

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Светла Петрова, Катедра „Биохимия“, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“

ОТНОСНО: придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в научна област 4.3. Биологически науки (Молекулярна биология – Клетъчна поляризация и сигнализация) с дисертационен труд на тема: *„Характеристика и роля на hBest1 и негови мутантни форми в еукариотни клетки и моделни мембранни структури“* представен от Павел Веселинов Видев, задочен докторант в Катедра „Биохимия“ на Биологическия Факултет, СУ „Св. Климент Охридски“ с научни ръководители: проф. д-р Йордан Думанов и проф. д-р Светла Петрова

Кратки биографични данни за кандидата

Павел Видев е възпитаник на Биологическия факултет при СУ, завършва с отличие спец. Молекулярна биология през 2015 г., а през 2017 г. завършва отлично и образованието си в МП „Алгология и Микология“ в БФ. След успешно явяване на конкурсен изпит, става асистент в Катедрата по Биохимия и същата година се явява на докторантски изпит по Молекулярна биология. От 2018 г. е задочен докторант по направление 4.3. Биологически науки - Молекулярна биология- (Клетъчна поляризация и сигнализация) към Катедра „Биохимия“ на БФ. Павел Видев е най-младият асистент на Катедрата по Биохимия, който изключително бързо, много отговорно и активно се включи в натоварената учебно-преподавателска програма на Катедрата, поемайки основно практическите упражнения по дисциплините „Биохимия“, „Разделяне и анализ на биопродукти“ и „Биологични мембрани“.

Оценка на качествата на дисертационния труд

Актуалност и значимост на разработвания в дисертационния труд проблем

Темата на дисертационния труд: *„Характеристика и роля на hBest1 и негови мутантни форми в еукариотни клетки и моделни мембранни структури“* е посветена на изучаване взаимовръзката *структура-функция* на бестрофин-1 (hBest1) - Ca^{2+} - зависим йонен канал, който се експресира предимно в клетките на ретиналния пигментен епител (RPE), в неврони и глиални клетки от централна нервна система и регулира транспорта на Cl^- , HCO_3^- , невротрансмитерите γ -аминобутират (GABA) и глутамат (Glu) през клетъчната мембрана. Основната му биологична роля е асоциирана с поддържане на хомеостазата, предаването на различни сигнали в клетките и комплексно участие в молекулните и биохимични механизми на зрителното възприятие, които все още не са напълно изяснени. Темата е изключително актуална, защото различни мутации в гена *BEST1* (отговорен за синтезата на белтъка hBest1) са в основата на няколко тежки патологични състояния на макулата, известни като бестрофинопатии, а молекулните механизми на конформационна динамика и структурна организация на hBest1 в мембраните, междумолекулните взаимодействия с липиди и други белтъци, както и биологичните му функции не са изяснени. През последното десетилетие се доказва, че определени нарушения, във всички нива на структурата на трансмембрания канал hBest1, създават някои от предпоставките за развитието на невродегенеративни заболявания като болест на Алцхаймер и болест на Паркинсон, а това определено подчертава актуалността на дискутираните в дисертацията проблеми и представените научни изследвания с потенциал за биомедицински приложения в бъдеще. В Катедрата по Биохимия са защитени две други дисертации и няколко дипломни работи за hBest1, които полагат началото на това научно направление, така че представеният дисертационен труд на Павел Видев е не само продължение и задълбочаване на познанието за структурата и функциите на hBest1, но и откриване

на нови области за изследване на биологичните мембрани, динамичните взаимодействия на мембранните липиди с различни белтъци и ролята на тези взаимодействия за живота и интегритета на клетките.

Изследванията, описани в дисертацията са насочени основно към: 1) изследване и установяване на моделите на повърхностно поведение и междумолекулните взаимодействия на hBest1 (предоставящ различни повърхности и свързващи места), разположен в сложни липидни дву- и трикомпонентни Лангмюирови слоеве, включващи POPC, SM и холестерол (в различни молни съотношения) с участието на Ca^{2+} , Glu и GABA, при условия близки до физиологичните; 2) изследване на морфологията на тези мултикомпонентни моделни мембранни системи; 3) изследване на трансепителната резистентност на епителни MDCK II клетки, нетрансфектирани и експресиращи hBest1; 4) трансфекция и експресия на мутантни hBest1 форми в MDCK II клетки, за да се определи влиянието на тази експресия върху развитието на клетките и ефективността на системата, необходими за изучаване на клетъчната сигнализация и причините за отключване на патологични състояния.

Основните части на дисертацията се подчиняват на общоприетите изисквания за дисертационен труд и включват: Литературен обзор – 42 стр.; Цели и задачи – 1 стр., Материали и методи – 9 стр., Резултати и Дискусия – 37 стр., и Изводи и приноси – 2 страници общо.

Литературният обзор е написан компактно и демонстрира задълбоченост в прегледа на теоретичните и методични познания по темата, като акцентът е фокусиран върху известните досега данни за структурата и функцията на бестрофините, комплексните взаимодействия между мембранните липиди и белтъци, динамиката на тези взаимодействия и ролята им за осъществяване на биологичните функции на клетките. Методите в дисертационния труд са специализирани за този тип изследвания, описани са достатъчно подробно и показват интегралността на изследванията, изискващи физикохимични, биохимични, молекулярнобиологични, клетъчнобиологични и функционални подходи. Павел Видев е прилагал арсенал от: основни хроматографски и спектрофотометрични методи за изолиране, пречистване и охарактеризиране на мембранни липиди и белтъци; физикохимични методи за определяне на динамиката и термодинамиката на междумолекулните взаимодействия; молекулярнобиологични (експресионни системи и трансфекция); клетъчно култивиране и методи за определяне на жизнеността и функциите на клетките чрез проследяване на трансепителната им резистентност, морфология и апоптотична сигнализация при влияние на различни фармакологични агенти.

Целта и задачите на дисертационния труд са кратко и ясно формулирани. Цитирани са 343 литературни източника специализирани по темата, като над 60% са след 2010 г. (включително и публикации от 2022 година).

Резултатите са предствени много стегнато, подкрепени са с прецизно изработени 24 фигури (от общо 50 в целия труд) като се следва общ последователен модел на описание за различните изследвани мултикомпонентни белтъчно-липидни системи: тензиометрични повърхностни изследвания (теоретичните принципи са описани в лит. обзор); морфологични (ВАМ) и термодинамични характеристики на моделните монослоеви; определяне на биологична функционалност на мембраните с включен hBest1 в присъствие на Ca^{2+} , Glu и GABA; и влияние на експресията на мутантни hBest1 форми върху жизнеността на епителни MDCK II клетки с цел оптимизиране на метод за създаване на трайни клетъчни линии, които ще се използват като моделни клетъчни системи. Получените резултати позволяват да се изведат няколко обединени важни изводи:

1. Установяване на ролята на холестерола за организацията, стабилността, морфологията и смесваемостта на hBest1 в сложни дву- и трикомпонентни липидни монослоеви, показваща ясно влиянието му върху взаимодействията hBest1-POPC и hBest1-SM, при което се нарушава подредеността на слоевете hBest1-SM и се променя морфологията им.
2. Експресията на hBest1 в мембраните на MDCKII клетки предизвиква увеличаване на относителния дял на неламеларните лизофосфолипиди, а това предполага по-висока степен на

флуидизиране на мембраната, което повлиява стабилността на клетъчните мембрани и чувствителността към секреторни PLA₂ (sPLA₂) ензими. Трансфектираните клетки са по-устойчиви на въздействието на sPLA₂ и по-бързо възстановяват трансепителната си резистентност.

3. Трансмембранните функции на hBest1, повлияни от Glu, GABA и ATP в трансфектираните с *HBEST1* MDCKII клетки, предизвикват по-бързо достигане и повишаване на стойността на TERmax (трансепителна резистентност) в сравнение с нетрансфектираните клетки (и двата типа клетки притежават самостоятелни мембранни канали за пренос на Glu и GABA (BGT1).
4. Изследваните мутантни форми на hBest1 (Y85H, Q96R, R25W и Y227N), експресирани в MDCKII клетки предизвикват патологични клетъчни състояния - токсичност, ранна и късна апоптоза веднага след трансфекция, които са свързани с нарушени етапи на сортиране на hBest1 и показват невъзможност MDCKII клетките да се използват като експресионна система.

Приносите на дисертационното изследване са свързани с факта, че за първи път се изследват и анализират сложните и динамични липид-hBest1 взаимодействия в мултикомпонентни мембранни системи като най-важните се концентрират върху:

1. За първи път е изследвано влиянието на Ca²⁺ върху повърхностните характеристики на тройни липидни монослоеви, съдържащи холестерол и hBest1.
2. Доказана е ролята на холестерола за подредеността, смесваемостта и динамиката на организация в липидни монослоеви с изключване и включване на hBest1
3. Анализирана и калкулирана е термодинамичната изгодност на смесваемост на hBest1 в липидните мултикомпонентни системи (ΔA и ΔG_{mix} на тройни монослоеви), доказваща биологичната вероятност на тези взаимодействия.
4. За първи път са изследвани промените в мембранный липиден състав на трансфектирани MDCKII клетки предизвикани от базолатералната експресия на hBest1.
5. Изследвана е динамиката на реорганизация (чрез ензимно и неензимно третиране) на клетъчните мембрани на трансфектирани и нетрансфектирани MDCKII клетки и се установява влиянието на експресирания в мембраните hBest1.

Автореферат

Авторефератът напълно отразява съдържанието на дисертационния труд в 73 страници, като основните резултати са представени изцяло чрез 24 фигури. Изводите и приносите са описани коректно. Включени са и публикациите по темата на дисертацията, участията в научни форуми, съкратен списък на цитирана литература, както и кратко приложение с описание на използваните реагенти.

Публикации

Основните резултати от дисертационния труд са представени от докторанта в 3 публикации, две от които са в научни списания с импакт фактор /и импакт ранг (Q2). За тях вече са забелязани и цитирания в научната литература.

Според изискванията на Закона за развитие на академичния състав и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ „Св. Климент Охридски”, публикациите отговарят на изискуемия минимум, като освен тях Павел Видев е приложил списък от 6 участия в научни форуми, чрез които е популяризировал получените изследователски резултати. Цялата дейност по дисертацията на Павел Видев - научноизследователска и експериментална, аналитична и интегрална по оформяне на резултатите и описване на научния труд, е негов самостоятелен труд, който заедно с отговорната и натоварена учебно-преподавателска дейност през изминалите 4 години, го представя като един изграден и активен млад учен и преподавател с отлични перспективи за бъдещо развитие.

Заклучение: Дисертационен труд на Павел Видев представя комплексно и задълбочено изследване на ролята на hBest1 и някои мутантни форми за структурата, организацията, динамиката и биологичната функционалност на мембраните на епителни MDCK II, избрани като моделна система за експресия на този трансмембранен канал. Използвани са различни съвременни физикохимични и биологични методи, които позволяват откриване на нова информация, която е анализирана и представена на високо научно ниво.

Като един от научните ръководители на докторанта не мога да не подчертая изключително отговорното отношение на Павел Видев, както към всички дейности по дисертацията, така и към учебната дейност в Катедрата по Биохимия. Неговата работоспособност, мотивация, дисциплина и организираност му позволиха да извърши успешно всички изследователски задачи и да завърши тази образователна степен в срок, а с придобития си методичен опит и познания в бъдеще би бил ценен за решение на всеки молекулярно-биологичен проблем.

Въз основа на гореизложеното, считам, че Дисертационният труд на Павел Видев напълно отговаря на изискванията на ЗРАС за присъждане на научната и образователна степен „доктор“ и давам своето *положително становище, научната и образователна степен „доктор“* в научно направление 4.3. Биологични науки, научна специалност Молекулярна биология – Клетъчна поляризация и сигнализация, да **бъде присъдена на асистент Павел Видев.**

20.01.2023 г.
София

Изготвил становището:

проф. д-р Светла Петрова