

СТАНОВИЩЕ

Върху дисертация на
Никола Йорданов Младенов
За присъждане на образователната и научна степен “доктор “ в
професионално направление 4.3 Биологични науки (Молекулярна биология –
Клетъчна поляризация и мембрани)

на тема: **Взаимодействие на hBest1 с мембранни липиди и асоциирането му с
детергент резистентни домени от еукариотни клетки**

с научни ръководители: доц. д-р Йордан Думанов и доц. д-р Тоня Андреева

проф. Диана Христова Петкова, д.б.н
Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, БАН

Дисертационният труд е посветен на изясняването на взаимодействието на белтъка hBest1 с едни от компонентите на клетъчната мембрана - фосфолипиди и холестерол, както и локализацията му в домени на клетъчната мембрана. За тези взаимодействия няма информация до сега в литературата. Известно е, че за правилното функциониране на белтъчните молекули има голямо значение взаимодействието им с мембранните липиди, което определя тяхната активна конформация.

Целта на настоящата дисертация е да се изясни връзката структура-функция при hBest1 като се проследят молекулните взаимодействия между белтъка и два мембранни липида - холестерол и сфингомиелин, както и асоциацията му с домени на клетъчната мембрана, оказващи влияние върху биологичната му функция. Целта е ясно формулирана и предложените задачи са правилно подбрани за достигане на поставената цел.

Използваните биохимични и биофизични методи са удачно избрани с оглед решаване на основните поставени задачи. Тъй като hBest1 е трансмембранен белтък и една от основните му функции е да осъществява калциево-зависим трансмембранен пренос на йони и молекули, авторът е използвал в своето изследване йоните и съединенията, които имат отношение към неговата функция в мембраната а именно Ca^{2+} , глутамат и γ -аминобутират.

За да се изследва влиянието на Ca^{2+} , глутамат и γ -аминобутират върху конформационните промени на белтъка са използвани Лагмюирови монослоеове, на които са определени изотерми, хистерезисни криви и модул на свиваемост. Този метод е много правилно подбран, защото споменатите характеристики са индикация за самоорганизацията на белтъчните молекули и междумолекулните взаимодействия между белтъка и използваните съединения. Различната стойност на π/A изотермите, хистерезисните криви и кривите на модула на свиваемост на монослоеове показват различно поведение на белтъка при различните условия поради промени в конформацията и организацията на белтъчната молекула. Така е

доказано, че тези компоненти променят конформацията и организацията на белтъка в зависимост от температурата на експеримента.

Известно е, че мембранните домени изградени от холестерол и сфингомиелин са едни от най-важните компоненти на мембраната, които оказват много голямо влияние върху активността на мембранните белтъци поради факта, че това взаимодействие води до определени промени в конформацията на белтъците. За да се определи какво е влиянието на мембранныя сфингомиелин и холестерол върху функционирането на hBest1 са проведени експерименти със смесени монослоеове от белтъка със сфингомиелин и холестерол. Чистите SM монослоеове при наличие на Ca^{2+} , глутамат и γ -аминобутират претърпяват преход от течно-неподредена към течно-подредена фаза. В присъствие на Ca^{2+} фазовият преход е при сравнително високо налягане, докато при Glu и GABA монослоевите претърпяват колапс при по-ниско повърхностно налягане. Поведението на смесени монослоеове от hBest1/ SM е идентично като това на чистите монослоеове от SM. При свиване на монослоя се наблюдават необратими конформационни промени и изтласкване на белтъчните молекули във водната фаза. Това е индикация, че промените настъпващи в поведението на монослоя зависят от взаимодействие между полярните глави на липида и добавените компоненти.

За да се провери какво е влиянието на вида фосфолипид върху взаимодействието на белтъка с Ca^{2+} , Glu и GABA са проведени експерименти с монослоеове от hBest1/POPC. Поведението на тези монослоеове показва съществени различия от тези в присъствие на SM. Това говори за различни физикохимични свойства на монослоевите и разлика при взаимодействията белтък/липид, което води до различна молекулна организация. При добавяне на Ca^{2+} , Glu и GABA не са наблюдавани значителни промени в хистерезисните криви, което е индикация, че POPC елиминира ефекта на веществата.

При изследване на междумолекулните взаимодействия между hBest1 и hBest1 или SM-SM е доказано, че взаимодействията са по-силни между белтъка и SM. При наличие на Ca^{2+} междумолекулните взаимодействия между белтъка и SM са равни на тези белтък/белтък и липид/липид. При наличие на Glu при ниско повърхностно налягане взаимодействието между hBest1 и SM е по-силно от това при чистите монослоеове, докато при високо повърхностното налягане се увеличават силите на отблъскване между hBest1 и SM, което води до разделяне на белтъка и SM.

За да се определи стабилността на различните системи е пресметната тоталната свободна енергия на Гибс на смесване. Чрез пресмятане на тази величина е доказано, че тя не се повлиява от Ca^{2+} , Glu и GABA. Може да се предположи от отрицателните стойности на тази величина, че двукомпонентната система белтък/SM е по-стабилна от едноконпонентните монослоеове от белтък или сфингомиелин. Доказано е, че еквилярното смесване е най-термодинамично стабилно и, че смесваемостта между hBest1 и SM най-вероятно е свързана с взаимодействието на amidните и хидроксилни групи на SM, които играят ролята на донори и акцептори за водородните връзки, докато PC играе роля само на акцептор в белтък-липидните взаимодействия. Смесваемостта на hBest1 и SM в монослоя е предпоставка за силни белтък-липидни взаимодействия. Различното повърхностно поведение на hBest1/ SM монослоеове при различни моларни съотношения и при добавяне на различни компоненти показва възможност за промяна в конформацията,

динамиката, стабилността и организацията на белтъка в клетъчната мембрана. Това е доказателство, че мембранната хетерогенност е начин за регулация на активността и функцията на hBest1.

За да се определи морфологията на различните монослоеове са проведени наблюдения с Брюстер-ъглова микроскопия. Чистите монослоеове от hBest1 са хомогенни, докато при наличие на Ca^{2+} и Glu стават хетерогенни и се наблюдават струпвания от белтъчни молекули. При наблюдения на сфингомиелинови монослоеове при ниско налягане те показват хомогенна структура, като Ca^{2+} , Glu и GABA не променят съществено морфологията. При повишаване на налягането се наблюдава по-кондензирана фаза, което вероятно се дължи на взаимодействие на съединенията с липида, което води до дехидратация и по-здрави водородни връзки.

Изследван е и ефекта на Ca^{2+} , Glu и GABA върху морфологията на смесени hBest1/SM Лангмюирови монослоеове. Бинарните монослоеове показват хомогенност и липса на формиране на домени при ниски и високи налягания. GABA не променя морфологията докато Ca^{2+} предизвиква частично фазово разделяне. При по-високо налягане домените изчезват. При наличие на Glu се наблюдава частично фазово разделяне, но размера на домените и техния брой са много по-малки в сравнение с тези в присъствие на Ca^{2+} . Това е отново доказателство, че междумолекулните взаимодействия и смесваемостта в бинарните монослоеове се увеличава при нарастване на повърхностното налягане. Доказано е чрез морфологични изследвания, че домените са основно съставени от липидни молекули и, че при повишаване на налягане съществуват по-силни протеин-протеинови или липид-липидни взаимодействия в сравнение с липид-белтъчните взаимодействия.

Тъй като при формиране на мембранните домени голяма роля играе мембранныя холестерол са проучени взаимодействията на Ca^{2+} , Glu и GABA с монослоеове от различен състав с холестерол. Установен е кондензиращия ефект на холестерола при монослоеове от POPC, такъв ефект не се наблюдава при монослоеове от SM, поради голямото физикохимично сродство между холестерола и SM. Кондензация на чисти монослоеове от белтъка също не се наблюдава, поради факта, че холестерола не променя конформацията на белтъка. При наличие на смесени монослоеове от белтък и фосфолипид е наблюдаван кондензиращ ефект на холестерола поради взаимодействие на холестерола с белтъка и това от своя страна променя взаимодействието между SM и белтъка. При наличие на Ca^{2+} се наблюдават различия при въздействието на холестерола поради взаимодействието на йона със сфингомиелина или белтъка.

За да се определи локализацията на hBest1 в мембранните домени е използвана флуоресцентната сонда Лаурдан. Установено е, че белтъка се локализира предимно в течно-неподредената фаза, което е в унисон със флуидизиращия ефект на белтъка при включване в монослоеове от SM. За да се докаже това твърдение са изолирани DRM и DSM от трансфектирани и нетрансфектирани клетки и е доказано, че белтъка се локализира основно в DSM, тъй като така белтъка заема в това обкръжение конформация, която позволява проявата на неговата оптимална активност.

Бих искала да отбележа, че представените резултати следват своето логично развитие и са индикация за един добре планиран експеримент.

Резултатите са обобщени в 7 основни изводи и 3 приноса, които са много ясно и точно формулирани. Получените данни са оформени в две публикации в Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, IF 3.973. Материалите по дисертацията са представени на три научни форума у нас. Забелязани са 2 цитирания на публикуваните статии в международната база данни.

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

В заключение бих искала да изразя становището си, че са получени нови оригинални резултати за локализацията на белтъка hBest1 в домените на мембранния бислой чрез удачни експериментални методи. Представената дисертация по актуалност на тематиката, научно ниво и обем на проведените изследвания напълно отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България . Поради всичко казано до тук убедено препоръчвам на членовете на уважаемото научно жури да присъди на Никола Йорданов Младенов научната и образователна степен „доктор“ по професионално направление 4.3 Биологически науки (Молекулярна биология-Клетъчна поляризация и мембрани).

проф. д.б.н. Диана Петкова