

## СТАНОВИЩЕ

от проф. Елена Стефанова, дбн

Относно: дисертационен труд на тема "Взаимодействие на hBest I с мембранни липиди и асоциирането му с детергент резистентни домени от еукариотни клетки", за присъждане на научната и образователна степен „Доктор” на Никола Йорданов Младенов

Дисертационният труд на Никола Младенов е насочен и обхваща едно перспективно и надеждно изследване от клетъчно-биологична, биофизична и биохимична гледна точка, и по-конкретно е фокусирано върху изследване на междумолекулните взаимодействия на hBest1, с мембранни липиди и домени, които имат важен ефект върху функционирането на белтъка. С основание може да се каже, че това е едно съвременно и комплексно изследване на мембранни липидни домени, които образуват т.н. липидни рафтове, определящи функцията на редица важни трансмембранни белтъци по клетъчната мембрана като Бестрофин-1. Независимо, че засега е известно, че hBest1 участва в калциево-зависим пренос на хлорни йони, и предположението че белтъкът може да е ангажиран и в транспорта на GABA ( $\gamma$ -аминобутират) в глиални клетки и Glu (глутамат в астроцити), мутациите в гена BEST1 са свързани с една група заболявания на ретината при човек, известни като Бестрофинопатии, което определя и значимостта на изследването от медицинска и съответно терапевтична гледна точка..

Целта и задачите са формулирани конкретно и ясно - да се изследват молекулните взаимодействия между сфингомиелин и холестерол като основни липидни домени, определящи течно-подредената фаза, както и асоциирането на hBest1 с домените на клетъчната мембрана.

В литературният обзор е представена много компетентно и подробно необходимата информация за структурата и функцията, липидната асиметрия и хетерогенност, както и ролята на холестерола и сфингомиелина в биологичните мембрани. По-специално е разгледано участието на липидните рафтове в белтъчното сортиране, в сигналната трансдукция, взаимодействието патоген-клетка и в раковите заболявания. Представени са експресията и локализацията на hBest1, както и структурните и функционални характеристики на белтъка, като особено внимание е отделено и на Бестрофинопатиите. Използван е широк набор от експериментални клетъчно-биологични, молекулярни, биофизични и физико-химични методи, а за изолиране на hBest1 и на детергент-

резистентни и детергент-разтворими домени, са използване MDCK и MDCK-hBest1 трансфектирани клетки.

За изясняване на структурните и функционални взаимоотношения на посочените молекулни участници са планирани и изпълнени акуратно седем задачи и е направен задълбочен анализ на резултатите, които са илюстрирани с 27 фигури и три таблици и които имат определен приносен характер. Анализирани са и е показана ролята на hBest1 за повишаване на подредеността на смесените монослоеве hBest1- сфингомиелин при 35° C, така както и тяхната смесиваемост при тази температура. Важен принос в дисертационния труд са резултатите получени от кондензиращият ефект на холестерола върху монослоеве от hBest1 и POPC и от hBest1 и сфингомиелин, и е установено, че след добавянето на Ca<sup>2+</sup>, този ефект не се наблюдава. Съвсем основателно се допуска, че възможна причина за този ефект е интеркалирането на холестерола между въглеродните опашки на POPC, в случай на кондензиращ ефект върху монослоеве от POPC, а липсата на ефект при добавяне на Ca<sup>2+</sup> йони да се дължи на промяна във взаимодействията между холестерола, POPC и hBest1. Докато холестеролът не оказва същият ефект върху монослоеве от hBest1, когато отсъстват Ca<sup>2+</sup>, което предполага, че добавянето на холестерол не води до конформационни промени в молекулата на белтъка. Чрез имунофлуоресцентен анализ и оцветяване с Лаурдан е доказано убедително, че при трансфектираните MDCKII-hBest1 клетки се наблюдава увеличаване на течно-неподредените мембранни домени, в сравнение с нетрансфектираните, което означава, че hBest1 се локализира предимно в неподредените мембранни области, което е доказано от колокализацията на Лаурдан и hBest1 в течно-подредената (35%) и в течно-неподредената (65%) фаза на мембраните. Нещо повече, тези резултати са потвърдени и от прецизните физикохимични изследвания на hBest1/SM филми в които е показано, че hBest1 има „втечняващ ефект” на монослоя. Представени са оригинални резултати демонстриращи разпределението на hBest1 в DRM и DSM в MDCK-II- hBest1 клетки, което съответно е 30% и 70% и има значение за правилното функциониране и регулиране на белтъка, което разпределение предполага че белтъкът може да се среща в повече от една конформация. Всички данни от така получените резултати дискутирани в детайли от докторанта показват, че различното физиологично разпределение на белтъка и липидното обкръжение в плазмената мембрана в различни типове клетки е изключително важно за ефективната промяна на неговите

функции и за регулиране на неговата физиологична активност.. Направените изводи са логични и напълно обуславят получените резултати и мотивират представените 3 приноса на дисертационния труд.

В заключение: считам, че дисертацията на Никола Младенов е оригинално съвременно изследване, в една много перспективна област, свързана с биомолекулните взаимодействия в мембранологията. Докторантът е приложил оригинални подходи, чрез които доказва значимостта на връзката на хетерогенните липидни домени с hBest1. Независимо, че все още не е напълно изяснено разпределението на липидите и белтъците в биологичните мембрани, несъмнено те определят и различните функционални особености в различните им участъци, възможните конформационни промени и активността на белтъчните молекули, зависими от липидното обкръжение. В това отношение резултатите имат възможност за приложение и в медицинската практика, доколкото е известно, че мутациите в BEST1 гена са свързани с т.н. Бестрофинопатии, с широк набор от клинични прояви, които в крайна сметка водят до загуба на зрение, без да е налична съвременна терапия за лечението на тези заболявания.

Като имам предвид изложените по-горе мотиви и публикациите свързани с дисертацията, които напълно отговарят на изискванията, убедено ще гласувам за присъждането на Никола Йорданов Младенов на научната и образователна степен „Доктор”

27.X.2020 год.

Проф. Е. Стефанова: