

**СПИСЪК РЕЗЮМЕТА НА АНГЛИЙСКИ И БЪЛГАРСКИ ЕЗИК  
НА НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ**

за участие в конкурса за академичната длъжност „доцент“  
по професионално направление 4.3. Биологически науки,  
научна специалност „Молекулярна биология“,  
обявен в ДВ бр. 24 от 18.06.2024г.,  
за нуждите на секция „Регулация на генната активност“  
на  
**гл. ас., д-р Елена Божидарова Кръчмарова**

**ПОКАЗАТЕЛ В**

## **Публикация В4.1**

**Krachmarova, E.; Petkov, P.; Lilkova, E.; Stoyanova, D.; Malinova, K.; Hristova, R.; Gospodinov, A.; Pieva, N.; Nacheva, G.; Litov, L.** Interferon- $\gamma$  as a Potential Inhibitor of SARS-CoV-2 ORF6 Accessory Protein. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 2155, doi: [10.3390/ijms25042155](https://doi.org/10.3390/ijms25042155)

### **Abstract**

ORF6 is responsible for suppressing the immune response of cells infected by the SARS-CoV-2 virus. It is also the most toxic protein of SARS-CoV-2, and its actions are associated with the viral pathogenicity. Here, we study *in silico* and *in vitro* the structure of the protein, its interaction with RAE1 and the mechanism of action behind its high toxicity. We show both computationally and experimentally that SARS-CoV-2 ORF6, embedded in the cytoplasmic membranes, binds to RAE1 and sequesters it in the cytoplasm, thus depleting its availability in the nucleus and impairing nucleocytoplasmic mRNA transport. This negatively affects the cellular genome stability by compromising the cell cycle progression into the S-phase and by promoting the accumulation of RNA–DNA hybrids. Understanding the multiple ways in which ORF6 affects DNA replication may also have important implications for elucidating the pathogenicity of SARS-CoV-2 and developing therapeutic strategies to mitigate its deleterious effects on host cells.

**Е. Кръчмарова, П. Петков, Е. Лилкова, Н. Илиева, М. Рангелов, Н. Тодорова, К. Малинова, Р. Христова, Г. Начева, Г. Начева, А. Господинов, Л. Литов,** Анализ на механизма на действие на белтъка на вируса SARS-CoV-2 ORF6

### **Резюме**

ORF6 е отговорен за потискането на имунния отговор на клетки, заразени с вируса SARS-CoV-2. Той е също така най-токсичният белтък на SARS-CoV-2, а действията му са свързани с вирулентността на вируса. Ние изследваме *in silico* и *in vitro* структурата на белтъка, неговото взаимодействие с RAE1 и механизма на действие на неговата висока токсичност. Показваме, както чрез молекулно динамични симулации, така и експериментално, че белтъкът на SARS-CoV-2, ORF6, вграден в цитоплазмените мембрани, се свързва с RAE1 и го задържа в цитоплазмата, като по този начин изчерпва неговата наличност в ядрото и нарушава ядрено-цитоплазмения транспорт на иРНК. Това негативно влияе върху стабилността на клетъчния геном, като компрометираща напредъка на клетъчния цикъл в S-фаза и насърчава натрупването на РНК-ДНК хибриди. Разбирането на многобройните начини, по които ORF6 влияе върху репликацията на ДНК, може да има важни последици за изясняване на патогенността на SARS-CoV-2 и разработването на терапевтични стратегии за смекчаване на вредните му ефекти върху клетките на гостоприемника.

## **Публикация В4.2**

**Krachmarova, E.; Petkov, P.; Lilkova, E.; Ilieva, N.; Rangelov, M.; Todorova, N.; Malinova, K.; Hristova, R.; Nacheva, G.; Gospodinov, A., Litov, L.** Insights into the SARS-CoV-2 ORF6 Mechanism of Action. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 11589.

doi: [10.3390/ijms241411589](https://doi.org/10.3390/ijms241411589)

### **Abstract**

The ORF6 protein of the SARS-CoV-2 virus plays a crucial role in blocking the innate immune response of the infected cells by inhibiting interferon pathways. Additionally, it binds to and immobilises the RAE1 protein on the cytoplasmic membranes, thereby blocking mRNA transport from the nucleus to the cytoplasm. In all these cases, the host cell proteins are tethered by the flexible C-terminus of ORF6. A possible strategy to inhibit the biological activity of ORF6 is to bind its C-terminus with suitable ligands. Our *in silico* experiments suggest that hIFN $\gamma$  binds the ORF6 protein with high affinity, thus impairing its interactions with RAE1 and, consequently, its activity in viral invasion. The *in vitro* studies reported here reveal a shift of the localisation of RAE1 in ORF6 overexpressing cells upon treatment with hIFN $\gamma$  from predominantly cytoplasmic to mainly nuclear, resulting in the restoration of the export of mRNA from the nucleus. We also explored the expression of GFP in transfected-with-ORF6 cells by means of fluorescence microscopy and qRT-PCR, finding that treatment with hIFN $\gamma$  unblocks the mRNA trafficking and reinstates the GFP expression level. The ability of the cytokine to block ORF6 is also reflected in minimising its negative effects on DNA replication by reducing accumulated RNA-DNA hybrids. Our results, therefore, suggest hIFN $\gamma$  as a promising inhibitor of the most toxic SARS-CoV-2 protein.

**Е. Кръчмарова, П. Петков, Е. Лилкова, Д. Стоянова, К. Малинова, Р. Христова, А. Господинов, Н. Илиева, Г. Начева, Л. Литов** Интерферон- $\gamma$  като потенциален инхибитор на аксесорния белтък ORF6 на SARS-CoV-2

### **Резюме**

Съществуващите научни изследвания показват, че белтъкът ORF6 на вируса SARS-CoV-2 играе ключова роля в блокирането на вродения имунен отговор на заразените клетки, като инхибира интерфероновите пътищата. Освен това той се свързва и имобилизира белтъка RAE1 на цитоплазмените мембрани, тъй като блокира транспорта на иРНК от ядрото към цитоплазмата. Във всички тези случаи, белтъците на клетката са свързани от подвижния С-край на ORF6. Възможна стратегия за инхибиране на биологичната активност на ORF6 е свързването му с подходящи лиганди на С-края. Нашите *in silico* експерименти подсказват, че hIFN $\gamma$  се свързва с белтъкът ORF6 с висок афинитет, което води до нарушаване на взаимодействието му с RAE1 и, следователно, на неговата активност при вирусната инвазия. *In vitro* изследванията, докладвани тук, показват изместване на локализацията на RAE1 в клетките, свръхекспресиращи ORF6, след третиране с hIFN $\gamma$ , от предимно цитоплазмена към главно ядрена, което води до възстановяване на транспорта на иРНК от ядрото. Също така изследвахме експресията на GFP в клетките, трансфектирани с ORF6, чрез флуоресцентна микроскопия и qRT-PCR, като открихме, че третирането с hIFN $\gamma$  разблокира транспорта на иРНК и възстановява нивото на експресия на GFP. Способността на цитокините да блокират ORF6 също се отразява в намаляването на негативните му ефекти върху репликацията на ДНК чрез намаляване на натрупаните хибриди между РНК и ДНК. Следователно нашите резултати подсказват, че hIFN $\gamma$  е обещаващ инхибитор на най-токсичния белтък на SARS-CoV-2.

### **Публикация В4.3**

**Miladinova, E., Lilkova, E., Krachmarova, E., Malinova, K., Petkov, P., Ilieva, N., Nacheva, G., Litov, L.** Heparan sulfate facilitates binding of hIFN $\gamma$  to its cell-surface receptor hIFNGR1, *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 9415, doi: [10.3390/ijms23169415](https://doi.org/10.3390/ijms23169415)

#### **Abstract**

Human interferon-gamma (hIFN $\gamma$ ) is a crucial signaling molecule with an important role in the initialization and development of the immune response of the host. However, its aberrant activity is also associated with the progression of a multitude of autoimmune and other diseases, which determines the need for effective inhibitors of its activity. The development of such treatments requires proper understanding of the interaction of hIFN $\gamma$  to its cell-surface receptor hIFNGR1. Currently, there is no comprehensive model of the mechanism of this binding process. Here, we employ molecular dynamics simulations to study on a microscopic level the process of hIFN $\gamma$ -hIFNGR1 complex formation in different scenarios. We find that the two molecules alone fail to form a stable complex, but the presence of heparan-sulfate-like oligosaccharides largely facilitates the process by both demobilizing the highly flexible C-termini of the cytokine and assisting in the proper positioning of its globule between the receptor subunits. An antiproliferative-activity assay on cells depleted from cell-surface heparan sulfate (HS) sulfation together with the phosphorylation levels of the signal transducer and activator of transcription STAT1 confirms qualitatively the simulation-based multistage complex-formation model. Our results reveal the key role of HS and its proteoglycans in all processes involving hIFN $\gamma$  signalling.

**Е. Миладинова, Е. Лилкова, Е. Кръчмарова, К. Малинова, П. Петков, Н. Илиева, Г. Начева, Л. Литов** Хепаран сулфатът подпомага свързването на hIFN $\gamma$  с неговия клетъчен рецептор hIFNGR1.

#### **Резюме**

Човешкият интерферон-гама (hIFN $\gamma$ ) е ключова сигнална молекула с важна роля в инициализацията и развитието на имунния отговор на организма. Въпреки това, неговата необичайна активност също е свързана с прогресията на множество аутоимунни и други заболявания, което определя нуждата от ефективни инхибитори на неговата активност. Разработването на такива лечения изисква правилно разбиране на взаимодействието на hIFN $\gamma$  с неговия клетъчен рецептор hIFNGR1. В момента няма изчерпателен модел на механизма на този процес на свързване. Тук използваме молекулярна динамика, за да изследваме на микроскопско ниво процеса на образуване на комплекса hIFN $\gamma$ -hIFNGR1 в различни условия. Установяваме, че двете молекули сами по себе си не могат да образуват стабилен комплекс, но присъствието на олигозахариди, подобни на хепаран сулфат, значително улеснява процеса, като стабилизира силно гъвкавите С-краища на цитокина, така и подпомага правилното позициониране на неговата глобула между рецепторните субединици. Антипролиферативен тест на клетки, лишени от клетъчно повърхностна сулфатизация на хепаран сулфат (HS), заедно с нивата на фосфорилиране на сигналния трансдуктор и активатор на транскрипцията STAT1, качествено потвърждава модела на образуване на комплекса, базиран на симулации. Нашите резултати разкриват ключовата роля на HS и неговите протеоглици във всички процеси, свързани със сигнализицията на hIFN $\gamma$ .

## **Публикация В 4.4**

**Litov, L., Petkov, P., Rangelov, M., Ilieva, N., Lilkova, E., Todorova, N., Krachmarova E, Malinova, K., Gospodinov, A., Hristova, R., Ivanov, I., Nacheva G.** Molecular Mechanism of the Anti-Inflammatory Action of Heparin. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(19):10730. doi: [10.3390/ijms221910730](https://doi.org/10.3390/ijms221910730)

### **Abstract**

Our objective is to reveal the molecular mechanism of the anti-inflammatory action of low-molecular-weight heparin (LMWH) based on its influence on the activity of two key cytokines, IFN $\gamma$  and IL-6. The mechanism of heparin binding to IFN $\gamma$  and IL-6 and the resulting inhibition of their activity were studied by means of extensive molecular-dynamics simulations. The effect of LMWH on IFN $\gamma$  signalling inside stimulated WISH cells was investigated by measuring its antiproliferative activity and the translocation of phosphorylated STAT1 in the nucleus. We found that LMWH binds with high affinity to IFN $\gamma$  and is able to fully inhibit the interaction with its cellular receptor. It also influences the biological activity of IL-6 by binding to either IL-6 or IL-6/IL-6R $\alpha$ , thus preventing the formation of the IL-6/IL-6R $\alpha$ /gp130 signalling complex. These findings shed light on the molecular mechanism of the anti-inflammatory action of LMWH and underpin its ability to influence favourably conditions characterised by overexpression of these two cytokines. Such conditions are not only associated with autoimmune diseases, but also with inflammatory processes, in particular with COVID-19. Our results put forward heparin as a promising means for the prevention and suppression of severe CRS and encourage further investigations on its applicability as an anti-inflammatory agent.

**Л. Литов, П. Петков, М. Рангелов, Н. Илиева, Е. Лилкова, Н. Тодорова, Е. Кръчмарова, К. Малинова, А. Господинов, Р. Христова, И. Иванов, Г. Начева,** Молекулен механизъм на противовъзпалителното действие на хепарина

### **Резюме**

Нашата цел е да разкрием молекуления механизъм на противовъзпалителното действие на нискомолекуления хепарин (LMWH) въз основа на неговото влияние върху активността на два ключови цитокина, IFN $\gamma$  и IL-6. Механизмът на свързване на хепарина с IFN $\gamma$  и IL-6 и последващото инхибиране на тяхната активност бяха изследвани чрез обширни симулации. Ефектът на LMWH върху сигнализацията на IFN $\gamma$  вътре в стимулирани WISH клетки беше изследван чрез измерване на неговата антипролиферативна активност и транслокацията на фосфорилиран STAT1 в ядрото. Установихме, че LMWH се свързва с висок афинитет с IFN $\gamma$  и е способен напълно да инхибира взаимодействието с неговия клетъчен рецептор. Той също влияе върху биологичната активност на IL-6, като се свързва както с IL-6, така и с IL-6/IL-6R $\alpha$ , като по този начин предотвратява формирането на комплекса IL-6/IL-6R $\alpha$ /gp130. Тези открития хвърлят светлина върху молекуления механизъм на противовъзпалителното действие на LMWH и подчертават неговата способност да влияе благоприятно върху състояния, характеризирани със свръхекспресия на тези два цитокина. Такива състояния са свързани не само с аутоимунни заболявания, но също и с възпалителни процеси, по-специално с COVID-19. Нашите резултати представят хепарина като обещаващо средство за превенция и потискане на тежки случаи на синдром на освобождаване на цитокини и насърчават по-нататъшни изследвания върху неговата приложимост като противовъзпалителен агент.

## **СПИСЪК РЕЗЮМЕТА НА АНГЛИЙСКИ И БЪЛГАРСКИ ЕЗИК НА НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ**

за участие в конкурса за академичната длъжност „доцент“  
по професионално направление 4.3. Биологически науки,  
научна специалност „Молекулярна биология“,  
обявен в ДВ бр. 24 от 18.06.2024г.,  
за нуждите на секция „Регулация на генната активност“  
на  
**гл. ас., д-р Елена Божидарова Кръчмарова**

**ПОКАЗАТЕЛ Г**

## **Публикация В 7.1**

**P. Ossowicz –Rupniewska, J. Klebeko, E. Świątek, J. Szachnowska, E. Janus, M. Rangelov, N. Todorova, S. G. Taneva, E. Krachmarova, M. Guncheva** Binding behavior of ibuprofen-based ionic liquids with bovine serum albumin: Thermodynamic and molecular modeling studies, *J. Mol. Liq.* **2022**, 360, 119367, doi:[10.1016/j.molliq.2022.119367](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119367)<sup>b</sup>

### **Abstract**

Ionic liquids based on active-pharmaceutical ingredients are an attractive alternative to classical drugs because they are able to overcome problems with drug solubility and polymorphism, hence bioavailability and as well as to propose different routes of administration and/or improve the pharmacokinetics of the drug.

In this manuscript, we report the synthesis of nine amino acid alkyl esters of ibuprofen [AAOR][Ibu]. The estimated half-maximum inhibitory constants toward murine embryonic fibroblasts and human dermal keratinocytes are in the millimolar range, which makes them practically not toxic. The conversion of ibuprofen into ionic liquids does not affect the binding affinity of ibuprofen to bovine serum albumin (BSA). Molecular modeling studies have shown that bulky cations such as L-PheOEt and L-PheOPr are able to bind effectively in three different BSA binding sites. On the other hand, smaller cations preferably bind to Sudhow's site I, the same that binds ibuprofen.

**P. Ossowicz –Rupniewska, J. Klebeko, E. Świątek, J. Szachnowska, E. Janus, M. Рангелов, Н Тодорова, С. Г. Танева, Е. Кръчмарова, М. Гунчева** Профил на свързване на йонни течности, базирани на ибупрофена, с говежди серумен албумин: Термодинамични и молекулярно биологично изследвания

### **Резюме**

Йонните течности, базирани на активни фармацевтични съставки са привлекателна алтернатива на класическите лекарства, тъй като са способни да преодолеят проблемите със разтворимостта и полиморфизма на лекарствата, а следователно и с тяхната бионаличност, както и да предложат различни начини на приложение и/или да подобрят фармакокинетиката на лекарството.

В тази статия показваме синтеза на девет аминокиселинни алкилни естери на ибупрофен [AAOR][Ibu]. Оценените полумаксимални инхибиторни константи спрямо миши ембрионални фибробласти и човешки дермални кератиноцити са в милимоларния диапазон, което ги прави практически нетоксични. Превръщането на ибупрофен в йонни течности не влияе върху афинитета на свързване на ибупрофен към говежди серумен албумин (BSA). Молекулното моделиране показва, че по-големите катиони като L-PheOEt и L-PheOPr могат да се свързват ефективно в три различни свързващи сайта на BSA. От друга страна, по-малките катиони предпочитат да се свързват към сайт Sudhow I - същият, който свързва ибупрофен.

## **Публикация В 7.2**

**J. Klebeko, P. Ossowicz -Rupniewska, E. Świątek, J. Szachnowska, E. Janus, S. G. Taneva, E. Krachmarova, M. Guncheva**, Salicylic acid as ionic liquid-formulation may have enhanced potency to treat some chronic skin diseases, *Molecules*, **2022**, 27(1), 216; doi: [10.3390/molecules27010216](https://doi.org/10.3390/molecules27010216);

### **Abstract**

In recent years, numerous studies have shown that conversion of conventional drugs in ionic liquid (IL) formulation could be a successful strategy to improve their physicochemical properties or suggest a new route of administration. We report the synthesis and detailed characterization of eight salicylic acid-based ILs (SA-ILs) containing cation non-polar or aromatic amino acid esters. Using *in vitro* assays, we preliminary evaluated the therapeutic potency of the novel SA-ILs. We observed that conversion of the SA into ionic liquids led to a decrease in its cytotoxicity toward NIH/3T3 murine embryo fibroblasts and human HaCaT keratinocytes. It should be mentioned is that all amino acid alkyl ester salicylates [AAOR][SA] inhibit the production of the proinflammatory cytokine IL-6 in LPS-stimulated keratinocytes. Moreover, keratinocytes, pretreated with [PheOMe][SA] and [PheOPr][SA] seem to be protected from LPS-induced inflammation. Finally, the novel compounds exhibit a similar binding affinity to bovine serum albumin (BSA) as the parent SA, suggesting a similar pharmacokinetic profile. These preliminary results indicate that SA-ILs, especially those with [PheOMe], [PheOPr], and [ValOiPr] cation, have the potential to be further investigated as novel topical agents for chronic skin diseases such as psoriasis and acne vulgaris.

**J. Klebeko, P. Ossowicz -Rupniewska, E. Świątek, J. Szachnowska, E. Janus, S. G. Taneva, E. Кръчмарова, М. Гунчева** Салициловата киселина, под формата на йонна течност, може да има повишена ефективност за лечение на някои хронични кожни заболявания

### **Резюме**

През последните години множество изследвания показаха, че преобразуването на конвенционалните лекарства в йонна течност (IL) може да бъде успешна стратегия за подобряване на техните физикохимични свойства или нов начин за приложение. Тук показваме синтеза и детайлната характеристика на осем йонни течности на база салицилова киселина (SA-ILs), съдържащи неполярни или ароматни аминокиселинни естери като катиони. Използвайки *in vitro* анализи, предварително оценихме терапевтичния потенциал на новите SA-ILs. Наблюдавахме, че преобразуването на SA в йонни течности води до намаляване на цитотоксичността ѝ към миши ембрионални фибробласти NIH/3T3 и човешки кератиноцити HaCaT. Трябва да се спомене, че всички аминокиселинни алкилни естер салицилати [AAOR][SA] инхибират продукцията на провъзпалителния цитокин IL-6 в LPS-стимулирани кератиноцити. Освен това, кератиноцитите, предварително третирани с [PheOMe][SA] и [PheOPr][SA], изглеждат защитени от LPS-индуцирано възпаление. Новите съединения проявяват сходен афинитет на свързване към говежди серумен албумин, сравним с SA, което предполага сходен фармакокинетичен профил. Тези предварителни резултати показват, че SA-ILs, особено тези с катиони [PheOMe], [PheOPr] и [ValOiPr], имат потенциал да бъдат допълнително изследвани като нови агенти за лечение на хронични кожни заболявания като псориазис и акне вулгарис.



### **Публикация В 7.3**

**P. Ossowicz, E. Janus, J. Klebeko, E. Świątek, P. Kardaleva, S. Taneva, E. Krachmarova, M. Rangelov, N. Todorova, M. Guncheva**, Modulation of the binding affinity of naproxen to bovine serum albumin by conversion of the drug into amino acid ester salts. *J. Mol. Liq.* 319 2020, 114283, doi: [10.1016/j.molliq.2020.114283](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114283)

#### **Abstract**

Naproxen (NAP) is one of the most widely prescribed non-steroidal anti-inflammatory drugs. Novel formulations of NAP aiming at better water-solubility, dosage, and the onset of action or new routes of application in order to minimize or prevent side effects of NAP are in the current interest of the pharmaceutical industry. Here, we report the synthesis, chemical, spectral and physicochemical characterization of a series of salts containing cations amino acid alkyl esters (AAE) and NAP anion, which potentially can be used as novel drug formulation. The [L-AAE][NAP] were obtained in three steps: preparation of the AAE hydrochlorides, neutralization of the hydrochlorides to the corresponding AAE, and formation of the target organic salts. All NAP derivatives, tested at a concentration as high as 100  $\mu\text{M}$ , exhibited no toxicity against murine macrophage cell line (RAW 264.7). The binding parameters and stoichiometry of [AAE][NAP]s to bovine serum albumin (BSA) are in the range of that estimated for the parent NAP. Only L-valine isopropyl ester naproxenate characterizes with about one order of magnitude lower binding affinity for BSA, which suggests a faster diffusion rate in the circulatory system than the parent NAP and other derivatives, and therefore faster reach to the target system. Using molecular modeling seven binding pockets of BSA were probed for their suitability to binds the cation and the anion and results are discussed in correlation with the obtained thermodynamic parameters for the binding of NAP derivatives to BSA.

**P. Ossowicz, E. Janus, J. Klebeko, E. Świątek, П. Кардалева, С. Танева, E. Кръчмарова, М. Рангелов, Н. Тодорова, М. Гунчева**, Модуляция на афинитета на свързване на напроксен към говежди серумен албумин чрез преобразуване на лекарството в аминокиселинни естерни соли

Напроксен (NAP) е едно от най-широко предписваните нестероидни противовъзпалителни лекарства. Новите форми на NAP са разработени с цел по-добра водоразтворимост, дозировка, начало на действие. или нови начини на приложение с цел минимизиране или предотвратяване на страничните ефекти на NAP и представляват текущ интерес за фармацевтичната индустрия. Тук докладваме за синтеза, химическата, спектралната и физикохимичната характеристика на серия соли, съдържащи катиони аминокиселинни алкилни естери (AAE) и NAP анион, които потенциално могат да бъдат използвани като нови лекарствени формулации. [L-AAE][NAP] бяха получени в три стъпки: подготовка на AAE хидрохлориди, неутрализация на хидрохлоридите до съответните AAE и формиране на целевите органични соли. Всички производни на NAP, тествани при концентрация до 100  $\mu\text{M}$ , не показаха токсичност срещу миши макрофагова клетъчна линия (RAW 264.7). Свързващите параметри и стехиометрията на [AAE][NAP] с говежди серумен албумин (BSA) са в диапазона на оценените за родителския NAP. Само изопропиловият естер на валин напроксенат се характеризира с приблизително един порядък по-ниска свързваща афинитетност към BSA, което предполага по-бърза дифузия в кръвоносната система от NAP и други производни, и следователно по-бързо достигане до целевата система. Чрез молекулно моделиране бяха изследвани седем свързващи джоба на BSA за тяхната способност да свързват катиона и аниона, а резултатите бяха обсъдени в корелация с получените термодинамични параметри за свързването на NAP производни към BSA.

## **Публикация Г7.4**

**E. Krachmarova, I. Ivanov, G. Nacheva**, Nucleic acids in inclusion bodies obtained from *E. coli* cells expressing human interferon-gamma. *Microbial Cell Factories*, **2020**, 19:139. doi: [10.1186/s12934-020-01400-6](https://doi.org/10.1186/s12934-020-01400-6)

### **Background**

Inclusion bodies (IBs) are protein aggregates in recombinant bacterial cells containing mainly the target recombinant protein. Although it has been shown that IBs contain functional proteins along with protein aggregates, their direct application as pharmaceuticals is hindered by their heterogeneity and hazardous contaminants with bacterial origin. Therefore, together with the production of soluble species, IBs remain the main source for manufacture of recombinant proteins with medical application. The quality and composition of the IBs affect the refolding yield and further purification of the recombinant protein. The knowledge whether nucleic acids are genuine components or concomitant impurities of the IBs is a prerequisite for the understanding of the IBs formation and for development of optimized protocols for recombinant protein refolding and purification. IBs isolated from *Escherichia coli* overexpressing human interferon-gamma (hIFN $\gamma$ ), a protein with therapeutic application, were used as a model.

### **Results**

IBs were isolated from *E. coli* LE392 cells transformed with a hIFN $\gamma$  expressing plasmid under standard conditions and further purified by centrifugation on a sucrose cushion, followed by several steps of sonication and washings with non-denaturing concentrations of urea. The efficiency of the purification was estimated by SDS-PAGE gel electrophoresis and parallel microbiological testing for the presence of residual intact bacteria. Phenol/chloroform extraction showed that the highly purified IBs contain both DNA and RNA. The latter were studied by UV spectroscopy and agarose gel electrophoresis combined with enzymatic treatment and hybridization. DNA was observed as a diffuse fraction mainly in the range of 250 to 1000 bp. RNA isolated by TRIzol<sup>®</sup> also demonstrated a substantial molecular heterogeneity. Hybridization with <sup>32</sup>P-labelled oligonucleotides showed that the IBs contain rRNA and are enriched of hIFN $\gamma$  mRNA.

### **Conclusions**

The results presented in this study indicate that the nucleic acids might be intrinsic components rather than co-precipitated impurities in the IBs. We assume that the nucleic acids are active participants in the aggregation of recombinant proteins and formation of the IBs that originate from the transcription and translation machinery of the microbial cell factory. Further studies are needed to ascertain this notion.

**E. Кръчмарова, И. Иванов, Г. Начева** Изолиране на нуклеинови киселини от включени телца от клетки на *E. Coli*, експресиращи човешки интерферон-гама

### **Контекст на изследванията**

Включените телца (IBs) са белтъчни агрегати в рекомбинантните бактериални клетки, съдържащи предимно целевия рекомбинантен белтък. Въпреки че е доказано, че IBs съдържат както функционални белтъци, така и белтъчни агрегати, прякото им приложение като фармацевтични препарати е възпрепятствано от тяхната хетерогенност и бактериални нечиствания. Поради тази причина, заедно с разтворимата експресия, IBs остават основният източник за производство на рекомбинантни белтъци с медицинско приложение. Качеството и съставът на IBs влияят върху добива, правилното нагъване и по-нататъшното пречистване на рекомбинантния белтък. Информация за това дали нуклеиновите киселини са съставни компоненти или съпътстващи примеси на IBs е предпоставка за разбирането на образуването на IBs и за разработването на

оптимизирани протоколи за повторно нагъване и пречистване на рекомбинантния белтък. Като модел бяха използвани IBs, изолирани от *Escherichia coli*, свръхекспресиращи човешки интерферон-гама (hIFN $\gamma$ ), белтък с терапевтично приложение.

### **Резултати**

IBs бяха изолирани при стандартни условия от клетките на *Escherichia coli* LE392 трансформирани с плазмид експресиращ hIFN $\gamma$ , и бяха допълнително пречистени чрез центрофугиране върху захарозна възглавница, последвано от няколко стъпки на озвучаване с ултразвук. Следващата стъпка беше промиване на IBs с неденатурираща концентрация на урея. Ефективността на пречистването беше оценена чрез SDS-PAGE гел електрофореза и паралелно микробиологично тестване за наличие на остатъчни цели бактериални клетки. Фенол/хлороформната екстракцията показва, че пречистените IBs съдържат както ДНК, така и РНК. Получената РНК беше изследвана чрез UV спектроскопия, агарозна гел-електрофореза, комбинирана с ензимно третиране, и хибридизация. ДНК беше наблюдавана като дифузна фракция основно в диапазона от 250 до 1000 bp. РНК, изолирана чрез TRIzol®, също демонстрира значителна молекулна хетерогенност. Хибридизацията с белязани с <sup>32</sup>P олигонуклеотиди показва, че IBs съдържат както рРНК, така и значителни количества иРНК на hIFN  $\gamma$ .

### **Заклучение**

Резултатите, представени в това изследване, показват, че нуклеиновите киселини могат да бъдат съставни компоненти, а не ко-преципитати в състава на IBs. Предполагаме, че нуклеиновите киселини са активни участници в агрегацията на рекомбинантните белтъци и образуването на IBs, които водят началото си от механизмите за транскрипция и трансляция на бактериалните клетки. Необходими са допълнителни изследвания, за да се потвърди тази теория.

## **Публикация Г7.5**

**M. Tileva, E. Krachmarova, S.G. Taneva, S. Todinova, K. Maskos, I. Ivanov, and G. Nacheva,** Buffer and Additive Thermofluor Screening of Wild Type Human Interferon Gamma and Mutant Proteins, *Thermochimica Acta*, **2017**, Vol. 654, 1-7. doi: [10.1016/j.tca.2017.05.003](https://doi.org/10.1016/j.tca.2017.05.003)

### **Abstract**

Human interferon gamma (hIFN $\gamma$ ) plays a key role in the immune system and therefore this cytokine has many current and future therapeutic applications. hIFN $\gamma$  is well known with its aggregation propensity and despite its clinical use, there is not much data about the stabilization of hIFN $\gamma$  preparations. Nowadays, substantial evidence indicates that the pathogenesis of many autoimmune diseases is related to overproduction of hIFN $\gamma$ . In this regard we have developed inactive hIFN $\gamma$  analogues to act as receptor antagonists of the endogenous hIFN $\gamma$ . Since they show even higher tendency for aggregation than the wild type protein, we designed two-step thermofluor screen of 61 buffer conditions to identify the best storage solution for all investigated proteins to be used in the form of research samples or biopharmaceuticals. Tris buffer pH 8.0 supplemented with NaCl and trehalose/betaine/glycerol as additives showed to be the most appropriate choice ensuring high solubility and thermal stability of both hIFN $\gamma$  and its mutants.

**М. Тилева, Е. Кръчмарова, С. Г. Танева, С. Тодинова, К. Маскос, И. Иванов и Г. Начева,** Проучване на буфери и добавки към буферите за съхранение на човешкия интерферон-гама и негови мутантни аналози

### **Резюме**

Човешкият интерферон гама (hIFN $\gamma$ ) играе ключова роля в имунната система и поради тази причина този цитокин се характеризира с много настоящи и бъдещи терапевтични приложения. hIFN $\gamma$  е добре известен със своята склонност към агрегация и въпреки клиничната му употреба, няма много данни за стабилизирането на препарати на hIFN $\gamma$ . В наши дни значителни доказателства сочат, че патогенезата на много аутоимунни заболявания е свързана със свръхпроизводството на hIFN $\gamma$ . В тази връзка ние разработихме неактивни hIFN $\gamma$  аналози, които да действат като рецепторни антагонисти на ендогенния hIFN $\gamma$ . Тъй като те показват дори по-висока тенденция към агрегиране от дивия тип белтък, ние създадохме двустепенен проучване на 61 буферни условия чрез термофлуор тест, за да идентифицираме най-добрите условия за съхранение на всички изследвани белтъци, които да се използва под формата на проби за анализ или биофармацевтици. Tris буферът с pH 8.0, допълнен с NaCl и трехалоза/бетаин/глицерол като добавки, се оказа най-подходящият избор, осигуряващ висока разтворимост и термична стабилност както на hIFN $\gamma$ , така и на неговите мутанти.

## **Публикация Г7.6**

**E. Krachmarova and G. Nacheva.** Production of functional recombinant human interferon-gamma by RTX CPD-fusion technology. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, 2020,[10.7546/crabs.2022.07.09](https://doi.org/10.7546/crabs.2022.07.09)

Human interferon-gamma (hIFN $\gamma$ ) is an important pleiotropic cytokine with therapeutic application. Recombinant hIFN $\gamma$  has been shown to be an effective pharmaceutical against a wide range of viral, immuno-suppressive diseases with promising prospects in cancer immunotherapy resulting in a strong increase in demand and price. The aim of this study was to develop an efficient method for production of soluble and active hIFN $\gamma$ . To this end a fusion gene encoding hIFN $\gamma$  and a C-terminally located His<sub>10</sub>-tagged RTX CPD was constructed by two-step PCR. The fusion gene was cloned in an expression vector under inducible promoter and expressed in different *E. coli* strains such as Rosetta (appropriate for expression of eukaryotic genes containing rare codons), and two chaperone containing strains – BL21(DE3)/pG-KJE8 and BL21(DE3)/pG-Tf2. The transformed bacteria were cultivated at 24°C to favour proper folding of the recombinant protein. Under these conditions the strain BL21(DE3)/pG-KJE8 was chosen as more suitable for production of soluble hIFN $\gamma$ . The latter was purified by Ni<sup>2+</sup>- based affinity chromatography, the peak fractions were subjected to affinity chromatography combined with a direct on-column digestion to release hIFN $\gamma$ , which was further purified by ion exchange chromatography. It is worth mentioning that this strategy, employing auto-cleaving and solubility-enhancing CPD tag, combined with on-column tag digestion was applied for the first time for production of hIFN $\gamma$ .

**Е. Кръчмарова и Г. Начева,** Методология за получаване на функционален рекомбинантен човешки интерферон-гама чрез сливането му с RTX CPD

### **Резюме**

Човешкият интерферон-гама (hIFN $\gamma$ ) е важен плейотропен цитокин с терапевтично приложение. Доказано е, че рекомбинантният hIFN $\gamma$  е ефективен лекарствен препарат срещу широк спектър от вирусни, имуносупресивни заболявания, с обещаваща перспектива в имунотерапията на рака, което води до силно увеличение на търсенето и цената. Целта на това проучване е да се разработи ефективен метод за производство на разтворим и активен hIFN $\gamma$ . За тази цел, чрез двустъпален PCR е конструиран слят ген, кодиращ hIFN $\gamma$  с С-крайно разположен His<sub>10</sub>- RTX CPD. Сетият ген беше клониран в експресионен вектор под индуцируем промотор и беше експресиран в различни щамове на *E. coli* като Rosetta (подходящи за експресия на еукариотни гени, съдържащи редки кодони) и два шаперонови щамове - BL21 (DE3)/pG-KJE8 и BL21 (DE3)/pG-Tf2. След трансформация, клетъчните култури бяха култивирани при 24 °С, за да се благоприятства правилното нагъване на рекомбинантния белтък. При тези условия, щамът BL21 (DE3)/pG-KJE8 беше избран като по-подходящ за производството на разтворим hIFN $\gamma$ . Целевия белтък беше пречистен чрез Ni<sup>2+</sup>-афинитетна хроматография, пиковите фракции бяха обединени и подложени на афинитетна хроматография, комбинирана с директна протеолиза на His<sub>10</sub>- RTX CPD на колоната, за да се генерира hIFN $\gamma$  с нативен С-край. hIFN $\gamma$  беше допълнително пречистен чрез йонообменна хроматография. Важно е да се отбележи, че тази стратегия, използваща автопротеолиза на CPD тага, който води до повишаване на разтворимостта, комбинирана с протеолиза на слетия партньор върху колона, беше приложена за първи път за производство на hIFN $\gamma$ .

## **Публикация Г7.7**

**E. Lilkova, P. Petkov, N. Ilieva, E. Krachmarova, G. Nacheva, L. Litov.** Molecular modeling of the effects of glycosylation on the structure and dynamics of human interferon-gamma. *J Mol Model*, **2019**, 25:127. [10.1007/s00894-019-4013-8](https://doi.org/10.1007/s00894-019-4013-8)

### **Abstract**

Natural hIFN $\gamma$  is a glycoprotein with two N-glycosylation sites in each monomer chain, which are independently and differentially glycosylated. Although glycosylation is not necessary for the activity of the cytokine, it was proposed that it protects the cytokine from proteolytic degradation and thus extends its circulatory half-life. Here, we report the development of model structures of glycosylated full-length native hIFN $\gamma$  homodimers. Our aim is to shed light on the mechanism through which glycosylation preserves the integrity of the cytokine molecule. To this end, we employ molecular dynamics simulations to study the interaction of the carbohydrate chains with the receptor-binding sites in the cytokine and with its flexible highly positively charged C-termini. The glycans interact primarily with the globular part of the protein, but also occasionally form contacts with the solvent-exposed and sensitive to proteases C-terminal tails. We show that the glycans restrict the C-termini wagging motion into the solvent, limit their flexibility and keep them closer to the  $\alpha$ -helical globule of hIFN $\gamma$ , thus possibly protecting them from proteolytic processing.

**Е. Лилкова, П. Петков, Н. Илиева, Е. Кръчмарова, Г. Начева, Л. Литов,** Молекулно моделиране на ефектите от гликозилиране върху структурата и динамиката на човешкия интерферон-гама

### **Резюме**

Естественият hIFN $\gamma$  е гликопротеин с две места за N-гликозилиране във всяка мономерна верига, които подлежат на независимо и диференциално гликозилиране. Въпреки че гликозилирането не е необходимо за активността на цитокина, се предполага, че то предпазва цитокина от протеолитично разграждане и по този начин удължава неговия циркуляционен полуживот. В тази работа представяме разработването на моделни структури на гликозилиран нативен хомодимер на hIFN $\gamma$  с пълна дължина. Целта ни е да изясним механизма, чрез който гликозилирането запазва целостта на цитокиновата молекула. За тази цел използваме молекулно динамични симулации, за да изследваме взаимодействието на въглехидратните вериги с рецептор-свързващите места в цитокина и с неговите гъвкави и силно положително заредени С-краища. Гликаните взаимодействат предимно с глобуларната част на белтъка, но също така понякога образуват контакти с изложените на разтворителя и чувствителни към протеази С-крайни опашки. Ние показваме, че гликаните ограничават движението на С-края в разтворителя, ограничават тяхната гъвкавост и ги държат по-близо до  $\alpha$ -спиралната глобула на hIFN $\gamma$ , като по този начин вероятно ги предпазват от протеолитично разграждане.

## **Публикация Г7.8**

**Lilkova E., Petkov P., Krachmarova E., Ilieva N., Litov L.** Modelling the Interaction of the hIFN $\gamma$  C-terminal Peptide and HS-derived Octasaccharides, *Studies in Computational Intelligence*, 2022, Springer, Cham., **Accepted**

### **Abstract**

Human interferon  $\gamma$  (hIFN $\gamma$ ) is an important pleiotropic cytokine that binds to a specific high-affinity cell-surface receptor complex to mediate its cellular effects. In addition, it is known, that hIFN $\gamma$  also binds with high affinity to heparin and heparan sulfate and that the binding occurs mainly through the protein's C-terminus. This interaction affects all physico-chemical properties of the cytokine, including its affinity towards its receptor, which could be exploited as a strategy for the development of potential hIFN $\gamma$  inhibitors. Here we report our efforts at developing an *in silico* protocol for deriving optimal heparin/heparan sulfate-derived oligosaccharide sequences in terms of net charge and sulfate distribution, that lead to the most favourable and stable binding to a peptide, encompassing the C-terminus of hIFN $\gamma$ . The developed computational protocol is tested on the interaction of the cytokine's C-terminal peptide and a specific octasaccharide sequence.

**Е. Лилкова, П. Петков, Е. Кръчмарова, Н. Илиева, Л. Литов,** Моделиране на взаимодействието на С-крайния пептид на hIFN $\gamma$  и производни на HS октазахариди

### **Резюме**

Човешкият интерферон  $\gamma$  (hIFN $\gamma$ ) е важен плейотропен цитокин, който се свързва с висок афинитет със специфичен клетъчно-повърхностен рецепторен комплекс, за да медира клетъчните си ефекти. В допълнение е известно, че hIFN $\gamma$  също се свързва с висок афинитет към хепарин и хепаран сулфат и че свързването става главно през С-края на протеина. Това взаимодействие засяга всички физико-химични свойства на цитокина, включително афинитетът му към неговия рецептор, което може да се използва като стратегия за развитието на потенциални инхибитори на hIFN $\gamma$ . Тук докладваме нашите усилия за разработване на *in silico* протокол за извличане на оптимални хепарин/хепаран сулфат-получени олигозахаридни последователности по отношение на нетния заряд и разпределението на сулфатните групи, които водят до най-благоприятното и стабилно свързване с пептид, обхващащ С-края на hIFN $\gamma$ . Разработеният изчислителен протокол е тестван върху взаимодействието на С-терминалния пептид на цитокина и специфична октазахаридна последователност.

## **Публикация Г7.9**

**Lilkova E., Pieva N., Petkov P., Krachmarova E., Nacheva G., Litov L.** Molecular Dynamics Simulations of His 6-FLAG-hIFN  $\gamma$  Fusion Glycoproteins. In: Georgiev I., Kostadinov H., Lilkova E. (eds) *Advanced Computing in Industrial Mathematics. Studies in Computational Intelligence*, 2021, vol 961. Springer, Cham. doi: [10.1007/978-3-030-71616-5\\_23](https://doi.org/10.1007/978-3-030-71616-5_23)

### **Abstract**

Human interferon-gamma (hIFN $\gamma$ ) is a key immunomodulating secretory glycoprotein. Although glycosylation is not necessary for its activity, it does affect the physico-chemical properties of the cytokine. Recently, a technology was developed for the secretory expression of glycosylated hIFN $\gamma$  and its highly prone to aggregation mutant K88Q in insect cells. In addition, the proteins were labeled with specific tag peptides added to their N-termini. It was experimentally observed, that the obtained fusion proteins have significantly reduced biological activity and when glycosylated, they were resistant to enterokinase action and the tag could not be removed. Here we report the development of *in silico* models of glycosylated His6-FLAG-hIFN $\gamma$  fusion proteins and employ long-scale molecular dynamics (MD) simulations to explain these unexpected experimental results and to study in detail the effect of the tags and glycosylation on the structure and dynamics of the fusion glycoproteins.

**Е. Лилкова, Н. Илиева, П. Петков, Е. Кръчмарова, Г. Начева, Л. Литов,** Молекулно-динамични симулации на слетия гликопротеин His6-FLAG-hIFN $\gamma$

### **Резюме**

Човешкият интерферон-гама (hIFN $\gamma$ ) е ключов имуномодулиращ секреторен гликопротеин. Въпреки че гликозилирането не е необходимо за неговата активност, то засяга физико-химичните свойства на цитокина. Наскоро беше разработена технология за секретирuема експресия на гликозилиран hIFN $\gamma$  и неговият силно склонен към агрегация мутант K88Q в клетки на насекоми. В допълнение, протеините бяха белязани със специфични маркиращи пептиди, добавени към техните N-краища. Експериментално беше наблюдавано, че получените слети протеини имат значително намалена биологична активност и когато са гликозилирани, те са устойчиви на ентерокиназно действие и маркерът не може да бъде отстранен. Тук ние докладваме за разработването на *in silico* модели на гликозилирани слети протеини His6-FLAGhIFN $\gamma$  и използваме дълги молекулно-динамични симулации (МД), за да обясним тези неочаквани експериментални резултати и да проучим подробно ефекта на маркерите и гликозилирането върху структурата и динамика на слетите гликопротеини.



## **Публикация Г7.9**

**M. Rangelov, N. Todorova, P. Petkov, T. Nedeva, N. Ilieva, E. Lilkova, E. Krachmarova, L. Litov**, In silico screening for potential inhibitors of the SARS-CoV-2 helicase Nsp13, Studies in Computational Intelligence, 2024, Accepted

### **Abstract**

It is recognized that the SARS-CoV-2 virus adeptly evades the host-cell immune defense. Nsp13, the SARS-CoV-2 helicase, plays a crucial role in this evasion process. Targeting this protein is a central component in developing strategies to counteract viral invasion, especially as the extremely high similarity between SARSCov and SARS-CoV-2 Nsp13 (difference by only one amino acid residue) implies that potential inhibitors of the helicase could be effective against future strains. In this study, we present the outcomes of an extensive in silico screening for potential inhibitors of this viral protein among known natural and synthetic substances. Despite revealing an unknown antiviral mechanism of action for Ritonavir (Norvir), the evaluated scores, even for approved medications, suggest designing Nsp13 inhibitors in the class of peptide-based pharmaceuticals as a promising strategy.

**М. Рангелов, Н. Тодорова, П. Петков, Т. Недева, Н. Илиева, Е. Лилкова, Е. Кръчмарова, Л. Литов**. In silico скрийнинг на потенциални инхибитори на хеликазата на SARS-CoV-2 Nsp13

### **Резюме**

Знае се, че вирусът SARS-CoV-2 умело избягва имунната защита на клетките на гостоприемника. Nsp13, хеликазата на SARS-CoV-2, играе ключова роля в този процес. Таргетирането на този белтък е основен компонент в разработването на стратегии за противодействие на вирусната инвазия, особено заради изключително високата прилика между Nsp13 на SARSCov и SARS-CoV-2 (разлика само в една аминокиселина) която предполага, че потенциалните инхибитори на хеликазата могат да бъдат ефективни срещу бъдещи щамове. В това изследване представяме резултатите от обширен in silico скрийнинг за потенциални инхибитори на този вирусен белтък сред известни природни и синтетични вещества. Въпреки че разкриваме неизвестен антивирусен механизъм на действие на Ритонавир (Norvir), оценените резултати, дори за одобрени медикаменти, предполагат, че проектирането на инхибитори на Nsp13 в класа на пептид-базирани фармацевтични продукти е обещаваща стратегия.