

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд

на тема „Взаимодействие на hBest1 с мембранни липиди и асоциирането му с детергент резистентни домени от еукариотни клетки“ от Никола Йорданов Младенов за придобиване на научната и образователна степен "Доктор" в научно направление 4.3. Биологически науки (Молекулярна биология – Клетъчна поляризация и мембрани).

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

Рецензент: чл. кор. проф. дбн Румен Панков, катедра Цитология, хистология и ембриология при Биологически факултет на СУ "Св. Климент Охридски", назначен за член на Научното жури със заповед на Ректора на СУ „св. Климент Охридски“ № РД38-471/30.09.2020 год.

Представената от кандидата документация напълно отговаря на изискванията, посочени в Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

Декларирам, че нямам конфликт на интереси, включително съавторство в публикациите на кандидата.

Кратки биографични данни за кандидата

Никола Младенов е роден през 1987 година. Завършва висшето си образование в Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“ като получава бакалавърска степен през 2010 год. със специалност Молекулярна биология и магистърска степен през 2013 год., магистратура по Клетъчна биология и патология. Започва професионалната си кариера като ембриолог в СБАЛАГ „Майчин дом“, Клиника по репродуктивна медицина през 2014 год., където работи до 2017 година. От началото на 2017 год. е зачислен на редовна докторантура към катедра Биохимия при Биологически факултет на СУ. След назначаването му за асистент в катедра Биология към Медицински факултет на МУ-София през същата година, преминава в задочна форма на обучение. През 2019. год. придобива специалността „Медицинска биология“ към Медицински Университет-София.

Актуалност на дисертационната тема

Основен обект на проведеното проучване е човешкият трансмембранен белтък бестрофин 1 (hBest1), експресиран от клетките на ретиналния пигментен епител, където участва в калциево-зависимият пренос на хлорни йони. В допълнение, има публикувани данни и за функционирането му като канал в централната нервна система, където транспортира γ -аминобутират (GABA) в глиалните клетки и глутамат (Glu) в астроцитите и невроните. Интересът към този

белтък се поддържа от участието му в група наследствени дегенеративни заболявания на зрението, известни под общото название бестрофинопатии. До момента са описани над 200 различни мутации в *hBest1*, участващи в бестрофиновите патологии. Въпреки сравнително ниската си честота, тази група заболявания имат социално значими измерения, тъй като предизвикват прогресивна загуба на зрението при човека, което е свързано със силно понижаване качеството на живот на засегнатите индивиди.

Изясняването на молекулните механизми, довеждащи до проява на бестрофинопатиите изисква добро познаване на нормалното функциониране на бестрофина. Както при всеки трансмембранен белтък, това в голяма степен се определя от взаимодействието с липидното му обкръжение – проблематика, която все още е непълно разработена. Проведеното изследване дава отговори на част от тези въпроси, като представя данни за междумолекулните взаимодействия между *hBest1*, сфингомиелина и холестерола, както и за асоциацията на *hBest1* с различни домени от клетъчната мембрана.

Всичко, споменато по-горе, ми дава основание да определя разработвания в дисертацията научен проблем като актуален както от фундаментална, така и от практическа гледна точка.

Обща характеристика на дисертационния труд и автореферата

Представената работа е организирана по възприетата схема, като е спазен добър баланс между отделните части. Трудът е написан на 116 стр., като е структуриран както следва: Съдържание - 2 стр, Увод - 2 стр., Литературен обзор – 37 стр., Цел и задачи - 1 стр., Материали и методи - 9 стр., Резултати и дискусия - 43 стр., Обобщение -2 стр., Изводи и приноси - 2 стр., Публикации и участия в научни форуми – 1 стр., Приложения – 3 стр. и Библиография - 14 стр. Онагледена е с 3 таблици и 37 фигури, включващи графики, комплексни имунофлуоресцентни изображения и схеми. Литературната справка включва 278 добре подбрани източника, публикувани в реномирани медицински и биологични издания. Като недостатък към структурата на дисертацията мога да посоча липсата на списък с използваните съкращения. Всички съкращения са обяснени в текста, но добавянето на отделен списък би улеснило четенето.

Дисертационният труд е написан на добър български език, без обичайно допусканията правописни грешки. Използвана е професионална терминология, но текстът не е натоварен с чуждици, чете се леко и оставя много добри впечатления за подготовката на докторанта.

Авторефератът правилно отразява материалът, представен в дисертационния труд. На 71 страници са представени основните моменти от разработката, като са включени всички получени резултати. Този значителен обем би могъл да бъде оптимизиран ако резултатите бяха представени в по-обобщен вид.

Познаване на проблема

Литературният обзор обхваща шест раздела, последователно въвеждащи в структурата на биологичните мембрани, биологичната роля на липидните рафтове и мембранните белтъци с акцент върху бестрофина. Обемната информация от

наличната литература е много добре фокусирана върху проблематиката на изследването, като умело е избегната честата грешка да се представят и интересни научни данни, които обаче не са свързани с тематиката на проучването. Добро впечатление прави и включването на двете последни глави в обзора, дискутиращи използваните в дисертацията подходи за изследване на моделни мембранни системи (Лангмюрови монослоеви и ВМ) и биологични мембрани (детергентни обработки и използване на специфични мембранни сонди). Тази информация е добра основа за по-пълното разбиране на проведените експерименти, особено за читателите, които не са специалисти в областта на изследването.

Общо, в обзора личи аналитичност и отлично познаване на проблема и на цитираната литература. Очевидно в хода на разработване на дисертационния си труд докторантът е навлязъл дълбоко в проучваната проблематика и е обогатил и надградил биологичното си познание.

Цел и задачи на дисертационния труд

Проучванията, предприети в дисертационния труд са насочени към изследване на молекулните взаимодействия между hBest1, сфингомиелин и холестерол, както и асоциацията на hBest1 с домените на клетъчната мембрана, оказващи влияние върху биологичните му функции. Тази ясно формулирана цел добре очертава периметъра на планираните изследвания и напълно корелира със заглавието на дисертационния труд. За постигане на целта са определени 7 конкретни научни задачи, които формират последователен научно-експериментален подход, включващ физикохимични, биохимични, биофизични и клетъчнобиологични задачи.

Използвани методи

Разделът материали и методи е представен на девет страници и включва широк набор от съвременни и класически методи, използвани в молекулярната и клетъчната биология. Те включват широко прилаганите клетъчно култивиране, имунофлуоресценция, имуноблотинг, молекулно-ситова и афинитетна хроматографии, както и по-специфичните изследвания провеждани с помощта на Лангмюирови монослоеви, Брюстер-ъглова микроскопия, изолиране на детергент-резистентни мембранни домени и др. Методите са описани добросъвестно и достатъчно подробно за да осигурят възпроизвеждане, без необходимостта от допълнителна информация. Добро допълнение към този раздел са и включените в дисертацията „Приложения“, които, представят състава на използваните буферни разтвори и резултатите от някои важни контролни експерименти. Избраните методи са напълно адекватни на поставените задачи и са изпълнени професионално.

Резултати и дискусия

Резултатите са представени последователно, логично следвайки поставените задачи. Онагледени са с 28 фигури и 3 таблици, които са информативни и убедително илюстрират установените факти. Проведените

експерименти и получените резултати могат условно да бъдат поделени в две големи групи.

Първата група представлява разширяване на изследванията, провеждани в групата на доц. Думанов, които проучват повърхностните физикохимични характеристики и морфология на Лангмюирови монослоеви и Лангмюир-Блоджетови филми от пречистен hBest1 в комбинация с различни липидни молекули и под въздействието на различни агенти. За конкретните изследвания е подбрана физиологично значимата температура от $35\pm 2^\circ\text{C}$, като са проучени ефектите на агенти, участващи в нормалното функциониране на hBest1 - калций, глутамат (Glu) и гама-аминобутират (GABA). Чрез снемане на п/А изотермите, хистерезисните криви и кривите на модула на свиваемост е показано, че взаимодействията на hBest1 с Ca^{2+} , Glu или GABA променят конформацията на белтъка и по този начин изместват съотношението хидрофобни/хидрофилни участъци в полза на хидрофилните. Като резултат е отчетено повишаване на сходството на молекулите на белтъка към подложката и навлизането им във водната фаза. За приближаване на използваната моделна система към биологичните мембрани, същите методични подходи са използвани за изследване на чисти сфингомиелинови (SM) и смесени hBest1/SM Лангмюирови монослоеви. От множеството натрупани конкретни данни, коректно е направен изводът, че при използваната физиологична температура, hBest1 повишава подредеността на смесените монослоеви от hBest1 и сфингомиелин. Чрез използването на същите Лангмюирови филми е показано още, че смесваемостта между hBest1 и сфингомиелина е термодинамично изгоден процес, което е предпоставка за силни белтък-липидни взаимодействия и в биологичните мембрани. Прилагайки микроскопия под ъгъл на Брюстер (BAM) е изследвано латералното фазово разделяне и образуването на домени в бинарните hBest1/SM Лангмюирови монослоеви в реално време, като е демонстрирано, че смесването и междомолекулните взаимодействия се увеличават с нарастване на повърхностното налягане.

Интересни са и резултатите, описващи за първи път кондензиращ ефект на холестерола върху монослоеви от hBest1, hBest1/POPC, както и hBest1/SM. Показано е, че холестеролът не оказва кондензиращ ефект върху монослоеви от hBest1 и SM, но добавянето на Ca^{2+} предизвиква такъв ефект, като той, в случаите с hBest1, най-вероятно е резултат от димеризацията на белтъка, след свързването му с калция. Холестеролът обаче, предизвиква кондензация на смесени монослоеви hBest1/POPC и hBest1/SM, но в тези случаи добавянето на Ca^{2+} не оказва влияние.

Втората и по-значима според мен от клетъчнобиологична гледна точка група резултати, включва проучванията върху асоциацията на hBest1 с мембранни домени в живи клетки. Чрез използване на стабилно трансфектирани MDCKII-hBest1 клетки и витално оцветяване с Лаурдан (сонда, променяща спектъра си на излъчване в зависимост от нивото на хидратиране на двойния липиден слой) за пръв път е показано, че наличието на hBest1 предизвиква увеличаване на течно-неподредените домени в клетъчната мембрана. Чрез същата моделна система е установено, че hBest1 предпочитателно се асоциира с течно-неподредените домени (65%) и е представен в значително по-малки

количества в течно-подредените (35%) мембранни домени. Тези резултати са потвърдени и при използване на друг подход – обработка на мембраните с детергенти за изолиране на детергентно неразтворими (DRM) и детергентно разтворими (DSM) мембранни фракции. В тези експерименти, установеното количество на hBest1 в DSM е 70% и 30% в DRM.

Общо, получените резултати са представени професионално, описанието е ясно, а представените фигури не оставят съмнение в коректността на проведените експерименти. Обсъждането на установените факти от физикохимичните експерименти намирам за недостатъчно, но то е компенсирано от обстойната и задълбочена дискусия на всички резултати, представена в края на раздела, която дори е илюстрирана с обща схема.

Изводи и приноси

От проведените изследвания са формулирани 7 извода и 3 приноса. Напълно приемам изводите, защото съответстват на поставената цел и отразяват коректно дизайна и резултатите от разработката. Нямам забележки и към формулираните научни приноси, които са безспорни и почиват на реални, собствени резултати.

Публикации във връзка с дисертационния труд

Никола Младенов е представил две публикации (в една от които е водещ автор) свързани с дисертационния си труд и три участия в научни форуми. Статиите му са отпечатани в престижното списание *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, като постигнатият общ импакт фактор е 7.95. Тези наукометрични резултати надхвърлят изискванията, посочени в Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ и допълнителните критерии на Биологически факултет.

Заключение:

Дисертационният труд на Никола Младенов съдържа научни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на ЗРАСБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ. Той представлява задълбочена научна разработка, реализирана с широк набор от методи на съвременната биологична наука, които са позволили получаването на нова информация на най-съвременно научно ниво. Представеният труд показва, че докторантът притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения в областта на молекулярната биология, като показва качества за самостоятелно провеждане на научно изследване. Всичко това ми дава основание убедено да дам своята положителна оценка и да предложа на научното жури, назначено със заповед РД38-471/30.09.2020 на Ректора на СУ, да присъди образователната и научна степен „доктор“ на Никола Йорданов Младенов в научно направление 4.3. Биологически науки (Молекулярна биология – Клетъчна поляризация и мембрани).

София, 26/10/2020г.

Рецензент

чл. кор. проф. дбн Румен Панков