

Резюмета

на

рецензираните публикации на д-р Кирилка Младенова, участващи в конкурс

за „доцент“ обявен в ДВ бр. 30/15.04.2022 г.

1. K. Mladenova, V. Moskov Doumanova, I. Tabashka, S. Petrova, Z. Lalchev and J. Doumanov **Establishment and haracterization of stably transfected MDCK cell line, expressing hBest1 protein** Bulgarian Journal of Agricultural Science, 2013, 19 (2), 159–162

Резюме

Бестрофин-1 (Best1) е трансмембранен белтък, специфично експресиран в пигментните епителни клетки на ретината. Локализира се върху тяхната базолатерална плазмена мембрана. Мутации в този белтък водят до патологии на ретината, наречени бестрофинофатии. Смята се, че Best1 е Ca^{2+} -зависим Cl^{-} канал или регулатор на йонния транспорт, или и двете. Някои други функции, като поддържането на клетъчната хомеостаза, също се свързват с този белтък. За да получим допълнителна информация за структурата и функциите на протеина, ние създадохме стабилно трансфектирана клетъчна линия MDCK II, експресираща човешки Best1, конюгиран с Мус- и His-tags в С-края. Наличието на стабилно експресиран Best1 белтък беше доказано чрез имунофлуоресцентни изследвания. Изображенията от конфокална микроскопия потвърждават неговата базолатерална локализация. Освен това не са наблюдавани разлики в съотношението на клетъчния растеж и митотичния индекс на установената клетъчна линия в сравнение с конвенционалните MDCK клетки. Нашите проучвания показват, че Best1 не оказва влияние върху клетъчния растеж и клетъчната полярност в трансфектираните клетки, което прави нашата стабилно трансфектирана клетъчна линия подходящ модел за изследване на функциите на Best1.

2. Veselina Moskov Doumanova, **Kirilka Mladenova**, Svetla Petrova, Tanya Topouzova-Hristova, Christina Chakarova, Zdravko Lalchev, Jordan Doumanov **Aminoacid exchange R25W affects proper cellular localization of Best1 protein in MDCKII cells**, Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, 2014, Tome 67, Number 2

Резюме

Бестрофинопатиите са редки заболявания, свързани с мутациите в гена *BEST1*, кодиращ белтъка Best1. Той е трансмембранен канал, експресиран предимно върху базолатералната мембрана на ретиналния пигментен епител в окото. Беше показано, че някои мутации променят правилната клетъчна локализация на протеина. В едно скорошно проучване ние изследвахме локализацията на белтъка Best1, носещ мутация R25W в поляризирани MDCK II клетки. Нашите наблюдения разкриха нарастване на апикалната локализация на протеина, но не и пълно обръщане на полярността. Аргининът (R) на позиция 25 е много консервативен и се намира между два потенциални мотива за сортиране. Той влияе върху правилното локализиране на белтъка, въпреки че самият той не е потенциален мотив за сортиране.

3. Jordan Doumanov, **Kirilka Mladenova**, Radoslav Aleksandrov, Georgi Danovski, Svetla Petrova, 2014 **Interactions of pharmacologically active snake venom sPLA2 with**

Резюме

Секреторните фосфолипази А2 (sPLA2s) представляват голямо семейство от структурно подобни ензими, чието действие е насочено към различни тъкани и органи и предизвикват множество фармакологични ефекти, базирани на тяхната каталитична специфичност – хидролиза на sn-2 естерната връзка на глицерофосфолипидите. Невротоксинът випоксин, изолиран от отровата на *Vipera ammodytes meridionalis*, е хетеродимерен постсинаптичен йонен комплекс, съставен от две протеинови субединици – основен и токсичен His48 sPLA2 ензим и киселинен, ензимно неактивен и нетоксичен компонент. В тази статия за първи път демонстрираме, че ензимът sPLA2 от випоксин влияе върху целостта и жизнеспособността на клетките на четири типа клетки и причинява различни клетъчни отговори. Най-драматичните локални тъканни ефекти са наблюдавани с клетки RPE-1 (пигментни епителни епители на ретината), последвани от клетки A549 (аденокарциномен човешки алвеоларен епител) и MDCK (Madin-Darby Canine Kidney epithelial) клетки. Продуктите на ензимната реакция, лизофосфолипидите и ненаситените свободни мастни киселини, действат като липидни медиатори, които могат да предизвикат увреждане на мембраната или да стимулират клетъчната пролиферация. Нашите предварителни резултати за цитотоксичния ефект на sPLA2 от випоксин върху A549 клетки са обещаващи при търсене на евентуалния му противораков потенциал.

4. Ralitsa Veleva, Bela Petkova, Veselina Moskova-Doumanova, Jordan Doumanov, Milena Dimitrova, Petya Koleva, **Kirilka Mladenova**, Svetla Petrova, Zhenya Yordanova, Veneta Kapchina-Toteva, Tanya Topouzova-Hristova 2015 **Changes in the functional characteristics of tumor and normal cells after treatment with extracts of white dead nettle** Biotechnology and biotechnological equipment, том:29, брой:1, 2015, стр.181-188, ISSN (print):1310-2818, ISSN (online):1314-3530, doi:10.1080/13102818.2014.989094

Резюме

Lamium album L. е многогодишно тревисто растение, широко използвано в народната медицина. Притежава широк спектър от терапевтични действия (противовъзпалително, стягащо, антисептично, антибиотично, спазмолитично, антиоксидантно и антипролиферативно). Запазването на лечебните растения може да се извърши чрез размножаване *in vitro*, за да се избегне изчерпването на естественото им местообитание. Важно е да се знае дали екстрактите от растения *L. album*, отглеждани *in vitro*, притежават подобни свойства като екстрактите от растения, отглеждани *in vivo*. Поради тези причини се налага да се изследват промените в състава на вторичните метаболити по време на *in vitro* култивиране на растението и как те влияят върху биологичната активност.

Използвахме A549 човешка ракова клетъчна линия и нормални бъбречни епителни клетки MDCKII (Madin-Darby Canine Kidney Cells II) като контроли при оценка на противораковия ефект на растителните екстракти. За изясняване на промените в някои ключови функционални характеристики, тест за адхезия, МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2-5-дифенил тетразолиев бромид), трансепителна резистентност (TER), имунофлуоресцентно оцветяване и тест с трипаново синьо бяха изпълнени.

Екстрактите от метанол и хлороформ от *in vivo* и *in vitro* култивирани растения засягат по различен начин ракови и неракови клетки. Най-изразени разлики се наблюдават при морфологичния анализ и в свойствата на клетъчната адхезия. Ние също така открихме понижаване на трансепителната резистентност на MDCK II клетки, чрез третиране с растителни

екстракти, в сравнение с нетретираните MDCK II клетки. Клетките A549 не се поляризират при същите условия. Забелявана е променена организация на актиновите нишки и в двата типа клетки, което предполага, че екстракти от *L. album L.* променят TER и актиновите филаменти и по някакъв начин могат да блокират клетъчните механизми, което води до поляризация на MDCK II клетки

5. T. Topouzova-Hristova, J. Doumanov, D. Melnishka, **K. Mladenova**, V. Moskova-Doumanova, Z. Lalchev, T. Andreeva, E. Haladjova, S. Rangelov 2015 **Effects of novel gene delivery vector systems based on poly(vinyl benzyl trimethylammonium chloride) on A549 cell line** FEBS journal , том:282, брой:S1, 2015, стр.282-282, ISSN (print):1742-464X, ISSN (online):1742-4658, doi:<https://doi.org/10.1111/febs.13339>

Резюме

Системите за доставяне на гени, базирани на полимери, са по-безопасни, по-малко патогенни и по-малко имуногенни алтернативи на вирусните системи. В тази работа ние се фокусираме върху ефектите на нови хомополимери на базата на винил бензил триметиламониев хлорид като векторни системи за доставка на ген в клетъчна линия от човешки белодробни ракови клетки A549. Клетките се инкубират с ДНК/полимерни комплекси (полиплексите съдържат ДНК от сперматозоиди от съомга) в широк диапазон от съотношения и концентрации на N/P (амино-към-фосфатни групи) за 6 часа. Използвайки МТТ анализи, оцветяване с трипаново синьо и метиленово синьо, ние изследваме цитотоксичността на полиплексите, докато тяхното поведение в клетките през петдневния период беше изследвано чрез микроскопски наблюдения. Използвайки МТТ анализ, открихме много ниска токсичност както на чистия полимер, така и на полиплексите при различни съотношения N/P в диапазона на концентрация 5–50 µg/ml. В същото време се открива частична пермеабилзация на клетъчните мембрани. Нашите резултати предполагат абсорбция върху клетъчната повърхност и навлизане на полиплекси в около 50% от клетките. Освен това, 48h – 72h след третирането, полиплексите показват движение навън от клетките, вероятно чрез образуване на екзозоми. Броят на клетките драстично намалява и клетъчната морфология е засегната. Нашите данни предполагат успешна интернализация на изследваните полиплекси, като те остават стабилни в продължение на няколко дни в цитоплазмата. За доставянето на ДНК е от решаващо значение да се разработят по-малко стабилни полимерни частици. Би могло да се заключи, че тези наноразмерни комплекси са обещаващи материали за транспортиране на биологични молекули и по-специално за генна терапия за лечение на широк спектър от заболявания.

6. **Kirilka Mladenova**, Svetla D. Petrova, Tonya D. Andreeva, Veselina Moskova-Doumanova, Tanya Topouzova-Hristova, Yuri Kalvachev, Konstantin Balashev, Shomi S. Bhattacharya, Christina Chakarova, Zdravko Lalchev, Jordan A. Doumanov 2017 **Effects of Ca²⁺ ions on bestrophin-1 surface films**, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2017, 149 (2017) 226–232

Резюме

Човешкият бестрофин-1 (hBest1) е трансмембранен калциево-зависим хлорен канал - член на семейството на бестрофиновите анионни канали, експресиран предимно в мембраната на клетките на ретиналния пигментен епител (retinal pigment epithelium RPE, RPE). Мутациите в протеина причиняват очни заболявания, наречени бестрофинопатии. Тук, представяме първото изследване на инфрачервената спектроскопия с трансформация на Фурие (Fourier transform infrared, FTIR), на елементите на вторичната структура на hBest1, π/A изотерми и хистерезис, Брюстер ъглова микроскопия (Brewster angle microscopy, BAM) и атомна силова микроскопия

(atomic force microscopy, AFM) на агрегираното състояние на диспергираните протеинови молекули в Лангмюир и Лангмюир-Блоджетови филми. Вторичната структура на hBest1 се състои предимно от β 10-спирала (27.2%), α -спирала (16.3%), β извивки и бримки (32.2%). AFM изображенията на hBest1 показват приблизителни странични размери от $100 \times 160 \text{ \AA}$ и височина 75 \AA . Добавянето на калциеви йони (Ca^{2+}) предизвиква конформационни промени във вторичната структура на протеина, което води до асоциирането на протеинови молекули и промени в молекулярната и макроорганизацията на монослоевите от hBest1. Тези данни представят основна информация, необходима за изследване на молекулярните механизми, свързани с ретината и другите патологии определени от този протеин.

7. **K. Mladenova**, S. Petrova, T. Andreeva, V. Moskova-Doumanova, Z. Lalchev, J. Doumanov, 2015 **Effect of Ca^{2+} ions on Bestrophin-1 interaction with 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in surface films**, FEBS journal suppl., 2015, Volume 282, p. 319, Supplement 1

Резюме

Бестрофин-1 (Best1) е трансмембранен канален протеин, който е експресиран в плазмената мембрана на пигментния епител на ретината (РПЕ). Best1 е мултифункционален протеин, който може да действа като Ca^{2+} - зависим хлорен канал или/и регулатор на Ca^{2+} канали. Каналът участва не само в транспорта на Cl^{-} йони но и на органични молекули, като γ -аминомаслена киселина (GABA) в глиални клетки и глутамат в астроцити и неврони. Въпреки че структурата на Best1 все още е неизяснена, то неговите взаимодействия с липидите на плазмената мембрана са важни за конформацията, олигомеризацията и функционалната активност. Следователно познаването на взаимодействията на Best1 с биорелевантни липиди е от голямо значение. Такива проучвания не бяха провеждани, доколкото протеинът не беше пречистен до хомогенност. За първи път нашата група публикува оригинална методология за изолиране и пречистване на достатъчно количество функционално активен човешки рекомбинантен Best1 от стабилно трансфектирани MDCK клетки, което позволи това изследване. Нашият интерес беше фокусиран върху ефекта от Ca^{2+} йони върху взаимодействията на Best1 с 1-палмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, POPC) в Лангмюрови монослоеве, защото това е най-разпространеният фосфолипид в мембраните на животинските клетки. Изотермите π/A (повърхностно налягане/площ) и хистерезисите на компресия/разширение на монослоевите Best1, POPC и Best1/POPC бяха определени в отсъствие и присъствие на Ca^{2+} . Ефектът на Ca^{2+} върху морфологията на монослоевите беше наблюдаван чрез Брюстер ъглова микроскопия (ВАМ). Нашето проучване показва, че включването на Ca^{2+} в подфазата на монослоя не променя формата на π/A изотермите, но намалява средната молекулна площ на Best1, POPC и Best1/POPC монослоевите. Тези резултати корелират добре с ВАМ изображения, показващи, че присъствието на Ca^{2+}

индуцира образуването на липид- протеинови макромолекулни агрегати (Best1-POPC клъстери) по време на компресия на монослоевите. Ние предполагахме, че Ca^{2+} йони играят роля за взаимодействията на Best1 с POPC при физиологични условия в клетката.

8. Jordan Doumanov, **Kirilka Mladenova**, Tanya Topouzova-Hristova, Stoyanka Stoitsova, Svetla Petrova, 2015 **Effects of vipoxin and its components on HepG2 cells**, Toxicon, 2015, 94 36-44

Резюме

Фосфолипазите А2 (svPLA2) от змийската отрова са сред основните токсични компоненти с голямо въздействие върху различни тъкани и органи въз основа на тяхната каталитична

специфичност и разнообразие от фармакологични ефекти, чийто механизъм все още под дискуссия. Основният токсичен компонент, изолиран от отровата на *Vipera ammodytes meridionalis*, е хетеродимерният постсинаптичен йонен комплекс випоксин, съставен от основната и токсична ензимната субединица PLA2 (GIIA секретира PLA2) и киселата, ензимно неактивна и нетоксична субединица випоксинен киселинен компонент (viroxin acidic component, VAC). Това проучване показва за първи път, че випоксинът и неговите отделни субединици влияят върху целостта и жизнеспособността на HepG2 клетките, показвайки различия във фармакологичните им дейности. При експерименталните условия, отделната PLA2 субединица индуцира цитотоксичност, цитоскелетни пренареждания и предизвиква ранна апоптоза по зависим от концентрацията начин, което е свързано с нейната ензимна активност. Випоксинът и VAC не оказват влияние върху жизнеспособността на клетките, но проявяват висока степен на генотоксичност, докато увреждането на ДНК, индуцирано от PLA2 субединицата е умерено и може да не е свързано с неговата каталитична активност. Нашите резултати показват, че взаимодействията между випоксиновите субединици играят важна роля в клетъчния отговор на HepG2 и най-вероятно засягат наблюдаваното разграничение между цито- и генотоксичност.

9. J. Doumanov, **K. Mladenova**, T. Topouzova-Hristova, I. Ivanova, S. D. Petrova 2015, **Influence of snake venom Phospholipase A2 on RPE-1 cells – multiple biological roles of sPLA2**, FEBS journal suppl., 2015, Volume 282, p. 223, Supplement 1

Резюме

Секретираните фосфолипази A2 (sPLA2, EC 3.1.1.4) катализират хидролизата на 2-ациловата естерна връзка на 1,2-диацил-3-sn-фосфоглицериди по зависим от калция начин, освобождавайки мощни липидни медиатори, участващи в увреждане на мембраната, клетъчна пролиферация, възпаление и апоптоза. sPLA2 от змийска отрова е от семейството структурно свързани ензими, които засягат различни видове тъкани и провокират невротоксичност, миотоксичност, кардиотоксичност, антикоагулантни ефекти, нефротоксичност, хепатотоксичност, агрегация на тромбоцитите, хемолитична активност, възпаление и др. Нашият интерес е фокусиран върху токсичните ефекти на змийската отрова sPLA2 върху ретиналния пигментен епител (retinal pigment epithelium, RPE). Клетките на RPE играят ключова роля във фагоцитозата на мембраните на външния сегмент на фоторецепторите, абсорбцията на светлина, зрителния цикъл, секрецията, епителния транспорт (хомеостаза) и др. За да хвърлим светлина върху влиянието на невротоксичната sPLA2 върху метаболизма и пролиферацията на RPE клетките, ние изследвахме ефектите на випоксиновата sPLA2 субединица върху RPE-1 моделната клетъчна линия. Випоксинът е основният невротоксин в отровата на змията *Vipera ammodytes meridionalis* (ендемичен за някои региони на Балканите). Това е хетеродимерен протеин, съставен от основна и токсична субединица GIIA sPLA2 (Mr 13828 Da, pI 10.4) и кисела, ензимно неактивна и нетоксична субединица (Mr 13639 Da, pI 4.6), спонтанно асоциирана в здрав 1:1 комплекс от множество нековалентни връзки и допълнително стабилизирана чрез електростатични взаимодействия. Разделянето на випоксиновите субединици се извършваше с помощта на катионообменна хроматография върху Mono S FPLC колона и тяхната хомогенност се определяше чрез SDS PAGE. Използвахме МТТ и „кометни“ тестове за да определим цито- и генотоксичността и чрез флуоресценция на актин, за да открием пренареждане на цитоскелета, индуцирани от токсичната sPLA2.

Нашите резултати показват промени в метаболитната активност на клетките, драматично пренареждане на актиновия цитоскелет в RPE-1 клетките и генериране на двувъзвращащи ДНК „скъсвания“. Предполагаме, че продуктите на ензимната активност на sPLA2 имат също свое собствено въздействие и засягат пътищата на клетъчния растеж.

10. Kostadinova, A., J. Doumanov, D. Moyankova, S. Ivanov, **K. Mladenova**, D. Djilianov, T. Topouzova-Hristova 2016 **Haberlea rhodopensis extracts affect cell periphery of keratinocytes**, Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, 2016, Tome 69, Number 4, pages 439- 448

Резюме

Общите черти на хроничните дерматологични състояния са свързани с възпаление и ROS (Reactive oxygen species), както и нарушения в клетъчната пролиферация и диференциация. Нашата цел беше да изследваме въздействието на екстрактите на *Haberlea rhodopensis* върху митохондриалната активност, целостта на клетъчните мембрани, актиновия цитоскелет и здравите механични връзки (свързани със загубата на ZO-1) на човешки кератиноцити (HaCaT клетки). Бяха проведени тестове за цитотоксичност като MTS, LDH и анализ на изключване на трипаново синьо, за да се оцени метаболитната активност и мембранната пропускливост на клетките. В концентрации до 2 mg/ml екстрактите влияят на клетъчната периферия, проникват в мембраната и нарушават механичните контакти на HaCaT кератиноцитите, което е посилно изразено при активно делящи се клетки (-Ca + клетки). Нашите резултати показват, че екстрактите от *Haberlea rhodopensis* могат да бъдат добър кандидат за използване при комплексно лечение на патологични дерматологични състояния.

11. Kalinova, R., Doumanov, J., **Mladenova, K.**, Janevska, D.; Georgieva, M., Miloshev, G., Topouzova-Hristova, T., Dimitrov, I. 2017 **Rational design of polypeptide-based block copolymer for nonviral gene delivery**, ChemistrySelect, 2017, 2, 12006 –12013

Резюме

Настоящата работа описва разработването, характеризирането и оценката *in vitro* на новите поли (L-лизин) базирани полиплекси като невирусни системи за доставка на гени. Първоначално беше добре дефиниран, синтезиран и охарактеризиран хибриден блок-кополимер, съдържащ поли (етилен гликол) метакрилат (POEGMA) и поли (L-лизин) (PLL) комплекси (блокове). Хибридният кополимер показва висока способност да кондензира ДНК в стабилни полиплекси във водна среда с размери приблизително. 100 nm. Беше определена клетъчна токсичност на наноплексите в клетъчни линии A549 (алвеоларни) и HepG2 (хепатокарциномни). Клетъчната интернализация на наночастиците и способността за трансфекция бяха изследвани в HepG2 клетки. Първоначалните експерименти показаха, че ДНК е беше успешно трансфектирана в човешки ракови клетки на черния дроб, където експресира ген на зеления флуоресцентен протеин (EGFP). Тези резултати показаха, че новосинтезираният POEGMA-b-PLL диблоков кополимер може да бъде много добър кандидат като невирусен вектор за доставка на генетична информация.

12. Haladjova, E.; Halacheva, S.; Momekova, D.; Moskova-Doumanova, V.; Topouzova-Hristova, T.; **Mladenova, K.**; Doumanov, J.; Petrova, M.; Rangelov, S 2017 **Polyplex Particles based on Comb-Like Polyethylenimine/Poly(2-ethyl-2-oxazoline) Copolymers: Relating Biological Performance with Morphology and Structure**, Macrom. Biosci. – submitted October 2017; ISSN 1616-5195, accepted December 2017, Apr;18(4):e1700349, doi: 10.1002/mabi.201700349. Epub 2018, Feb 28

Резюме

Настоящата работа е фокусирана върху възможността за използване на гребеновидни съполимери на полиетиленимин с поли (2-етил-2-оксазолин) (LPEIcomb-PEtOx) с различна

плътност и степени на полимеризация на PEI и PEtOx за доставяне на ДНК в клетки. Съполимерите образуват малки и добре дефинирани частици при повишени температури, които се използват като платформи за свързване и кондензиране на ДНК. Електростатичните взаимодействия между частиците и ДНК водят до образуване на полиплексни частици под 100 nm с тясно разпределение на размера, различна морфология и структура. Изследваните системи за генно доставяне показват ефективност на трансфекция в зависимост от топологията на съполимерната верига, формата на полиплексните частици и пътя на интернализация. Проточната цитометрия показва повишена ефективност на трансфекция на полиплексите с удължена и елипсоидна морфология. Предварителното проучване за биосъвместимост върху панел от човешки клетъчни линии показва, че чистите съполимери и техните полиплекси не са цитотоксични.

13. Tonya D. Andreeva, Svetla D. Petrova, **Kirilka Mladenova**, Veselina Moskova-Doumanova, Tanya Topouzova-Hristova, Yulia Petseva, Nikola Mladenov, Konstantin Balashev, Zdravko Lalchev, Jordan A. Doumanov 2018 **Effects of Ca²⁺, Glu and GABA on hBest1 and composite hBest1/POPC surface films**, Colloids Surf B Biointerfaces, 2018 Jan 1;161:192-199.

Резюме

Бестрофинопатиите са очни заболявания, причинени от мутации в човешкия бестрофин-1 (hBest1) - трансмембранен протеин, Ca²⁺ активиран от хлорен канал, експресиран главно в клетките на ретиналния пигментен епител (РПЕ). hBest1 е също важен транспортер за невротрансмитери като глутамат (Glu) и γ-аминомаслена киселина (GABA) в нервната система. Напоследък се предлага нова биологична роля на hBest1, свързана с възможното му участие в патологията на заболявания на мозъка (като болестта на Алцхаймер, болестта на Паркинсон). Тук съобщаваме за ефектите на Ca²⁺, Glu и GABA върху hBest1 и смесени hBest1/POPC (1-палмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, POPC) Лангмюирови и Лангмюир-Блоджетови монослоеове въз основа на повърхностната динамика (чрез π/A изотерми и хистерезиси), морфология (чрез Брюстер ъглова микроскопия, ВAM) и визуализация на белтъчната молекулярна организация (чрез атомна силова микроскопия, AFM). Ca²⁺ йони и невротрансмитерите Glu и GABA влияят на hBest1 топологията на фазовата граница въздух/вода, променяйки неговата повърхностна активност, размер, ориентация и организация. За разлика от „чистия“ hBest1, не са открити значителни промени на π/A изотермите и хистерезисите при смесените hBest1/POPC филми, но са

установени разлики в ефектите на Ca²⁺, Glu и GABA върху структурата, агрегационното състояние и ориентацията hBest1 (чрез ВAM и AFM). Установихме, че бинарните hBest1/POPC филми са фазово разделени на границата въздух/вода, което предполага по-силни липид-липидни и протеин-протеинови взаимодействия в сравнение с липид-протеиновите взаимодействия, които могат значително да променят молекулярната организация и активност на hBest1 в клетъчните мембрани. Нашите резултати хвърлят светлина върху структурата, повърхностното поведение и организацията на hBest1, които определят връзката структура - функционалната активност на hBest1 като транспортен канал.

14. Pavel Bakardzhiev, Natalia Toncheva-Moncheva, **Kirilka Mladenova**, Svetla Petrova, Pavel Videv, Veselina Moskova-Doumanova, Tanya Topouzova-Hristova, Jordan Doumanov and Stanislav Rangelov 2020 **Assembly of Amphiphilic Nucleic Acid–Polymer Conjugates into Complex Superaggregates: Preparation, Properties, and in vitro Performance**, European Polymer Journal, Volume 131, 15 May 2020, 109692

Резюме

Нуклеиново киселинно-полимерни конюгати (Nucleic acid-polymer conjugates, NAPCs) се получават чрез „click coupling“ реакции на подходящо функционализирани олигонуклеотиди със синтетични полимерни вериги с различна химическа природа, състав и свойства, а именно полиетери като поли(етоксиетил глицидил етер) и полиестери като поли(ϵ -капролактон). Получените NAPC са амфифилни и образуват стабилни агрегати във воден разтвор. Агрегатите бяха изследвани задълбочено чрез различни техники - статично, динамично и електрофоретично разсейване на светлината, трансмисионна електронна микроскопия и атомна силова микроскопия. Размерът и моларните маси на частиците, както и други параметри като агрегационно число и брой олигонуклеотидни нишки на частица са значително по-големи от тези, съобщени за сферични нуклеинови киселини несъдържащи метали. Образоването на суперагрегати от по-малки отделни мицели или немицеларни комплекси се дължи на хидрофобните взаимодействия между синтетичните полимерни вериги и „лепливите“ взаимодействия между олигонуклеотиди като сдвояване на базови двойки, подреждане, водородно свързване. „Лепливите“ взаимодействия се уравновесяват чрез отблъскване между отрицателно заредените олигонуклеотидни нишки, като по този начин се осигурява колоидна стабилност на структурите. Повърхностната плътност на олигонуклеотидните нишки в наночастицата предполага, че последните са в конформация на произволна „намотка“ (гъба), а не в напълно разтегнат режим на „четка“. Отличителните свойства на прототипичните сферични нуклеинови киселини - нетоксичност и биосъвместимост, повишено клетъчно усвояване без нужда от трансфекционни агенти, подобрена нуклеазна стабилност - също са показани при новите наночастици, въпреки разликите в размера, морфологията и структурата

15. Pavel Videv, Nikola Mladenov, Tonya Andreeva, **Kirilka Mladenova**, Veselina Moskova-Doumanova, Georgi Nikolaev, Svetla D. Petrova, Jordan A. Doumanov, **Condensing Effect of Cholesterol on hBest1 / POPC and hBest1 / SM Langmuir Monolayers** 2021 Condensing Effect of Cholesterol on hBest1/POPC and hBest1/SM Langmuir Monolayers; Membranes, Volume 11, Issue 1, 52

Резюме

Човешкият бестрофин-1 протеин (hBest1) е трансмембранен канал, свързан с калциево зависимия транспорт на хлорни йони в ретиналния пигментен епител, както и с транспорта на глутамат и GABA в нервните клетки. Взаимодействията между hBest1, сфингомиелини (SM), фосфатидилхолини и холестерол са от решаващо значение за свързването на hBest1 с домените на клетъчните мембрани и неговите биологични функции. Тъй като холестеролът играе „ключова“ роля при формирането на липидни рафтове, подреждането на липидите и моделирането/ремоделирането на латералната мембранна структура, ние изследвахме ефекта от различните концентрации на холестерол върху повърхностното напрежение на hBest1/POPC (1-палмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин) и hBest1/SM Лангмюирови монослое в присъствието/отсъствието на Ca^{2+} йони с чрез измервания на повърхностното налягане и Брюстер ъгловата микроскопия. Тук ние съобщаваме, че холестеролът: (1) има пренебрежим кондензиращ ефект върху „чисти“ hBest1 монослое, открит главно в присъствието на Ca^{2+} йони, и; (2) предизвиква кондензиращ ефект върху съставни hBest1/POPC и hBest1/SM монослое. Тези резултати показват значението на междумолекулните протеин-липидни взаимодействия за конформационната динамика на hBest1 и неговите биологични функции като мултимерен йонен канал.

16. Pavel Videv, **Kirilka Mladenova**, Svetla Petrova, Jordan Doumanov, **STRUCTURE AND FUNCTION OF hBEST1, EXPRESSED IN MDCK II CELLS**, глава от книга, ISSN 1314-3425, p. 387-395, PKP-Print, Глава от Книга, регистрирана в НАЦИД

Резюме

Бестрофинопатиите са очни заболявания, причинени от мутации в човешкия бестрофин-1 (hBest1) - трансмембранен протеин и Ca^{2+} - зависим хлорен канал, главно експресиран в клетките на ретиналния пигментен епител. Неговите важни биологични функции варират от транспорт на хлорни йони до транспорт на невротрансмитери като Glu и GABA в нервната система, участие в мозъчната патология (болестта на Алцхаймер, Паркинсон), регулиране на клетъчния обем, регулиране на нивата на калций и кинетика на volt-dependent канали. Неотдаващите ни изследвания върху връзката структура-функция hBest1 са съсредоточени върху нейните взаимодействия с фосфолипидни монослоеви и модели на мембранни системи, за да се изследва найдобре патогенезата на заболяването и да се подобри качеството на живот на засегнатите индивиди.

17. **Mladenova K., Doumanov J., Petrova S., Videv P., Moskova-Doumanova V., Topouzova-Hristova T., Bakardzhiev P., Toncheva-Moncheva N., Rangelov S., Biological evaluation of novel amphiphilic nucleic acid - polymer nanoparticles in eukaryotic cells, FEBS OPEN BIO, vol:11, issue:Suppl. 1, 2021, pages:261-261, Ref, Web of Science**

Резюме

Системите за доставяне на гени, базирани на полимери, са глобално изследвани като по-безопасни и по-малко имуногенни заместители на вирусните системи. Въпреки това, тъй като нуклеиновите киселини (NAs) са стабилни и хидрофилни молекули и тяхното вътреклетъчно доставяне и насочване разчитат на вторични носители. В тази работа ние представяме биологичните ефекти на новите конюгати нуклеинова киселина-полимер (NAPCs) върху две клетъчни линии – A549 и HepG2. NAPC са съставени от олигонуклеотиди, функционализирани с различни полиетери като поли(етоксиетил глицидилов етер) и полиестери като поли(ϵ -капролактон). Установено е, че NAPC комплектите носят хиляди олигонуклеотидни нишки на частица. Използвайки МТТ и кристално виолетови анализи, ние изследваме цитотоксичността на NAPC, приложени върху клетки при различни концентрации. Ефектът върху клетъчната жизнеспособност се определя чрез инкубиране на клетките за 48 часа с наночастици по начин, зависим от концентрацията. Поведението на NAPCs в клетките беше изследвано чрез микроскопски наблюдения след оцветяване с неутрално червено и оцветяване със SYBR Green I (Публикувано по-рано в: Bakardzhiev P et. al. (2020) European Polymer Journal, 131). Нашите резултати предполагат, че биологичните свойства на NAPC включват ниска токсичност и бързо клетъчно поглъщане без нужда от други агенти за трансфекция. Ние заключаваме, че тези нови NAPC са обещаващи носители за доставка на ДНК с потенциал за биомедицински приложения. Благодарности: Тази работа е подкрепена от грант DN 19/8-2017 от Български национален фонд за наука.