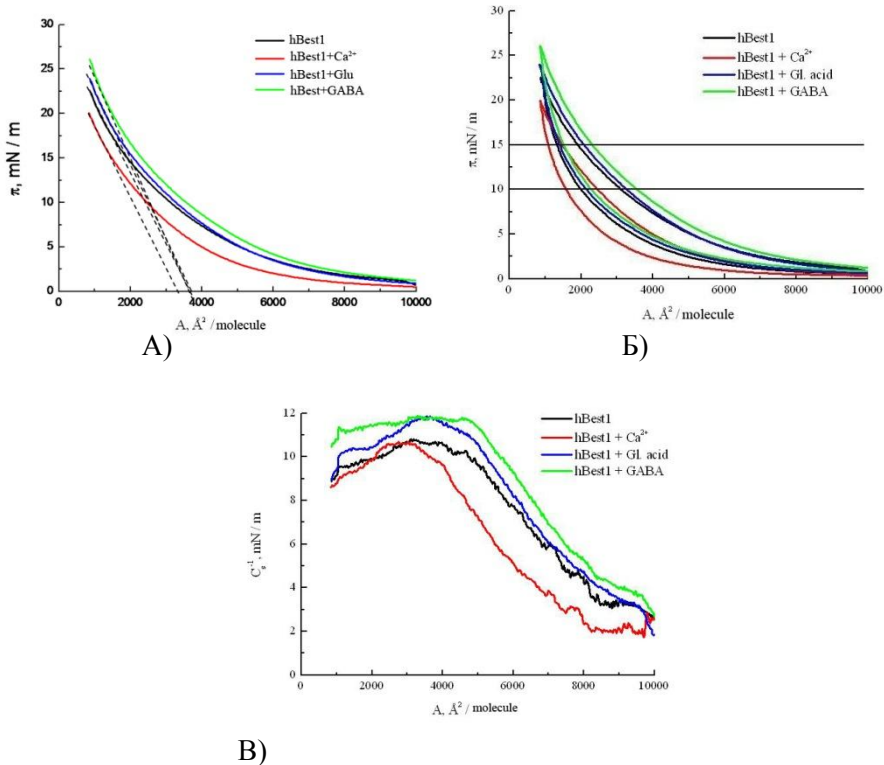
	WN, $\text{cm}^{-1}$	Структура	Относително съдържание на дадената структура, %
<b>hBest 1</b>	1716	Протонирана форма на –COOH група от страничната верига на аспаргат и глутамат	
	1703	–COOH групи на страничните вериги на аспаргат и глутамат с две водородни връзки	
	1690	анти паралелни $\beta$ -листове	2.0
	1671	малки $\beta$ -структури: $\beta$ -извивки и бримки	32.2
	1652	$\alpha$ -спирали	16.3
	1637	$3_{10}$ -спирали	27.2
	1622	агрегирани $\beta$ -листове	14.7
	1610	къси спирални участъци	7.6
	1598	депротонирана странична верига на тирозин	
<b>hBest 1+Ca<sup>2+</sup></b>	1716	Протонирана форма на –COOH група от страничната верига на аспаргат и глутамат	
	1703	–COOH групи на страничните вериги на аспаргат и глутамат с две водородни връзки	
	1690	анти паралелни $\beta$ -листове	3.7
	1674	малки $\beta$ -структури: $\beta$ -извивки и бримки	27.2
	1653	$\alpha$ -спирали	21.9
	1635	$3_{10}$ -спирали	29.8
	1621	агрегирани $\beta$ -листове	9.9
	1610	къси спирални участъци	7.5
	1598	депротонирана странична верига на тирозин	

Вторичните структурни елементи на hBest1 включват 51.1% спирални участъци:  $3_{10}$ -спирали (27.2%) и  $\alpha$ - и къси спирали (23.9% общо). В пробите с прибавен  $\text{Ca}^{2+}$  се отчете увеличаване на общото количество спирални участъци до 59.2%, дължащо се главно на нарастване на съдържанието на  $\alpha$ -спирали (с 5.6%). Получените резултати съответстват на публикуваните структури на KpBest и chBest1, чиито мембранни участъци са изградени основно от  $\alpha$ -спирали [16, 17]. Цитоплазмените им домени също съдържат голямо количество спирални структури. От модела на chBest1 в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  може да се изчисли, че съдържанието на спирални участъци е приблизително 59%. Подобни резултати са отчетени и за други белтъци: при калмодулин и парвалбумин се наблюдава също повишаване на количеството (с 6%) на спиралните структури в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  [18]. Количеството на  $\beta$ -извивки и бримки е 32.2% (при chBest1- Fab с  $\text{Ca}^{2+}$  е 31%). След добавяне на  $\text{Ca}^{2+}$  към hBest1 процента на тези структури спадна до 27.2%. Понижение се отчете и при антипаралелните  $\beta$ -листовете от 16.7% при чист белтък на 13.6% в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  (~10% при chBest1-Fab).

FTIR спектрите показват, че вторичната структура на бестрофин-1 се повлиява значително от присъствието на калциеви йони, основно чрез увеличаване на спиралните структури за сметка на късите свързващи участъци.

### **Изследване на повърхностните физикохимични характеристики и морфология на Лангмюирови монослое и Лангмюир-Блоджетови филми от пречистен hBest1 с/без участието на $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA**

За да се определят повърхностните физикохимични характеристики на монослой от чист hBest1 и влиянието на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA върху повърхностното му поведение бяха измерени изотерми и хистерезисни криви на свиване и разширение, и от тях бяха изчислени модулите на свиваемост като функция от площта за молекула (Фиг.5).



Фигура 5. А) Изотерми повърхностно налягане/ площ за молекула ( $\pi/A$ ) на монослоеве от hBest1 върху подложка от 150 mM NaCl (черно) в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  (червено), Glu (синьо) или GABA (зелено); Б) Хистерезисни криви повърхностно налягане/ площ за молекула ( $\pi/A$ ) на монослоеве от hBest1 върху подложка от 150 mM NaCl (черно) и в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  (червено), Glu (синьо) или GABA (зелено). В) Криви модул на свиваемост/ площ за молекула ( $C_s^{-1}/A$ ) на hBest1 на чиста подложка от 150 mM NaCl (черно) в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  (червено), Glu (синьо) или GABA (зелено).

Добавянето на компонентите към подложката повлиява началната стойност на повърхностното налягане след разтичането на монослоя, като то е най-ниско при слоевете с добавен  $\text{Ca}^{2+}$  в подложката ( $\pi_0 = 0.6$  mN/m), а най-високо при тези с GABA ( $\pi_0 = 1.2$  mN/m). Всички изотерми имат еднакъв ход на

равномерно нарастване на повърхностното налягане с намаляване на молекулна площ, без наличие на плата или чупки. При дадена площ за молекула най-високо повърхностно налягане беше отчетено при слоевете от hBest1 с добавена GABA към подложката, а най-ниско – при слоевете с добавен  $\text{Ca}^{2+}$ .

Модулите на свиваемост на филмите от hBest1 в присъствие на компонентите показват еднакъв ход, характеризиращ се с малко плато в началото на свиването. След достигане на максимум модула на свиваемост започва много плавно да намалява поради дестабилизиране на слоевете и началото на процеси на колапс, изразяващ се в изтласкване на белтъчни молекули към водната подложка. Изотермите показват, че добавянето на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu или GABA води до промяна на площта на протеиновата молекула на междуфазовата граница вода/въздух, в реда  $A^{\text{Ca}^{2+}} < A^{\text{NaCl}} < A^{\text{Glu}} < A^{\text{GABA}}$ . В изотермите се разграничават области с различен наклон. Чрез екстраполация на наклона на стръмната част от изотермите, при високи двумерни налягания, към нулево налягане се получава най-ниската възможна площ за молекула,  $A_0$ , до която може да се компресира монослоя без да настъпи колапс. За монослоеве от чист белтък върху подложка от NaCl тази гранична площ е  $A_0=3700 \text{ \AA}^2/\text{мономер}$  и не се променя при добавяне на Glu и GABA към подложката, докато при внасяне на калций намалява до  $3360 \text{ \AA}^2/\text{мономер}$ . Молекулната площ, взета при двумерно налягане  $20 \text{ mN/m}$ ,  $A_{20}$ , се влияе от въвеждането на допълнителни компоненти в подлежащата фаза и се изменя в реда  $A^{\text{Ca}^{2+}} (840 \text{ \AA}^2/\text{molecule}) < A^{\text{NaCl}} (1130 \text{ \AA}^2/\text{molecule}) < A^{\text{Glu}} (1300 \text{ \AA}^2/\text{molecule}) < A^{\text{GABA}} (1490 \text{ \AA}^2/\text{molecule})$ . Добавянето на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA към подлежащата фаза на монослоя от hBest1 вероятно променя конформацията на белтъчната молекула по начин, който в първия случай увеличава (изкарва) на повърхността хидрофилните ѝ участъци и така благоприятства изтласкването ѝ към водната фаза, докато в останалите два случая намалява (скрива) хидрофилните участъци и затруднява процеса на разтварянето в обема на подложката.

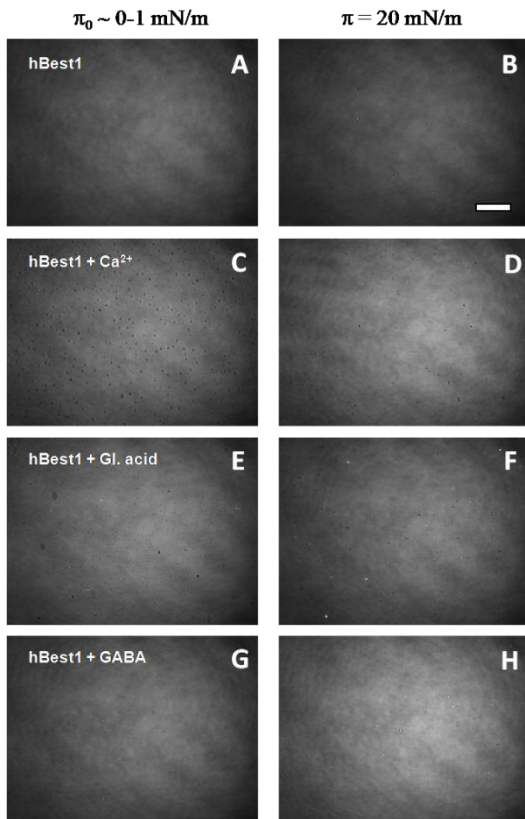
Хистерезисът на  $\pi/A$  изотермите се дефинира като разлика между молекулните площи в кривите на свиване и разширение при дадено повърхностно налягане. При всички случаи кривата

на разширение е по-стръмна и разположена при по-малки площи за молекула от тази на свиване, което показва разлика в състоянието на филмите при едни и същи термодинамични параметри при свиването и разширението. Хоризонталните участъци в началото на свиването и в края на разширението съвпадат само в случая на hBest1<sup>Ca2+</sup>, което показва, че крайното състояние на слоя в края на разширяването му е същото като това в началото на свиването. При останалите три филма хоризонталните участъци при разширяването са при по-ниско  $\pi$  от тези при свиването, което показва, че реорганизацията на протеиновите молекули, протичаща при свиването, е необратима и състоянието на монослоя при разширяването (подредба на молекулите и ориентацията им) е различно. Всички изследвани монослоеве имат значителен хистерезис, който намалява с нарастване на  $\pi$ . Разликата между стойностите на средните молекулни площи при свиване и разширение, представляваща хистерезиса, расте в реда  $A^{Ca^{2+}} < A^{NaCl} \leq A^{Glu} < A^{GABA}$  (при 15 mN/m). Модулите на свиваемост на филмите от чист hBest1 и в присъствие на компоненти показват еднакъв ход характеризиращ се с малко плато в началото на свиването, между 8000 и 10000 Å<sup>2</sup>/молекула, указващо промяна на ориентацията на протеиновите молекули на повърхността. В края на платото  $C_s^{-1}$  започва да расте, съответно свиваемостта на монослоеве да намалява в резултат на уплътняването на молекулите. Достига се максимум, след който модула на свиваемост започва много плавно да намалява поради дестабилизиране на слоевете и началото на процеси на колапс, вероятно изразяващ се в изтласкване на белтъчни молекули към водната подложка.

### **Морфология на Лангмюирови монослоеве от hBest1, hBest1+Ca<sup>2+</sup>, Glu или GABA.**

Морфологията на монослоеве от белтък в присъствие на Ca<sup>2+</sup>, GABA или Glu беше изследвана чрез Брюстеръглов микроскоп (ВАМ). Бяха получени два вида изображения – 30 мин след нанасяне на монослоя (преди да е компресиран), при  $\pi \sim 1$  mN/m и след свиване до повърхностно налягане 20 mN/m (при

което е осъществен преносът на Лангмюир-Блоджетовите (ЛБ) филми за изследване с AFM (Фигура 6).



Фигура 6. ВAM изображения на морфологията на монослоеове от hBest1 на чиста подложка и в присъствие на Ca<sup>2+</sup>, GABA или Glu при: (A) повърхностно напрежение около 1mN/m след 30 мин релаксация; (Б) филми, компресирани до повърхностно напрежение 20 mN/m.

ВAM-снимките показват, че преди компресия, при площ  $\sim 10^4 \text{ \AA}^2$ , молекулите на hBest1 формират компактни монослоеове, покриващи цялата водна повърхност (фигура 6 А, С, Е, G). Докато филмите на hBest1 и hBest1<sup>GABA</sup> са напълно хомогенни, при тези на hBest1<sup>Ca<sup>2+</sup></sup> и hBest1<sup>Glu</sup> се забелязват, както хомогенни



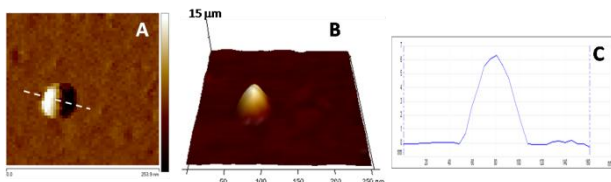
сиви области от кондензирана фаза така и тъмни овални области (черни “празнини”) с по-ниска плътност на молекулите в тях, вероятно покрити с филм в газова фаза. При свиването на монослоеве от hBest1<sup>Ca2+</sup> и hBest1<sup>Glu</sup> относителният дял на празнините намалява от 10% (от общата площ на слоя) при 1 mN/m, до само 3% при 20 mN/m (Фиг. 6 D, F).

Изследването продължи с прилагане на атомно силова микроскопия, която дава възможност за визуализиране на обекти с нанометрични размери. Чрез него може да се получи информация за конформацията на hBest1 и промяната ѝ в резултат от третирането с Ca<sup>2+</sup>, Glu и GABA.

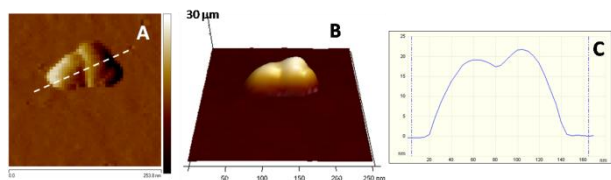
### **Изграждане на Лангмюир-Блоджетови филми и визуализиране на hBest1 с AFM**

Значителната повърхностна активност на hBest1 позволява пренасянето на монослойните му филми от течната повърхност върху стъклена пластинка.

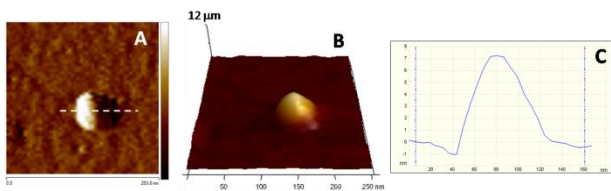
На фигура 7 са показани AFM изображения на чист hBest1, който има овална форма и латерални размери (след отчитане на ефекта от крайния размер на AFM-острието) приблизително 100×160 Å (±20 Å), а височината му е от около ~ 75 Å (±10 Å). В присъствие на 0.5μM Ca<sup>2+</sup>, молекулите на hBest1 формират димерни структури/димери с латерални размери ~ 200 × 670 Å и височина 220 Å (Фиг. 8) и тримери (200 × 990 Å, височина 220 Å, не са показани). На Фиг. 9 и 10 се вижда, че добавянето на Glu или GABA към водната подложка на монослоеве не индуцира агрегиране на молекулите на hBest1, както в случая с Ca<sup>2+</sup>, наблюдават се само единични молекули. Латералните размери на hBest1<sup>Glu</sup> и hBest1<sup>GABA</sup> са еднакви - 180 × 220 Å, а височината е съответно 80 Å и 100 Å.



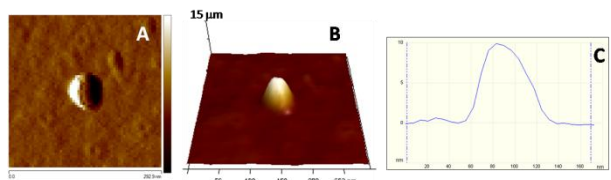
Фигура 7. А) AFM 2D- и В) 3D-изображение на hBest1 и С) напречно сечение на профила взето при пунктирната линия.



Фигура 8. А) AFM 2D- и В) 3D-изображение на hBest1<sup>Ca2+</sup> и С) напречно сечение на профила взето при пунктирната линия.



Фигура 9. А) AFM 2D- и В) 3D-изображение на hBest1<sup>Glu</sup> и С) напречно сечение на профила взето при пунктирната линия.



Фигура 10. А) AFM 2D- и В) 3D-изображение на hBest1<sup>GABA</sup> и С) напречно сечение на профила взето при пунктирната линия.

В присъствие на  $0.5 \mu\text{M Ca}^{2+}$ , молекулите на hBest1 формират димерни структури/димери с латерални размери  $\sim 200 \times 670 \text{ \AA}$  и височина  $220 \text{ \AA}$  (Фиг. 25) и тримери ( $200 \times 990 \text{ \AA}$ , височина  $220 \text{ \AA}$ , не са показани). Образуването на надмономерни структури в

присъствие на калций е показано при хомолози на hBest1 и редица други белтъци. При KpBest в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  се отчита образуване на пентамерни кристални структури [17]. Такива също са описани при chBest1, кристализиран в комплекс с моноклонални антитела [16]. При белтъците VILIP-1 (visinin-like protein 1) [19] и синаптотагмин (synaptotagmin) [20] е отчетено образуване на димерни структури в присъствие на калций. Образоването на димерни структури при тези белтъци има важно значение за правилното изпълнение на тяхната функция: VILIP-1 като модулатор на вътреклетъчни сигнални пътища в централна нервна система и синаптотагмин като калциев сензор за регулация на екзоцитозата при неврони.

Размерите на мономер от chBest1 са изчислени  $70 \times 70 \text{ \AA}$  в латерално направление и  $95 \text{ \AA}$  височина, което е по-малко от отчетените размери на hBest1 от AFM-изображенията. Това би могло да се дължи на по-голямата АК-последователност на hBest1 (585 АК за hBest1 спрямо 405 за chBest1), а също така и на спецификата на използвания метод.

Прибавянето на Glu или GABA към подложката предизвиква промяна в размерите на белтъка. Това може да се дължи на промяна в пространствената структура/ конформацията на hBest1 под влияние на Glu или GABA. Влияние върху конформацията на транспортери е отчетена и при други невротрансмитери, например при транспортера на серотонин (SERT) [15].

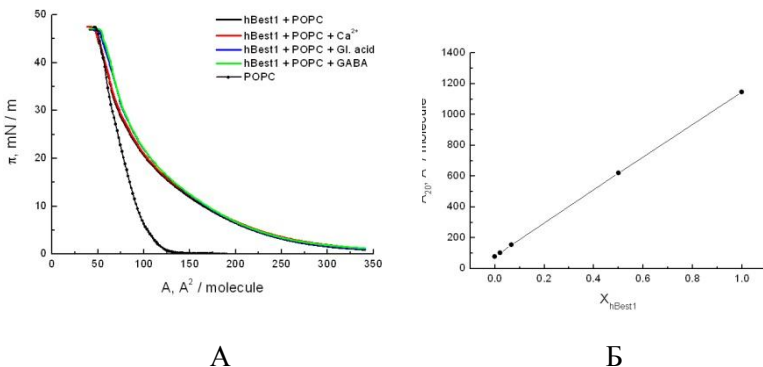
Разликите в размерите на hBest1 при прибавяне на калций (най-силно изразени), Glu или GABA потвърждават възникването на конформационни промени в белтъчните молекули, предположени на базата на резултатите от  $\pi/\text{A}$  изотермите и ВAM.

## **Изследване на повърхностните физикохимични характеристики и морфология на Лангмюирови монослое и Лангмюир-Блоджетови филми от пречистен hBest1 и 1-палмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC) с/без участието на $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA**

Построяването на модели на биомембрани е тясно свързано с изследването на многокомпонентни монослое. По тази причина изучаването на процесите на смесване или разделяне в опростени многокомпонентни системи има важно биологично значение. За целта на изследванията беше да построена моделна мембрана, в която съотношението на площта заета от протеини към тази заета от заобикалящите ги липиди е 1/3, смесените hBest1/POPC монослое са приготвяни при моларно съотношение на двата компонента 1/45.

Монослоят от POPC (Фигура 11 А) е винаги в течно-разтегната LE-фаза, при която липидните молекули са с произволно ориентирани преплетени въглеродородни вериги. Колапсирането му започва при  $\pi = 46 \text{ mN/m}$ , където в изотермата се наблюдава чупка. Изотермите на смесените hBest1/POPC монослое в присъствие и отсъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA показват идентичен ход. За разлика от монослоя на POPC, след разтичане и установяване на равновесие, двукомпонентните слоеве показват ненулево начално двумерно налягане, подобно на изотермите на hBest1. При двумерни налягания  $< 30 \text{ mN/m}$  ходът наподобява този на изотермите на hBest1, с плавно увеличаване на двумерното налягане при намаляване на молекулната площ. Изотермите показват ясно изразена чупка при  $\pi = 30 \text{ mN/m}$ . Тъй като нито един от компонентите, изграждащи смесените филми не формира кондензирана фаза, чупката показва колапс на един от компонентите. За да се направи оценка на смесваемостта на двата компонента върху водната повърхност беше построена графика на зависимостта на молекулната площ при дадено двумерно налягане ( $20 \text{ mN/m}$ ) от молната част на hBest1,  $X_{\text{hBest1}} \cdot X_{\text{hBest1}} = 1$  отговаря на еднокомпонентен слой от hBest1, а  $X_{\text{hBest1}} = 0$  на еднокомпонентен слой от POPC (Фиг. 11 Б). Данните са получени от изотерми на смесени hBest1/POPC

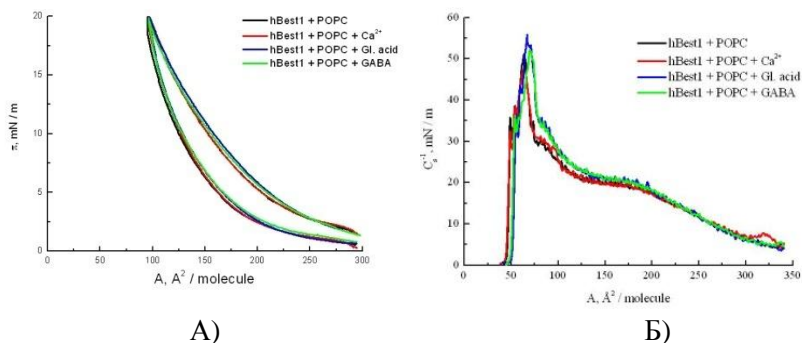
монослое с молно отношение на двата компонента 1/45, 1/15 и 1/1 (изотермите на последните две системи не са представени). Известно е, че когато между компонентите изграждащи монослоя настъпва идеално смесване или пълно фазово разделяне площта при дадено  $\pi$  се изменя линейно с промяна на молната част на който и да е от компонентите. Фактът, че и площта и налягането на колапс на монослоя от РОРС и на смесените монослое съвпадат (Фиг. 11 А) показва, че върху водната повърхност настъпва пълно фазово разделяне на двата компонента, показващо че белтък-белтъчните и липид-липидните взаимодействия са много по-силни от белтък-липидните и въвеждането на допълнителни компоненти към подлежащата фаза не повлиява тези взаимодействия. Компресирането на смесените монослое води до изгласкване на белтъчните молекули към водната фаза и над 30 mN/m, където се наблюдава чупката, на повърхността са останали само липидни молекули, които при по-нататъшно компресиране до 46 mN/m колапсират.



Фигура 11. А)  $\pi/A$  изотерми на едноконпонентен монослой от РОРС върху подложка от 150 mM NaCl (-.-) и смесени hBest1/РОРС монослое върху подложка от 150 mM NaCl (черно) в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  (червено), Glu (синьо) или GABA (зелено); Б) Молекулната площ при 20 mN/m,  $A_{20}$ , като функция от молната част  $X_{\text{hBest1}}$ .

На фигура 12 А са представени хистерезисните криви, получени при свиване на смесените монослое от hBest1 и РОРС

върху чиста подложки и при прибавяне на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu или GABA. Монослоевите са свивани до  $\pi = 20 \text{ mN/m}$  (под налягане от чупката в  $\pi/A$  изотермите при  $30 \text{ mN/m}$ ). Получените хистерезисните криви напълно съвпадат една с друга, т.е. не се наблюдава статистически значим ефект на добавените към подложката компоненти върху хистерезиса на смесените монослоеве. Зависимостите  $C_s^{-1}/A$  за смесените белтък-липидни филми (Фиг.12 Б) се характеризират с плавно нарастване на модула на свиваемост с намаляване на молекулната площ в интервала  $350\text{-}180 \text{ \AA}^2$ , плато при  $C_s^{-1} \sim 20 \text{ mN/m}$  (от  $180$  до  $130 \text{ \AA}^2/\text{молекула}$ ), съответстващо на процеса на изтласкване в субфазата на белтъчните молекули. Стръмното нарастване на  $C_s^{-1}$  с чупка при  $C_s^{-1} \sim 30\text{-}35 \text{ mN/m}$  и рязък максимум, вариращ между  $C_s^{-1} \sim 47 \text{ mN/m}$  при монослоят от hBest1/POPC $^{\text{Ca}^{2+}}$  до  $56 \text{ mN/m}$  при монослоят от hBest1/POPC $^{\text{Glu}}$ , е указание за колапс на монослоя.



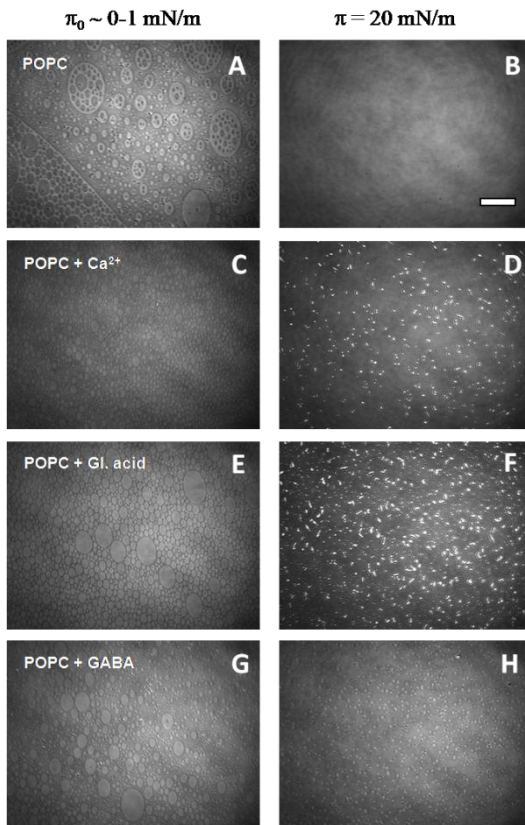
Фигура 12. А) Хистерезисни криви повърхностно налягане/площ за молекула ( $\pi/A$ ) на смесени монослоеве от hBest1 и POPC върху подложка от  $150 \text{ mM NaCl}$  (черно) и в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  (червено), Glu (синьо) или GABA (зелено). Б) Криви модул на свиваемост/площ за молекула ( $C_s^{-1}/A$ ) на hBest1 с POPC на чиста подложка от  $150 \text{ mM NaCl}$  (черно) в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  (червено), Glu (синьо) или GABA (зелено).

### Морфология на POPC и смесени hBest1/POPC Лангмюрови монослоеве с участието на Ca, Glu или GABA.

На фигура 13 са дадени ВАМ изображения на филми от POPC и смесени hBest1 с POPC в моларно съотношение  $1:45$ , на чиста

подложка и в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu или GABA при повърхностно напрежение 1mN/m и 20mN/m. При  $\pi=1\text{mN/m}$  монослоеве от РОРС показват съвместно съществуване на газова и течно-разтегната фаза, при което в монослоя се забелязват много празни пространства, „дупки“. При последващото свиване на филма от РОРС газовата фаза изчезва и той преминава изцяло в течно-разтегната фаза, при която монослоят е хомогенен и без дупки.

Прибавянето на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu или GABA не променя състоянието на РОРС при  $\pi = 1 \text{ mN/m}$ , наблюдава се същата двумерна „Лангмюирова пяна“. Ефектът им върху уплътнените РОРС филми, обаче е значителен. При 20 mN/m в слоевете се появяват множество ярки домени от кондензирана фаза.

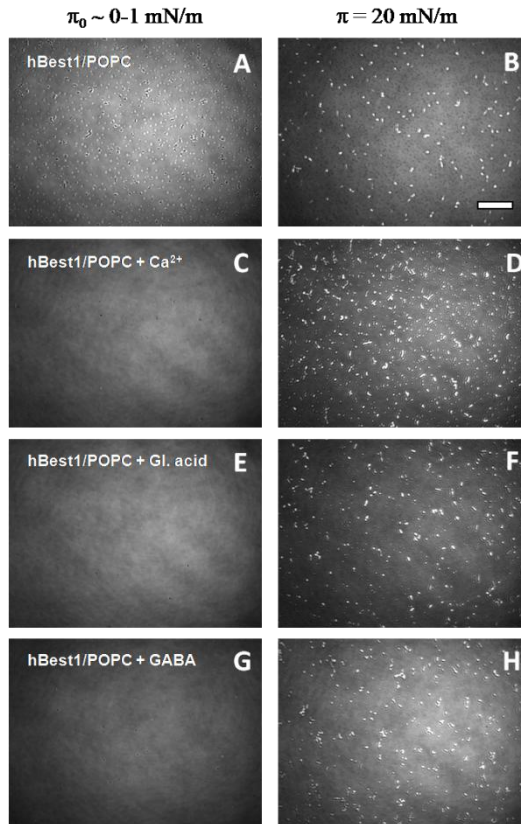


Фигура 13. ВАМ изображения на монослоеове от РОРС върху подложка от 150 mM NaCl и в присъствие на Ca<sup>2+</sup>, GABA или Glu при повърхностно напрежение 1 mN/m след 30 мин релаксация (лява колона), и компресиран до 20 mN/m (дясна колона).

Смесените hBest1/POPC монослоеове с добавени Ca<sup>2+</sup>, Glu и GABA (фиг.14) са изцяло хомогенни в некомпесирано състояние и не се наблюдава формирането на „Лангмюирова пяна“. Слойт върху подложка от 150 mM NaCl съдържа множество дребни овални домени с по-висока плътност разпределени равномерно в заобикалящия ги хомогенен филм. При компресиране на всички смесени филми до 20 mN/m се



наблюдава хомогенен разтегнат филм (при всички случаи), в който равномерно са разпределени ярки домени с по-висока плътност на опаковане. Най-голям брой такива домени се забелязват в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ . Домените са изградени от липидни, а не от белтъчни молекули и в смесените монослоеове при високи двумерни налягания настъпва фазово разделяне.

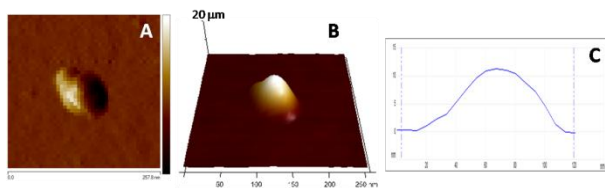


Фигура 14. ВАМ изображения на морфологията на смесени монослоеове от hBest1 и POPC в съотношение 1:45, върху подложка от 150 mM NaCl и в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , GABA или Glu при повърхностно напрежение 1 mN/m след 30 мин релаксация (лява колона), и компресиран до 20 mN/m (дясна колона).

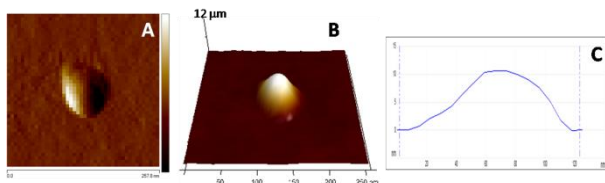
## Морфология на Лангмюир-Блоджетови монослоеве от смесени hBest1 и POPC с участието на Ca, Glu или GABA.

AFM топология на hBest1-молекулите, включени в смесени hBest1/POPC монослоеве, върху подложка от 150 mMNaCl, с добавка на Ca<sup>2+</sup>, Glu и GABA е представена съответно на Фиг. 15, 16, 17 и 18. В никой от случаите не е наблюдавано агрегиране и формиране на надмономерни структури. Протеинът запазва овалната си форма. Размерите му са:

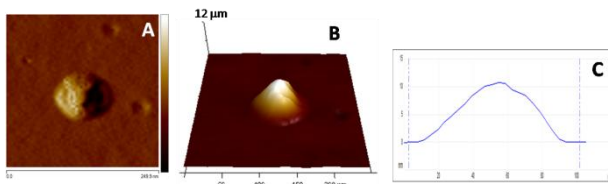
- Върху подложка от 150 mMNaCl: латерални размери 230×260 Å (±20 Å), височината 120 Å (±10 Å)
- Върху подложка от 150 mMNaCl + Ca<sup>2+</sup>: латерални размери 280×330 Å (±20 Å), височината 120 Å (±10 Å)
- Върху подложка от 150 mMNaCl + Glu: латерални размери 220×240 Å (±20 Å), височината 100 Å (±10 Å)
- Върху подложка от 150 mMNaCl + GABA: латерални размери 260×310 Å (±20 Å), височината 150 Å (±10 Å)



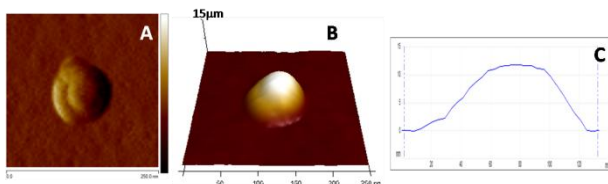
Фигура 15. AFM изображение на hBest с POPC



Фигура 16. AFM изображение на hBest с POPC в присъствие на калций



Фигура 17. AFM изображение на hBest с POPC в присъствие на Glu



Фигура 18. AFM изображение на hBest с POPC в присъствие на GABA

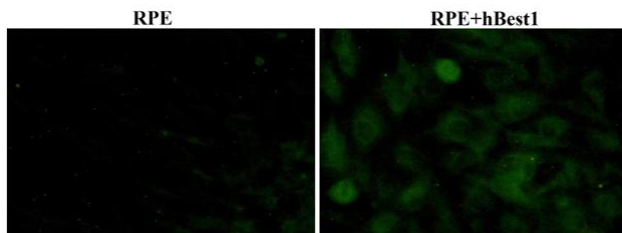
Контролата (върху подложка от 150 mMNaCl) се характеризира с латерални размери по-големи от тези в еднокомпонентния белтъчен филм. Височината също е значително по-голяма. Добавянето на Glu не повлиява размерите, те остават същите като на контролата, в рамките на експерименталната грешка. Добавянето на  $\text{Ca}^{2+}$  и GABA оказва еднопосочно въздействие върху размера на протеина, който е с 20-25% по-висок от този на контролата. По-високите отчетени размери може да се дължат на присъствието на POPC, който би могъл да играе роля на ануларен липид, формирайки „обвивка“ около белтъка [21].

### **Създаване и характеризирание на клетъчна линия, произлизаща от ретинален епител, която стабилно експресира hBest1.**

За да се определи влиянието на hBest1 върху клетки от ретинален пигментен епител беше извършена трансфекция с ген за човешки бестрофин-1. Ефективността на трансфекция беше установена чрез имунодетекция на белтъка (Фиг. 19). В контролата не беше установен сигнал (зелена флуоресценция), за

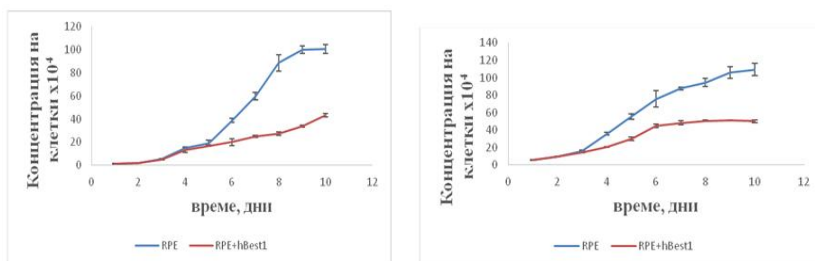
разлика от трансфектираните RPE, където над 90% от клетките бяха положителни за наличието на трансфектиран hBest1.

Полученият чрез имунофлуоресценция сигнал показва, че трансфекцията е протекла успешно и е получена стабилно трансфектирана клетъчна линия.



Фигура 19. Имунофлуоресценция на нетрансфектирани RPE и трансфектирани RPE+hBest1 клетки.

За установяване навлиянието на hBest1 върху растежа на RPE-1 клетките, беше проследено нарастването на броя клетки на трансфектирани и нетрансфектирани RPE-1 за 10 поредни дни (фиг. 20). Получените криви показаха значителни разлики в темповете на растеж при начални концентрации  $1 \cdot 10^4$  клетки/ml и  $5 \cdot 10^4$  клетки/ml.



А

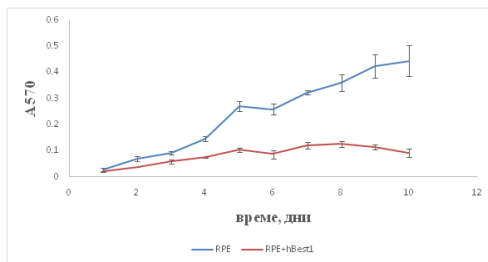
Б

Фиг. 20. Криви на растеж на стабилно трансфектирани (в червено) и нетрансфектирани (в синьо) с бестрофин-1 RPE-1 клетки. А) При начална концентрация на посяване  $1 \cdot 10^4$  клетки/ml;  $p$ -value =  $2,73 \cdot 10^{-5}$ . Б) При начална концентрация на посяване  $5 \cdot 10^4$  клетки/ml;  $p$ -value =  $1,39 \cdot 10^{-7}$ .

При начална концентрация  $1 \cdot 10^4$  клетки/ml, lag-фазата беше с продължителност 4-5 дни и за двете клетъчни линии. През log-фазата нарастването на броя трансфектирани RPE-1 клетки беше значително по-бавно и продължи до края на експеримента. При нетрансфектираните клетки log-фазата продължи до 8-ми ден, като 9-10-ти ден се достигна до плато. При RPE-1-hBest1 за времето на провеждане на експериментите не беше достигнато плато.

При клетките с начална концентрация от  $5 \cdot 10^4$  клетки/mL беше установено, че lag-фазата за нетрансфектираните продължава 2 дни. При RPE-1-hBest1 клетки нямаше ясно изразена граница между lag- и log-фазата и културата достигна плато на 6-я ден. До края на експеримента не беше отчетено навлизане във фаза на отмиране и при двете линии.

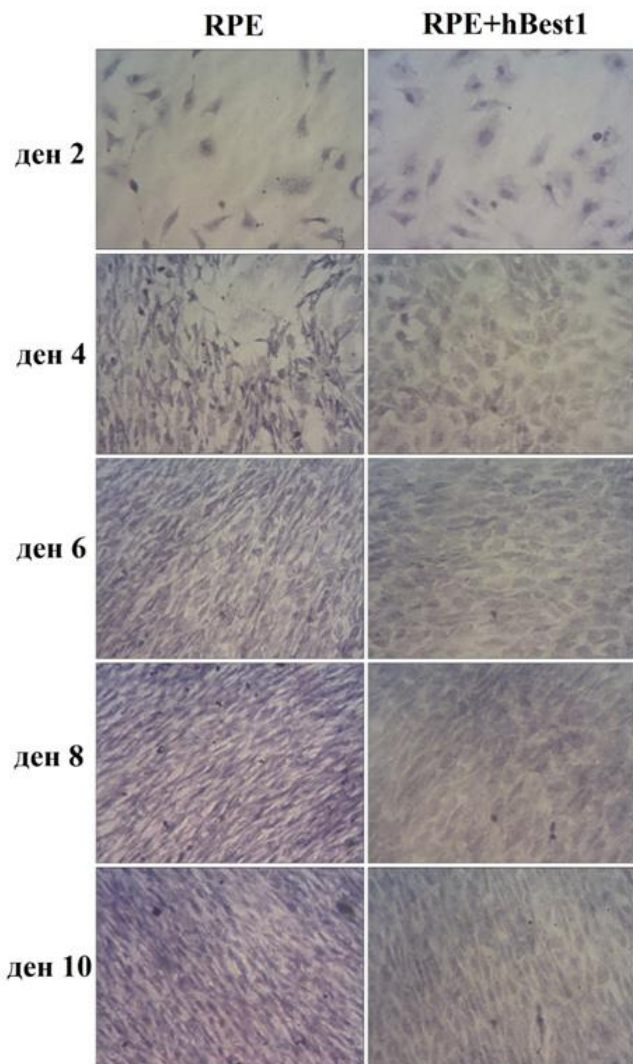
Описаните разлики в темповете на растеж дадоха отражение върху стойностите на метаболитната активност на двата типа клетъчни линии (отчетена чрез МТТ тест).



Фиг. 21. Метаболитна активност на стабилно трансфектирани (в червено) и нетрансфектирани (в синьо) RPE-1 в продължение на 10 дни;  $p\text{-value} = 9,76 \cdot 10^{-4}$

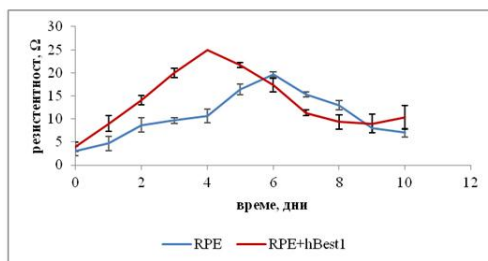
Нетрансфектираните клетки показаха по-високи стойности. При тях активността не спря да нараства през целия период на провеждане на експеримента, което кореспондира добре със стойностите, получени от растежните криви. RPE-1-hBest1 показаха значително по-ниски стойности на метаболитната активност поради по-ниския брой клетки.

За установяване на разлики в морфологията на RPE-1 клетките, в резултат от трансфекцията с Best-1, бяха изготвени трайни микроскопски препарати клетки в различни периоди на култивиране (фиг. 22). Както се вижда от фигурата монослоят от нетрансфектирани клетки се уплътнява значително по-бързо от RPE-1-hBest1. При ниска плътност на слоя клетките и от двете линии изглеждаха по-окръглени. На 4-я ден трансфектираните изглеждаха по-малки и с по-удължена форма. Трансфектираните запазиха големината и формата си, като слоя изглеждаше по-уплътнен от този на нетрансфектираните.



Фиг. 22 Монослоеве, образувани от нетрансфектирани и трансфектирани с hBest1 RPE-1 клетки

Данни за йонната проводимост на монослоеве от трансфектирани и нетрансфектирани клетки могат да бъдат получени чрез измерване на трансепителната резистентност. Отчетените стойности за десет последователни дни са представени на Фигура 23.



Фиг. 23 Трансепителна резистентност на стабилно трансфектирани (в червено) и нетрансфектирани (в синьо) RPE-1 в продължение на 10 дни;  $p$ -value =  $8,87 \cdot 10^{-2}$ .

Още в първите дни на провеждане на експеримента бяха наблюдавани разлики в стойностите за двете линии. При RPE-1 максимум на трансепителната резистентност беше достигнат на 6-я ден, но с по-ниска стойност от тази при трансфектираните. RPE-1-hBest1 показаха по-висока трансепителна резистентност още от първия ден, достигнаха максимум на четвъртия, след което стойностите намаляха. След достигане на максимум, трансепителната резистентност и на двете линии отново се понижи, достигайки до по-високи стойности от изходните.

Една от основните функции на Cl<sup>-</sup> канали (какврто се предполага, че е бестрофин-1) е регулиране обема на клетките. По-големият обем на трансфектираните клетки е възможно да е в следствие от наличието на такъв канал в плазмената мембрана. Тъй като трансфектираните клетки са по-големи е нужен по-малък брой от тях за да се образува монослой. Поради образуване на плътни контакти тяхното делене би могло да се инхибира порано. Тъй като по-малко на брой клетки са необходими за



уплътняване на слоя, достигането на максимум на трансепителна резистентност е по-бързо. По-бързото достигане на висока трансепителна резистентност и клетъчна поляризация на трансфектираните RPE-1 клетки също така би могло да бъде свързано с обърнатата клетъчна поляризация на редица йонни канали и транспортери в RPE спрямо останалите типове епител. Функцията на бестрофин-1 като регулатор на калциево-зависими йонни канали (дори още преди локализирането му в клетъчната мембрана) би могла да определи преструктуриране на актиновия цитоскелет и плътните контакти, което да доведе до по-бърз и по-висок максимум на резистентност. От друга страна, понижените стойности на метаболитна активност и клетъчен растеж и променената морфология на стабилно трансфектираните клетки насочва към възможността бестрофин-1 да влияе върху клетъчната пролиферация и диференциация.

Структурата и функцията на hBest1 са все още дискуссионни и ненапълно проучени, но взаимодействието на белтъка с липидите на плазмената мембрана е от особено значение, определящо хомеостазата и правилното функциониране на RPE в ретината. Създаването и оптимизирането на метод за пречистване на hBest1 от стабилно трансфектирани MDCKII-hBest1 клетки позволи да се определят елементи на вторичната структура на белтъка, чрез FTIR и беше описано влиянието на калциевите йони върху тяхното процентно съдържание.

Чрез изучаване на повърхностните характеристики (изотерми и хистерезисни криви, получаване на BAM- и AFM-изображения) на монослоеве от бестрофин и бестрофин-POPC беше характеризирано *in vitro* влиянието на калций, Glu и GABA върху повърхностната динамика на белтъка, неговата конформация и олигомеризация. Получените данни предполагат, че изследваните йони играят съществена роля при взаимодействието между белтъка и липидите/липидните домени в състава на клетъчната мембрана.

Беше определено влиянието на hBest1 върху стабилно трансфектирани клетки от ретинален епител RPE-hBest1. Клетките показаха по-бавни темпове на растеж от

нетрансфектираните, но по-бързо достигнаха максимални стойности на трансепителна резистентност.

Получените фундаментални резултати са важни: за разбирането на структурата и функцията на hBest1 като трансмембранен канал и ролята на най-често срещаните мутации с патолофизиологичен ефект (например свързани с некоректно нагъване) и за търсене на начини за възстановяване на нативната форма и функционалната му активност.

## Изводи:

- Чрез афинитетна и молекулноситова хроматография беше изолиран и пречистен човешки бестрофин 1 с висок добив.

- Чрез инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация (FTIR) е установено, че вторичната структура на hBest1 включва 51.1% спирални участъци, които се повлияват значително от присъствието на  $\text{Ca}^{2+}$ , основно чрез увеличаване на спиралните структури (59.2%) за сметка на късите участии.

- Изследвани са  $\pi/\text{A}$  изотерми (повърхностно налягане/площ на молекула), хистерезисни криви и модул на свиваемост  $C_s^{-1}$  от молекулната площ на Лангмуирови монослоеове от hBest1 в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA. Показано е, че при всяко  $\pi$  прибавянето на  $\text{Ca}^{2+}$  води до изместване на изотермите към по-ниски площи, а на Glu и GABA - към по-високи. Установени са промяна на площта на hBest1 на междуфазовата граница вода/въздух, в реда  $A^{\text{Ca}^{2+}} < A^{\text{NaCl}} < A^{\text{Glu}} < A^{\text{GABA}}$  и осъществяването на фазов преход на монослоя в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$  около  $3100\text{\AA}^2$ .

- Изследването на морфологията на монослоя чрез БАМ показва, че филмите на hBest1 и hBest1<sup>GABA</sup> са напълно хомогенни, докато тези на hBest1<sup>Ca2+</sup> и hBest1<sup>Glu</sup> са хетерогенни, съдържащи кондензирана и газова фаза, като площта на последната драстично намалява при свиване на монослоя.

- Чрез ВАМ е установена морфологията на Лангмуирови монослоеове от РОРС и смесени hBest1/РОРС (палмитолеоил фосфатидилхолин) филми в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA, преди и след компресия. Монослоевите от РОРС показват съвместно съществуване на газова и течно-разтегната фаза, като газовата фаза изчезва след компресия. Ефектите на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA върху уплътнените РОРС филми водят до поява на множество ярки домени от кондензирана фаза. При смесените филми след компресия се наблюдава съществуването на флуидна фаза и липидни домени с по-висока плътност с различен брой и големина (най-ярко изразени в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ ).

- Посредством AFM е установена топологията на hBest1 Лангмуир-Блоджетови (ЛБ) филми и смесени hBest1/РОРС ЛБ

филми в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA. За еднокомпонентния филм са установени размерите (100x160x75Å) и формата на hBest1, които нарастват в присъствие на Glu и GABA, докато при добавяне на  $\text{Ca}^{2+}$  нарастването е значително и е съпроводено с димеризация. Показано е, че при смесените hBest1/ПОРС филми се наблюдава нарастване на размера (200x670x220Å), върху който влиянието на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA е незначително.

- Експресията на hBest1 оказва влияние върху ретиналните пигментни клетки. Новополучената стабилна клетъчна линия RPE1-hBest1 показва променени морфологични характеристики – клетките имат по-голям обем и по-закръглена форма.

- RPE1-hBest1 клетките имат понижени темповете на растеж, понижена степен на делене, по-ниска метаболитна активност и променена трансепителна резистентност.

### **Приноси:**

1. За първи път е разработен метод за получаване на пречистен hBest1 от стабилно трансфектирана клетъчна линия MDCKII-hBest1.

2. За първи път са определени елементи от вторичната структура на hBest1 и влиянието на  $\text{Ca}^{2+}$  върху неговата конформация.

3. Приложени са моделни мембрани за структурно изследване на човешки бестрофин-1. Получени са оригинални данни за взаимодействията на hBest1 с липиди в Лангмюирови монослоеве; за морфологията и размерите на hBest1 и hBest1/ПОРС в Лангмюир-Блоджетови филми в присъствие на  $\text{Ca}^{2+}$ , Glu и GABA.

4. Създадена е нова стабилно трансфектирана клетъчна линия от ретинален пигментен епител RPE1-hBest1, която експресира гена за човешки бестрофин-1.

## Публикации, свързани с темата на дисертацията:

1. K. Mladenova, S. Petrova, V. Moskova-Doumanova, A. Jordanova, T. Topouzova-Hristova, Z. Lalchev, J. Doumanov, “*Characterization of morphology and growth rate of stably transfected MDCK cell line, expressing wild type of hBest1 protein*”, Science & Technologies, 3(1), 32-36, 2013.

2. K. Mladenova, S. Petrova, G. Georgiev, V. Moskova-Doumanova, Z. Lalchev, J. Doumanov, “*Interaction of Bestrophin-1 with 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) in surface films*”, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 122, 432-438, 2014. (IF 4.287)

3. K. Mladenova, S. Petrova, V. Moskova-Doumanova, T. Topouzova-Hristova, S. Stoitsova, I. Tabashka, C. Chakarova, Z. Lalchev, J. Doumanov, “*Transepithelial resistance in human Bestrophin-1 stably transfected Madin-Darby Canine Kidney II cells*”. Biotechnology and biotechnological equipment, 29(1), 101-104, 2015. (IF 0.622)

## Цитати:

K. Mladenova, S. Petrova, G. Georgiev, V. Moskova-Doumanova, Z. Lalchev, J. Doumanov, “*Interaction of Bestrophin-1 with 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) in surface films*”, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 122, 432-438, 2014.

## е цитирана в:

1. Luciano Caseli , Thatyane Morimoto Nobre , Ana Paula Ramos, Douglas Santos Monteiro, Maria Elisabete Darbello Zaniquelli, *The Role of Langmuir Monolayers To Understand Biological Events*, Chapter 4, pp 65–88, Chapter (book) DOI: 10.1021/bk-2015-1215.ch004, ACS Symposium Series, Vol. 1215, ISBN13: 9780841231207eISBN: 9780841231191, Publication Date (Web): December 8, 2015, Copyright © 2015 American Chemical Society.

2. Andreia Filipa Costa Cuco, *Interação entre um péptido  $\beta$ -amilóide, responsável pela doença de Alzheimer, e modelos biomembranares*, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em, Bioengenharia e Nanossistemas, Tecno Lisboa, Novembro de 2014.

## Участия в научни форуми:

1. K. Mladenova, S. Petrova, V. Moskova-Doumanova, T. Topouzova-Hristova, C. Chakarova, Z. Lalchev, J. Doumanov, *Transepithelial resistance in human bestrophin-1 stably transfected MDCK cells*, International Conference "Bioscience - development and new opportunities" - Kliment's Days 2013, poster MB38, Sofia.
2. K. Mladenova, S. Petrova, T. Andreeva, V. Moskova-Doumanova, Z. Lalchev, J. Doumanov, *Effect of Ca<sup>2+</sup> ions on Bestrophin-1 interaction with 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in surface films*, 40th Congress of The Federation of European Biochemical Societies (FEBS), poster P33-022, 4-9 July 2015, Berlin.
3. K. Mladenova, S. Petrova, T. Andreeva, E. Yotsova, V. Moskova-Doumanova, Z. Lalchev, J. Doumanov, *Influence of Glu tamate on Bestrophin-1 interaction with POPC in Langmuir-Blodgett films*, Anniversary Conference of the Roumen Tsanev Institute of Molecular Biology, 5-6 October, 2015, Sofia.

## Литература:

1. 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.
2. Boon, C.J., et al., *Clinical and molecular genetic analysis of best vitelliform macular dystrophy*. Retina, 2009. **29**(6): p. 835-47.
3. 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.
4. Marquardt, A., et al., *Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease)*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(9): p. 1517-25.
5. 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.
6. Stone, E.M., et al., *Genetic linkage of vitelliform macular degeneration (Best's disease) to chromosome 11q13*. Nat Genet, 1992. **1**(4): p. 246-50.
7. Lee, S., et al., *Channel-mediated tonic GABA release from glia*. Science, 2010. **330**(6005): p. 790-6.
8. 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.

9. Milenkovic, V.M., et al., *Insertion and topology of normal and mutant bestrophin-1 in the endoplasmic reticulum membrane*. J Biol Chem, 2007. **282**(2): p. 1313-21.
10. Tsunenari, T., et al., *Structure-function analysis of the bestrophin family of anion channels*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 41114-25.
11. Casey, J.R., *Why bicarbonate?* Biochem Cell Biol, 2006. **84**(6): p. 930-9.
12. Qu, Z. and H.C. Hartzell, *Bestrophin Cl<sup>-</sup> channels are highly permeable to HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **294**(6): p. C1371-7.
13. MLADENOVA, K., V. MOSKOVA-DOUMANOVA, I. TABASHKA, S. PETROVA, Z. LALCHEV and J. DOUMANOV. *Establishment and characterization of stably transfected MDCK cell line, expressing hBest1 protein*. Bulg. J. Agric. Sci 2013 19 (2)]; 159–162].
14. Huynh, L., et al., *Structural properties of POPC monolayers under lateral compression: computer simulations analysis*. Langmuir, 2014. **30**(2): p. 564-73.
15. Soderhielm, P.C., et al., *Substrate and Inhibitor-Specific Conformational Changes in the Human Serotonin Transporter Revealed by Voltage-Clamp Fluorometry*. 2015. **88**(4): p. 676-88.
16. Dickson, V.K., L. Pedi, and S.B. Long, *Structure and insights into the function of a Ca(2+)-activated Cl(-) channel*. Nature, 2014. **516**(7530): p. 213-218.
17. Yang, T., et al., *Structure and selectivity in bestrophin ion channels*. Science, 2014. **346**(6207): p. 355-9.
18. Jackson, M., P.I. Haris, and D. Chapman, *Fourier transform infrared spectroscopic studies of calcium-binding proteins*. Biochemistry, 1991. **30**(40): p. 9681-9686.
19. Liebl, M.P., et al., *Dimerization of visinin-like protein 1 is regulated by oxidative stress and calcium and is a pathological hallmark of amyotrophic lateral sclerosis*. Free Radic Biol Med, 2014. **72**: p. 41-54.
20. Chapman, E.R., et al., *A novel function for the second C2 domain of synaptotagmin. Ca<sup>2+</sup>-triggered dimerization*. J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5844-9.
21. Palsdottir, H. and C. Hunte, *Lipids in membrane protein structures*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1666**(1-2): p. 2-18.