

Рецензия

Върху дисертационния труд на асистент Кирилка Стефанова Младенова докторант към Катедра Биохимия, Биологически факултет, СУ „Климент Охридски“ за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ по научната специалност

4.3 Биологически науки
(Молекулярна биология)

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

от. Проф. Диана Христова Петкова, д.б.н.

Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН

Дисертационният труд е посветен на изясняване на някои от молекулните механизми на взаимодействието на белтъка бестрофин-1 с биомиметични структури и поведението му в еукариотни клетки. Темата на дисертацията е много актуална, защото често срещаните патологии на макулата са от съществено социално значение, а за структурата на белтъка и механизмите на неговите взаимодействия със съединения, които влияят на функционалната му активност все още се знае много малко.

Конформацията на белтъка за правилното му функциониране като трансмембранен протеин би трябвало да зависи от липидното му обкръжение в мембранныя бислой, както и от физикохимичното състояние на обкръжаващите го липиди. Докторантката правилно се е насочила към изясняване на тези ефекти, тъй като на мен не са ми известни данни в литературата по този въпрос.

Дисертацията е написана на 104 стр., от които 32 стр. Обзор, 1 стр. Цел и задачи, 12 стр. Материали и методи, 28 стр. Резултати и дискусия, 2 стр. Изводи, 1 стр. Приноси и 9 стр. Литература. Считам, че дисертацията е правилно структурирана и е спазено съотношението между отделните части.

В обзора са характеризирани проявите на патологии дължащи се на мутациите на различните форми на бестрофина и тяхното развитие, както и методите за установяване на тези заболявания. Описана е локализацията на гена в генома на клетките и до сега известните типове белтъци от това семейство. Приведени са данни за структурата и конформацията на белтъка в мембраната, както и за структурата на белтъка при образуване на мембранни канали. Специално внимание е отделено на регулацията на активността на протена от Ca^{++} , процесите на сортиране към базолатералната страна на полярни клетки и процесите на фосфорилиране. Разгледани са подробно свойствата на бестрофин-1 като йонен канал, както и участието му при провеждане процесите на сигнали в нервната система. Бих искала да отбележа , че обзора показва задълбочените и широки познания на докторантката по тематиката на дисертацията.

Задачите са ясно формулирани и напълно покриват поставената цел.

За да реши поставените задачи докторантката е използвала многобройни съвременни методи като инфрачервена спектроскопия с Фурие – трансформация, атомно-силова микроскопия, Брюстер-ъглова микроскопия, везна на Лангмюир и редица молекулярнобиологични и хроматографски методи. Използваните методи са описани подробно и с разбиране, което говори, че докторантката е добре запозната с тях и не буди съмнение, че тя е изработила основната част от експериментите.

Получените резултати са били възможни поради създаване на стабилно експресираща белтъка клетъчна линия MDCK II и методика за получаване на пречистен и функционално активен белтък. Считам, че това е едно от най-важните постижения на дисертантката без разбира се да омаловажавам останалите. Чрез горепосочените методи е доказано , че вторичната структура на бестрофин-1 се влияе от наличието на Ca^{++} , които повлияват и физикохимичните характеристики на смесени

монослоеве с включен белтък. Във вторичната структура на нативния протеин са установени основно α – спирали и антипаралелни β – листове. При наличие на Ca^{++} се наблюдава повишение на количеството на α - спиралните участъци. Установено е, че механизмите на въздействие на Ca^{++} , глутамата и гама-аминобутирата върху конформацията на белтъка са много близки помежду си. Ca^{2++} и гама-аминобутират променят физикохимичните характеристики и морфологията на Лагмюирови монослоеве и Лангмюир- Блоджетови филми на Бест-1 в различна посока. Тези резултати са индикация за промените в конформацията, ориентацията и организацията на белтъка в монослоя. Установено е и намаление на граничната площ на белтъка при добавяне на Ca^{++} , което е отново индикация за настъпване на конформационни промени в молекулата на белтъка при наличие на тези катйони в средата. Лангмюир-Блоджетовите филми показват, че чистия белтък образува хомогенни филми, докато силна фазова сепарация се наблюдава при филми от РОРС и белтък, която не се повлиява от наличието на влияещи върху конформацията на белтъка йони или съединения, но добавянето на тези съединения при компресия води до образуване на домени с различна плътност.

Тъй като чистият белтък формира стабилни монослоеве е било възможно изследването на изображението му чрез атомно силова микроскопия. Чрез този метод за пръв път е визуализирана молекулата на белтъка и са определени нейните размери. В присъствие на Ca^{++} молекулите формират димери, което е от съществено значение за изпълнение на функцията му в клетките. Другите изследвани съединения не повлияват агрегацията на белтъка.

Проследени са промените във формата и функционалната активност на създадена стабилна клетъчна линия от ретинални пигментни клетки трансфектирани с ген за човешки бестрофин-1. Установена е разлика в растежа на трансфектираните

клетки спрямо контролата. Експресията на Бест-1 повлиява морфологията на клетките, както и трансепителната резистентност. Авторката е предположила, че тези различия се дължат на функцията на белтъка като Ca^{++} канал и влиянието му върху пролиферацията и диференциацията на епителните клетки на ретината, с което могат да се обяснят появата на дефекти в ретината при някои патологии.

Считам, че получените резултати при разработване на тази дисертация биха имали голямо приложение при изясняване на патофизиологичните дефекти дължащи се на функцията на Бест -1 като трансмембранен канал и търсене на начини за възстановяване на нормалната функция на ретината в бъдеще.

Бих искала да отбележа, че тази дисертация обяснява редица свойства на белтъка Бест-1 и механизмите на взаимодействията му с мембранните липиди.

Според мен някои от изводите са излишно разширени с получени резултати.

Към докторантката имам следните въпроси:

1. На какво според нея се дължи появата на домени от кондензирана фаза при въздействие на Ca^{++} , глутамат и гама-аминобутирилова киселина върху уплътнени филми на POPC ?
2. Използвайки получените резултати докторантката може ли да даде някакво обяснение за механизма на промяна на функционалната активност на Бест-1 като йонен канал при тази патология ?

Основната част от получените резултати са обобщени в 3 научни публикации, две от които са в списани с ИФ като за една от публикациите са забелязани две цитирания в научната литература. Общият ИФ на публикуваните научни статии е 4.8. Материалите по дисертацията са докладвани на няколко международни научни форума.

Авторефератът включва основните резултати от проведените изследвания и напълно отговаря на структурата на дисертацията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение искам да кажа, че са получени оригинални и със съществена научна стойност резултати за структурата и механизма на взаимодействие на белтъка Бест-1 в мембрания бислой. Създадена е устойчива трансфектирана клетъчна линия, която експресира този белтък и методика за пречистването му, което е позволило да се определи вторичната структура на нативния белтък и промените свързани с взаимодействието му с важни биологично активни съединения и йони със съществено значение за правилното му функциониране в клетките. Използваните многобройни съвременни методи са индикация за отличната експериментална подготовка на докторантката и я характеризират като изграден и компетентен млад учен. Поради всичко казано до тук предлагам на членовете на уважаемото научното жури да присъди на ас. Кирилка Стефанова Младенова научната и образователна степен „доктор” по специалност Биологически науки шифър 4.3 (Молекулярна биология).

02.02.2017 г.

Проф. Диана Петкова