

РЕЦЕНЗИЯ

от **акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн,**

член на НЖ съгласно Заповед № РД 38-595/31.10.2023 г. на Ректора на СУ „Св. Кл. Охридски“, на дисертационния труд на проф. д-р Йордан Атанасов Думанов „*Самоорганизация и повърхностни свойства на hBest1 в модели на биологични мембрани*“, представен за присъждане на научната степен „Доктор на науките“ в Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“, Професионално направление 4.3. Биологически науки, Научна специалност: „Молекулярна биология“

1. Кратки биографични данни

Йордан Атанасов Думанов е роден на 05.09.1973 г. в гр. Банско, България. През 1994 г. е зачислен като редовен студент в БФ на СУ, който завършва през 1999 г. като магистър по специалността „Клетъчна биология и биология на развитието“ и втора специалност „Учител по биология“. До 2001 г. работи като изследовател по човешка генетика в Университета на Грайфсвалд, Германия и в Института по биохимия в Аахен, Германия, а от 2001 г. е редовен докторант в Университета „Хохенхайм“, Щутгарт, Германия. През 2006 г. придобива докторска степен по „Биохимия“ и същата година е избран за асистент към катедра „Биохимия“ на БФ при СУ. Тук последователно заема длъжностите старши асистент (2007-2011), главен асистент (2011-2014), доцент (2015 г.) и професор (2021 г.). По време на своето кариерно развитие д-р Думанов е бил на специализация в САВІМЕР, Севиля, Испания и Института по зрението към Университета „Мария Кюри“, Париж, Франция. Член е на СУБ, секция „Биохимия, биофизика и молекулярна биология“. Понастоящем проф. Думанов чете лекции на студенти от различни специалности на БФ по учебните дисциплини Биохимия, Биологични мембрани, Белтъчно сортиране и клетъчна поляризация. Бил е научен ръководител на 4 докторанта, от които 3 защитили и на 9 дипломанта. Автор е на 64 научни статии, от които 44 в списания с ИФ (общ ИФ 157,06). Трудовете му са цитирани досега 183 пъти. Участвал е в разработването на 20 научни проекта финансирани от МОН и СУ, на 7 от които е бил ръководител.

2. Общ преглед на документацията свързана с дисертационния труд

Прегледът на документите свързани със защитата на дисертационния труд, както и самия труд са изготвени съгласно изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото приложение. Дисертацията е обсъдена и насочена за защита на разширено заседание на Катедрен съвет на Катедра „Биохимия“ при БФ на СУ „Св. Климент Охридски“ състояло се на 05.10.2023 г. (протокол № 703). Тя обхваща 196 стандартни страници и включва 294 литературни източници, 69 фигури, 3 таблици и 30 стр. приложения. Дисертацията е структурирана в класически стил: Литературен обзор, Цели и задачи, Материали и методи, Резултати и дискусия, Изводи, Приноси и Литература.

3. Актуалност на дисертационната тема

Дисертационният труд на проф. Й. Думанов е посветен на изясняването на биохимичвите и молекулярно-биологични основи на наследствената ретинопатия на Best. В тази нръзка той изследва самоорганизацията и повърхностните свойства на човешкия бестрофин-1 (продукт на *BEST1* гена) в моделни биологични мембрани. Имайки предвид голямото социално значение на очните дегенеративни заболявания, най-често завършващи със слепота, актуалността на дисертационната тема е безспорна.

4. Оценка на дисертационния труд

Литературен обзор. Литературният обзор обхваща 20 страници от дисертацията и се основава на около 300 литературни източници. Той е посветен на молекулната ети-

ология на наследственото дегенеративно очно заболяване *ВителIFORMна дистрофия на макулата*, наречена Болест на Бест. За разбиране на нейната същност, проф. Думанов въвежда читателя в проблема чрез кратко описание на анатомията и физиологията на окото, структурата на ретината и нейните функции, като фокусът пада върху белтъка бестрофин-1 и неговия ген *BEST1*. От описанието става ясно, че след неговото откриване и структурно изучаване са намерени и инвариантни гени (*BEST2*, *BEST3* и *BEST4*), чиито продукти принадлежат към голямото семейство на калций-активируемите йонни хлорни канали (CACCC). Бестрофин-1 е съставен от 585 аминокиселини (MW = 68 kDa) и е локализиран в базоламеларната мембрана на ретиналния пигментен епител (РПЕ). Основната му функция е да регулира вътреклетъчните запаси на калций, чрез пренос на хлорни аниони в противовест на Ca^{2+} . В обзора са описани в големи детайли третичната структура на дистрофина и инкорпориранието му в клетъчните мембрани, като описанието е илюстрирано с висококачествени цветни фигури. Специален раздел на Литературния обзор е посветен на същността и функциите на клетъчната поляризация, както и на сигналните молекули участващи в насочването на мембранните белтъци към различните отдели и органели на клетката. Тъй като целта на проф. Думанов е да изследва свойствата на бестрофин-1 *in vitro* в моделни мембрани, той е посветил последния раздел от обзора на фосфолипидните мембрани, където в светлината на най-новите литературни данни разглежда техния състав, структура и асиметрия. Специално внимание е отделено на липидните рафтове и на техните основни съставки холестерол и сфинголипиди, които могат да оказват директно влияние върху структурата и активността на каналните белтъци. Детайлното познаване на молекулярното взаимодействие между тези вещества е важно за създаването на адекватни модели на зрителните дисфункции и разработването на методи за тяхното лечение.

Цели и задачи. Задълбоченият и критичен анализ на богатата литература е помогнал на автора да определи своята изследователска ниша и да формулира целите и задачите на своята дисертация. Целта е *да се проследи и изследва ролята на hBest1 в клетката, неговата структура, организация и функции, връзката между структура и функции, както и молекулярните механизми, водещи до възникване на бестрофинопатии*. В съответствие с поставената цел са формулирани и две адекватни и изпълними задачи.

Методология. За разработването на дисертацията е използвана богатата методология. Методите биват: *клетъчнобиологични* (създаване на стабилни клетъчни линии, експресиращи hBest1; проследяване на клетъчния растеж; определяне на митотичен индекс и морфология на клетките; измерване на метаболитна активност чрез МТТ тест; измерване на трансепителна резистентност на клетки; определяне на апоптоза и др.), *молекулярнобиологични* (мутагенез; Real-Time PCR;), *имунохимични* (имунофлуоресценция; имунопреципитация; имунодетекция), *биохимични* (биотинилиране на протеини; Western blot анализ; изолиране на липиди; фракциониране на липиди; афинитетна и молекулярно-ситова хроматография), *спектрални* (инфрачервена спектроскопия с Фуриетрансформация), *физикохимични* (тензиометрични измервания при едно-, дву- и трикомпонентни Лангмюирови монослоеви), *микроскопски* (Брюстер-ъглова микроскопия; атомно-силова микроскопия).

Резултати и дискусия. Резултатите от проведените изследвания са представени на около 80 страници от дисертацията. Изследванията са провеждани в две взаимно допълващи се направления, а именно: а) *Изследвания в клетъчни култури* и б) *Изследвания върху моделни биологични мембрани*.

При избора на клетъчна линия докторантът се е ръководил от това в кои клетки hBest1 не е природно експресиран и второ, каква е тяхната клетъчната поляризация. Липсата на ендогенна експресия на hBest1, като например в клетъчните линии MDCK II, RPE-J, RPE-1, Hela и HEK293, е благоприятно за целите на изследването, тъй като не

се налага допълнително генно заглушаване. От изброените линии MDCK II има и допълнително предимство тъй като тяхната поляризация е преходна (развива се само за около пет дни) и не се припокрива с образуването на монослой, което пък позволява лесно да се разграничават с помощта на маркерни белтъци базоламеларните и апикалните домени. Правилния избор на клетки е предопределил и по-нататъшните успехи на докторанта при изследването на експресията на hBest1 белтъците.

MDCK II клетки са трансфектирани с нормални и мутантни форми hBest1, а експресията на бестрофина е проследена по отношение на локализация в полярни клетки, асоциация с липидни рафтове и влияние върху клетъчното развитие и клетъчния метаболизъм.

Резултатите на проф. Думанов потвърждават факта, че в MDCK II клетките *BEST1* гена се транскрибира, но не се транслира, докато в трансфектираните клетки hBest1 се експресира напълно и се локализира в базолатералната мембрана (подобно на клетките от РПЕ). С други думи, клетките MDCK II са адекватен модел за изследване на молекулните механизми на бестрофинопатиите, в основата на които, според работната хипотеза, стои локализацията на hBest1 в базолатералната мембрана на РПЕ. Докторантът допуска, че правилното локализиране на hBest1 зависи от „поне три сортиращи сигнала, като нарушаването на аминокиселинния състав на всеки сигнал по отделно не може да „обърне“ локализирането на белтъка по апикалната мембрана, а предизвиква само частична промяна в тази посока“. Той доказва експериментално, че структурни промени в базолатералните сортиращи мотиви Y85VTL, Y97ENL и Y227DWI, отговорни за клиничните прояви на бестрофинопатиите при човека, предизвикват нарушения в сортирането и локализацията на мутантните форми hBest1, а фосфорилирането на hBest1 по Tyr 227 повлиява базолатералната му локализация. Проф. Думанов допуска също, че дори частичната апикална локализация и увеличаването на броя молекули на hBest1 по апикална мембрана нарушава йонния транспорт в клетките на РПЕ и увеличава концентрацията на хлорните аниони в пространството около фоторецепторите, което може да доведе до тяхното увреждане и отмиране.

Изследванията на д-р Думанов показват, че hBest1 не повлиява видимо растежните характеристики, метаболитната активност, морфологията и поляризацията на MDCK II клетките, но въпреки това той влияе върху трансепителната им резистентност (TEP). Интересно е наблюдението, че Glu и GABA повишават, а АТФ понижава стойностите на TEP. Оригинално е изследването на резистентността на трансфектираните MDCK II клетки спрямо фосфолипаза А2 (PLA2) и наблюдението, че тяхната резистентност се повишена, което пък се обяснява с повишеното съдържание на нелаамеларни липиди в клетъчните мембрани. Този показател, в комбинация със стойностите на TEP показва, че променения метаболизъм под действие на hBest1 в посока на синтез и/или натрупване на нелаамеларни липиди, понижава действието на PLA2 върху трансфектираните с hBest1 MDCK II клетки. Въпреки това, дори при пониженото действие на PLA2 върху клетките, течно-подредената фаза в клетъчните мембрани (където се локализира около 70% от hBest1) се увеличава, а течно-неподредената фаза намалява, което е указание за инактивиране на йонния канал в течно-подредената фаза.

Внимание заслужават оригиналните изследвания на проф. Думанов върху моделни биологични мембрани. Тук той изучава повърхностните физикохимични характеристики на Лангмюирови монослоеви и Лангмюир-Блоджетови филми от пречистен hBest1, както и на дву- и трикомпонентни Лангмюирови монослоеви и Лангмюир-Блоджетови филми съдържащи hBest1 в комбинация с фосфатидилхолин, сфингомиелин и холестерол. Благодарение на тези изследвания докторантът разкрива силите на взаимодействие между различните мембранни молекули и определя промяната в параметрите на вторичната структура на hBest1 под влияние на различни агенти. Така например, той установява, че добавянето на Ca^{2+} води до увеличаване на спиралните

структури в молекулата на hBest1 от 51% на 59%. Освен калциевите йони конформационни промени причиняват и аминокиселините Glu и GABA.

Д-р Думанов успява да определи геометричните параметри на hBest1. Той е молекула с формата на елипсоид с размери $100 \times 160 \times 75 \text{ \AA}$, които обаче могат да се променят под действие на Ca^{2+} . Изчислени са и параметрите, както и степента на опаковане на белтъка в състава на изкуствени/моделни мембрани като функция от техния състав и под влияние на нискомолекулните субстанции като Ca^{2+} , Glu и GABA.

Резултатите от проведените изследвания са задълбочено дискутирани сами за себе си и в светлината на съществуващите научни хипотези.

5. Изводи и приноси

Изследванията на проф. Й. Думанов имат научно-фундаментален, научно-приложен и методичен характер. Като фундаментални приноси бих посочил резултатите от системните изследвания върху механизма на взаимодействие на hBest1 с основни липиди от клетъчните мембрани, определящи тяхната организация и функции, както и влиянието на различни нискомолекулни съставки върху конформацията, параметрите и агрегацията на белтъка. Във връзка с това е разработен оригинален метод за количествено определяне на апикалната и базолатерална локализация на hBest1 основан на данните от конфокалната микроскопия.

Към приносите с научно-приложен характер се отнесат създаването на две нови стабилно трансфектирани с hBest1 клетъчни линии произхождащи съответно от РПЕ и бъбречен епител, както и оригиналният метод за изолиране и пречистване на hBest1 от трансфектирани MDCKII-hBest1 клетки.

6. Оценка на публикациите свързани с дисертационния труд

Във връзка с дисертацията на проф. Й. Думанов са публикувани 18 научни статии, от които 16 в списания с ИФ (общ ИФ 62.303). В 16 от трудовете дисертантът е водещ (първи или последен) автор. 16-те труда с ИФ 9 са разпределени по квартали както следва: Q1 – 9 бр.; Q2 – 3 бр.; Q3 – 2 бр.; Q4 – 2 бр. Свързаните с дисертацията трудове са цитирани досега 44 пъти. Резултатите от дисертационния труд са докладвани на 22 научни форума и части от тях са включени в 4 дипломни работи и 3 дисертационни труда за ОНС „доктор“. Дисертацията е разработена с финансовата подкрепа на 6 изследователски проекта, 3 от които са финансирани от МОН и 3 от ФНИ на СУ „Св. Климент Охридски“.

7. Автореферат, изводи и приноси

Авторефератът отразява адекватно съдържанието и постиженията на дисертацията.

8. Лично участие на автора

Фактът, че проф. Й. Думанов е водещ (първи или последен) автор в 16 от 18-те научни труда свързани с неговата дисертация, както и обстоятелството, че е научен ръководител на 6-те научни проекта благодарение на които е разработил своята дисертация ми дават основание да заключа, че преобладаващата част от постиженията на дисертационния му труд са негово лично дело.

9. Обобщена оценка

Обобщената оценка съгласно Правилника за прилагане на ЗРАСРБ за научната степен „Доктор на науките“ в област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика“ е представена на следната таблица.

| Показател | Изискуем минимум | Реален брой точки |
|-------------|------------------|-------------------|
| А | 50 | 50 |
| Б | 100 | 100 |
| Г | 100 | 100 |
| Д | 100 | > 160 |
| Общо | 350 | > 400 |

Както се вижда от представените данни, наукометричните показатели на проф. Йордан Думанов свързани с неговия дисертационен труд превишават официално приетите съгласно сега действащия ЗРАСРБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на проф. Йордан Думанов озаглавен „*Самоорганизация и повърхностни свойства на hBest1 в модели на биологични мембрани*”, представен за придобиване на научната степен „Доктор на науките“, е посветен на изясняването на молекулните основи на наследствената дегенеративна ретинопатия на Best. За целта той използва богат арсенал от съвременни методи на молекулярната и клетъчна биология, биохимията, биофизиката, имунологията и др., чрез които доказва ролята на конформационните промени, агрегацията и клетъчната локализация на човешкия hBest1 за възникването и прогресията на бестрофинопатиите при човека. В резултат на проведените изследвания са получени значителни по обем и качество резултати с подчертан приносен характер за науката и практиката. Във връзка с дисертационния труд са публикувани 18 научни труда, от които 16 в реномирани списания с ИФ и са изнесени 22 доклада на национални и международни научни форуми. Със своя дисертационен труд проф. Думанов се представя отново като утвърден и авторитетен изследовател в областта на биохимията и молекулярна биология. Неговите наукометрични показатели свързани удовлетворяват напълно и дори надвишават официалните изисквания на ЗРАСРБ за придобиване на научната степен „Доктор на науките” в Област на висше образование 4. „Природни науки, математика и информатика”, Професионално направление 4.3. Биологически науки, Научна специалност: „Молекулярна биология“, което ми дава основание убедено да препоръчам на уважаемото Научно жури определено да проведе защитата на неговия дисертационен труд, да му я присъди.

17.11.2023 г.

Рецензент:

/Акад. Иван Г. Иванов/