

СТАНОВИЩЕ

от проф. дбн Стефка Германова Танева
Институт по биофизика и биомедицинско инженерство - БАН, София

Относно Дисертационен труд
на тема: „Изследване на взаимодействието на белтъка бестрофин-1 с моделни
мембранни структури и поведението му в еукариотни клетки”,
представен от **Кирилка Стефанова Младенова**
за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ по професионално
направление 4.3 Биологични науки (научна специалност Молекулярна биология)
**с научни ръководители чл. кор. проф. дхн Здравко Лалчев и доц. д-р
Йордан Думанов**

Дисертационният труд, представен от Кирилка Младенова, е посветен на оптимизиране на метод за изолиране и пречистване на трансмембрания протеин човешки бестрофин-1 от стабилно трансфектирана клетъчна линия MDCKII-hBest1 и създаването на нова трансфектирана клетъчна линия от ретинален пигментен епител RPE1-hBest1, която експресира гена за hBest1; на изучаване на структурата и функцията на hBest1, отговорен за различни макулни дегенерации, причинени от мутации в гена *BEST1*.

Изследвани са повърхностните физикохимични характеристики, морфологията и топологията на Лангмюирови монослоеви и Лангмюир-Блоджетови филми от hBest1 и смесени монослоеви hBest1/палмитолеил фосфатидилхолин (hBest1/POPC). Характеризиран е и ефектът на Ca^{2+} , Glu и GABA върху тези характеристики, тъй като протеина функционира като транспортер на сигнални молекули в централната нервна система.

Приложени са комплекс от експериментални подходи – инфрачервена спектроскопия с Фурие-трансформация (FTIR) за определяне на вторичната структура на протеина, метод на Лангмюир, Брюстър-ъглова микроскопия за формирането на монослоевите и измерване на повърхностното напрежение, и определяне на морфологията им, атомно силова микроскопия (AFM) за определяне топологията на Лангмюир-Блоджетовите филми от hBest1 и hBest1/POPC, както и набор от биохимични методи за трансфекция, изолиране и пречистване на протеина (афинитетна хроматография и молекулно-ситова

хроматография), Western blot за имунодетекция, имунофлуоресценция за установяване на степента на трансфекция).

Установено е, че вторичната структура на hBest1 съдържа 51.1% спирални участъци от които 23.9% са α - и къси спирали, а 27.2% са 3_{10} -спирали, 32.2% β -структура (β -извивки и бримки), 14.7% агрегирани β -листове и 2% антипаралелни β -листове. Съдържанието на спирални участъци нараства до 59.2%, докато на β -структура намалява при добавяне на Ca^{2+} .

Чрез изследване на морфологията на филмите с помощта на БАМ е установено, че hBest1 и hBest1/GABA формират хомогенни филми, докато hBest1/ Ca^{2+} и hBest1/Glu – хетерогенни филми.

Морфологията на смесени hBest1/POPC Лангмюирови филми в присъствие на Ca^{2+} , Glu и GABA показва съществуването на флуидна фаза и липидни домени с по-висока плътност с брой и големина (най-ярко изразени в присъствие на Ca^{2+}) различаващи се от тези на монослоеве от палмитолеоил фосфатидилхолин.

Демонстриран е процес на Ca^{2+} -индуцирана димеризация на hBest1 протеина, каквото е наблюдавано за хомолози на hBest1 и за други белтъци, и което вероятно има значение за функцията на протеина като трансмембранен канал. Не се наблюдава промяна в състоянието на олигомеризация на протеина в присъствие на Glu и GABA.

Показано е, че експресията влияе върху ретиналните пигментни клетки и новополучената клетъчна линия RPE1-hBest1 има променени морфологични характеристики, трансепителна резистентност и по-ниска метаболитна активност.

Разработеният метод за получаване на пречистен hBest1 от стабилно трансфектирана клетъчна линия MDCKII-hBest1 и създадената нова стабилно трансфектирана клетъчна линия от ретинален пигментен епител RPE1-hBest1, която експресира гена за човешки бестрофин-1, дават възможност за физико-химично и биофизично характеризирание на изолирания протеин и установяването на вторичната му структура – научни приноси, които безспорно допринасят за разширяването на познанията за този трансмембранен протеин.

В работата са допуснати технически грешки, които няма да посоча. Освен това се коментира наличието на ивица при 1463 cm^{-1} („ножично“ деформационно трептене на -CH_2 -групите (bending mode)) за чист бестрофин и при 1431 cm^{-1} в присъствието на Ca^{2+} (стр. 55); тази ивица е извън областта от 1500 cm^{-1} до 1800 cm^{-1} за която е показан инфрачервеният спектър (Фигура 18, стр. 55); не става ясно каква е връзката на тази ивица с определената структура.

Дисертационният труд е представен на 105 страници (32 страници Литературен обзор, 12 – Материали и методи и 39 – Резултати и дискусия) и е илюстриран с 41 фигури, от които 9 са включени в Литературния обзор, 5 в Материали и методи, и 51 в Резултати и дискусия; 2 Таблици и 2 приложения. Цитирани са 209 източника.

Резултатите са публикувани в 2 публикации в списания с импакт фактор (общ импакт фактор 4.9) и 1 в списание без импакт фактор. Част от резултатите са представени на 3 научни форума (1 в чужбина и 2 в България). Забелязани са 2 цитирания на една от публикациите.

Заключение Считам, че научните резултати и наукометричните показатели отговарят напълно на изискванията на Закона за развитие на академичния състав, и на Правилника за приложението му в СУ „Св. Климент Охридски“ за придобиване на научната и образователна степен „Доктор“. Въз основа на гореизложеното препоръчвам на членовете на научното жури да присъдят образователната и научна степен „Доктор“ на Кирилка Стефанова Младенова.

01.02.2017 г.

Подпис:

/проф. дбн Стефка Германова Танева/