

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Ива Угринова, доктор - Институт по Молекулярна биология-БАН

**Относно:** конкурс за доцент, публикуван в Държавен вестник бр. 52/18.06.2024 г..

### Обща част:

В конкурса единственият кандидат подал документи е **гл. ас. д-р Елена Божидарова Кръчмарова**, Секция „Регулация на генната активност”, Институт по молекулярна биология „Акад. Р. Цанев“ (ИМБ) –БАН.

Прегледът на документите показва, че процедурата по разкриване и обявяване на конкурса е спазена и в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ (Закон за развитие на академичния състав в Република България). В подробната справка за изпълнение на минималните изисквания по показател В са представени 4 публикации с ранг Q1, които гарантират изискуемите **100** точки. По показател Г са представени 10 публикации и два патента, които осигуряват **230** точки, при изискуеми 220. По показател Д са изчислени **182** точки от цитирания, при изискуеми 60 точки, а за показател Е – кандидатката събира близо 172 точки, въпреки, че този показател не се отчита в конкурс за доцент.

### Биографична справка:

Гл. ас. д-р Елена Кръчмарова започна работа като дипломант към секция „Регулация на генната активност” в Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев” (ИМБ-БАН) през 2010 г. под ръководството на акад. Иван Иванов и проф. Геновева Начева. През 2011 г. успешно завършва магистърската си степен по „Биотехнологии“ в Химикотехнологичен и Металургичен Университет – София (ХТМУ-София) и веднага постъпи на работата в ИМБ като асистент. Няколко години по-късно започна и задочна докторантура в ИМБ, която успешно защити през 2018 г. (Научна специалност 04.02.01.). В същата година Елена печели конкурс за гл. ас. в секция „Регулация на генната активност”, Институт по молекулярна биология, където работи и до този момент. Доктор Кръчмарова е отличавана на няколко пъти с престижни национални награди - наградена е от Съюза на учените в България с диплом от конкурса за високи научни постижения, направление „Научни постижения в защитени докторски дисертации от учени до 35-годишна възраст“, а в следващите две години двукратно е удостоявана с награда „Еврика“ за постижения в науката за 2018 г. и за 2020 г.

### Наукометрични показатели:

Кандидатката се явява в конкурса с 14 публикации и 2 патента. Работите и описват оригинални научни резултати публикувани в авторитетни международни издания с импакт фактор. По група показатели В Елена представя 4 публикации всички с ранг Q1, от които събира ИФ 22.308. По група показатели Г са представени 10 публикации, от тях – 4 са с ранг Q1, една е с ранг Q2, 2 публикации с ранг Q3 и 2 публикации с ранг Q4, три от публикациите и са без ИФ, но в издания със SJR. От 11-те работи с ИФ кандидатката събира ИФ 24.582. Тук трябва да се отбележат и двата патента, които кандидатката представя единия е европейски, а другия в Българското патентно ведомство. С тези научни постижения д-р Кръчмарова напълно

покрива, но и значително надхвърля Минималните изисквания на ИМБ (БАН) за "Доцент". Петнадесет от трудовете на Елена са публикувани в списания с импакт фактор, чиято обща стойност според ISI Web of Knowledge, Journal Citation Reports Science Edition, за съответната година, в която работите са излезли е **48.89**. За високата стойност на публикуваните резултати говорят, както имената на списанията, така и международния отзвук – според **Web of Knowledge** са забелязани 92 цитата, без самоцитирания. H – индексът на кандидата е **6**. В четири от 18 статии (23 %), с които д-р Кръчмарова участва в конкурса тя е водещ (първи автор) изследовател, което изразява личния и принос в проведената изследователска дейност.

### **Оценка на основните научни приноси:**

Основните оригинални резултати в работите на д-р Кръчмарова на база предоставените материали (ще използвам номерацията от списъка на научни публикации) могат да бъдат систематизирани и представени в три основни тематични направления:

#### **1. Изследване на молекулните механизми на действие на белтъците ORF6 и Nsp13 на вируса SARS-CoV-2 в инфектираните клетки. Подходи за овладяване на цитокиновата буря.**

Вирусът SARS-CoV-2 блокира вродения имунен отговор на инфектираната клетка като прекъсва експорта на иРНК от ядрото в цитоплазмата и блокира интерфероновите сигнални пътища. Вирусните белтъци на SARS-CoV-2 атакуват множество клетъчни белтъци, които са участници в имунната сигнализация. Изследванията на Елена се фокусират върху молекулните механизми на действие на белтъците ORF6 и хеликазата Nsp13 на вируса SARS-CoV-2 и начините за контролиране на цитокиновата буря.

ORF6 е идентифициран като най-токсичният белтък на вируса SARS-CoV-2, с недобре изяснен механизъм на токсичност. Проведените *in silico* (компютърни симулации) и *in vitro* (експериментални) изследвания (**B4.1**) показват, че този белтък блокира експорта на новосинтезирани иРНК от ядрото в цитоплазмата чрез свързване с клетъчния белтък RAE1, участник в този транспортен процес. Това води до имобилизация на RAE1 върху различни вътреклетъчни мембрани (ендоплазмен ретикулум, апарат на Голджи и др.), което блокира важни клетъчни функции, включително имунния отговор. В резултат на това, клетката не може ефективно да предотврати вирусното размножаване. Установено е също, че тази блокада води до натрупване на ДНК-РНК хибриди (R-бримки), което причинява репликационен стрес и компрометира прогресията на клетъчния цикъл. Следва създаване на 3D модел на ORF6, чрез който е установено, че пептиди на базата на hIFN $\gamma$  ефективно инхибират неговата функция, формирайки стабилни комплекси с него. Това възстановява нормалната функция на интерфероновите пътища и прогресията на клетъчния цикъл. Тези резултати за първи път показват механизма на действие на ORF6 и предлагат инхибитор (hIFN $\gamma$ ), който може да бъде използван за бъдещи терапевтични цели (**B4.2**).

Nsp13 е хеликаза, която разплита двойноверижна РНК и играе ключова роля в репликацията и транскрипцията на вирусния геном. Проведени са структурни и биодинамични анализи на Nsp13 и са идентифицирани два специфични свързващи джоба, които могат да служат като мишени за инхибитори. Чрез докинг тестове с разнообразни природни и синтетични съединения, се установява, че Retonavir, съставка на лекарството Norvir, показва

висок афинитет към тези свързващи джобове (**Г7.10**). Това дава основание на екипа на д-р Кръчмарова да смята, че Retonavir може да бъде използван като инхибитор на Nsp13, което е стъпка към разработването на терапевтични средства за борба с COVID-19.

Основни приноси:

- Открит е механизмът на действие на ORF6, водещ до репликационен стрес.
- Показана е ефективността на hIFN $\gamma$  като първия докладван инхибитор на ORF6.
- Открит е механизъм за инхибиране на Nsp13 с активната съставка Retonavir.
- Разработена е стратегия за използване на хепарин като инхибитор на цитокиновата буря.

**2. Изследване на факторите, влияещи върху биологичната активност на човешкия гама-интерферон (hIFN $\gamma$ ) и продукцията му като рекомбинантен белтък. Намиране на подходи за инхибиране на свръхекспресията на hIFN $\gamma$  при някои заболявания.**

hIFN $\gamma$  е секретирем гликопротеин, важен за имунния отговор. Гликозилирането на двата центъра (Asn25 и Asn97) е от значение за стабилността и секрецията му, но не повлиява неговата активност (**Г7.7**). Изследванията на д-р Кръчмарова с **молекулно-динамични симулации** показаха, че гликаните взаимодействат със С-краищата на белтъка и увеличават неговата стабилност. Установено е, че гликозилирането намалява ентропията и улеснява формирането на биологично активни скъсени форми в кръвния поток. Това е първото изследване, което предлага **моделни структури на гликозилирани хомодимери** на hIFN $\gamma$  (**Г7.9**). Установено е също, че при експресията на hIFN $\gamma$  в клетки на **E. coli**, той образува **включени телца (IBs)**, съдържащи нуклеинови киселини, които вероятно участват в агрегацията на белтъка чрез електростатични взаимодействия. Тези резултати са важни за подобряване на методите за пречистване на рекомбинантни белтъци, и че **отстраняването на нуклеиновите киселини** в началните етапи на ренатурацията на белтъците може да намали образуването на агрегати и да подобри биологичната активност на белтъците (**Г7.4**). Нещо повече разработен е и **метод за експресия и пречистване** на hIFN $\gamma$  и негови мутанти в разтворима форма в **цитозолната фракция на E. coli**, използвайки **протеаза RTX**. Този метод осигурява висока чистота и добив, което го прави приложим за производство на терапевтични протеини (**В7.6**).

Накрая, е проведено систематично изследване на **буфери и добавки** за стабилизиране на hIFN $\gamma$  и неговите мутанти. Описано е, че **Tris буфер с NaCl и трехалоза** е оптимален за дългосрочно съхранение и запазване на биологичната активност на белтъците, което е от значение за формулиране на фармацевтични продукти на базата на hIFN $\gamma$  (**Г7.5**).

Основни приноси:

- Първи публикувани модели на гликозилирани хомодимери на hIFN $\gamma$ .
- Открит механизъм за протеолитична резистентност на N-крайния FLAG пептид.
- Изяснена роля на нуклеиновите киселини в образуването на включени телца.
- Разработен метод за експресия и пречистване на hIFN $\gamma$  в разтворима форма.
- Оптимизиран буфер за стабилност на hIFN $\gamma$  и неговите мутанти.

### 3. Термодинамика на взаимодействие на йонни течности с транспортния белтък серумен албумин.

Йонните течности са „моделируеми“ разтворители, чиито свойства (разтворимост, плътност, вискозитет и др.) могат да бъдат адаптирани чрез промени в катиона или аниона. Те предлагат предимства като по-добра разтворимост на лекарства, разнообразни пътища на администриране и подобрена фармакокинетика. Йонните течности, базирани на активни лекарствени вещества, могат да повишат ефективността на лечението и да намалят страничните ефекти чрез селективно взаимодействие с биологични молекули.

В изследванията на Елена описани в публикации Г7.1-3 е анализирано взаимодействието на йонни течности, базирани на лекарства, с говежди серумен албумин (BSA), модел за човешкия серумен албумин. Оценена е стабилността на лекарствените комплекси, местата на свързване и поведението им при различни условия. Йонни течности, базирани на ибупрофен, показват фармакокинетичен профил, сходен с този на ибупрофена, но с подобрена стабилност и разтворимост (Г7.1). Йонни течности, базирани на салицилова киселина, демонстрират ниска цитотоксичност и способност за инхибиране на IL-6 при стимулирани кератиноцити, като показват по-висок афинитет към BSA, което предполага по-ефективно лечение на кожни заболявания (Г7.2). Синтезирани и анализирани са и естерни соли на напроксен, които показват висок афинитет към BSA, като термодинамичният анализ демонстрира как естерификацията може да повлияе на свързването на лекарствата (Г7.3).

Основни приноси:

- Установен е потенциалът на йонните течности да подобрят разтворимостта и стабилността на ибупрофен.
- Създадени са йонни течности на базата на салицилова киселина с по-добра ефективност за лечение на кожни заболявания.
- Демонстрирано е, че естерификацията на напроксен може да повлияе на фармакокинетичните му свойства, с потенциал за нови лекарствени формулировки.

Освен оригинални научни резултати в конкурса д-р Кръчмарова включва и научно-приложните си разработки намерили израз в два патента европейски (EP 3381935) и български (BG 67190 B1), попадащи в **показател Г9**. Съществуват сериозни научни доказателства, че свръхекспресията на hIFN $\gamma$  играе ключова роля в патогенезата на много автоимунни заболявания, трансплантната атеросклероза и сърдечно-съдовите заболявания. Иновативният подход, разработен от екипа, в който Елена участва, се състои в таргетна терапия с антагонисти на hIFN $\gamma$ , които имат запазен афинитет към клетъчния рецептор, но силно намалена биологична активност. Тези аналози ще се конкурират с ендогенния hIFN $\gamma$  за рецептора му, но без да активират вътреклетъчния сигнален път, което ще доведе до намаляване на активността на ендогенния hIFN $\gamma$ . Предимството на този подход е, че пациентите няма да бъдат подлагани на имunosупресия или допълнителни цитокини, запазвайки нормалните имунни функции. Доколкото ни е известно, антагонисти на hIFN $\gamma$  не са били разработвани досега. Двата патента, защитават мутантни аналози на hIFN $\gamma$ , които са съкратени с 5 аминокиселинни остатъка от C-

края и включват специфични аминокиселинни замени: K88Q, K88Q\_T27Y и K88Q\_D41N. Тези мутации подобряват стабилността на белтъка и запазват или дори засилват афинитета към рецептора, докато биологичната активност е силно намалена (2 до 4 порядъка). Тези мутанти могат да бъдат потенциални кандидати за лекарствени препарати за лечение на заболявания, свързани със свръхекспресията на hIFN $\gamma$ .

Основни приноси:

- Разработен е иновативен подход за таргетна терапия с антагонисти на hIFN $\gamma$ .
- Патентовани са мутантни аналози на hIFN $\gamma$  с намалена активност и запазен афинитет към рецептора.
- Мутантите показват потенциал като кандидати за терапевтични препарати срещу автоимунни и сърдечно-съдови заболявания.

**Като цяло оценявам приносите на кандидатката като научни и научно-приложни, свързани най-вече с биологията и ролята на човешкия гама-интерферон в редица патологии, както и в търсене на иновативни, базирани на рекомбинантните ДНК технологии, начини за неговото регулиране.**

**Оценка по допълнителни показатели:**

**Проекти и финансова обезпеченост**

Проектната активност на гл. ас. д-р Елена Кръчмарова се изразява в участие в 9 национални и 2 международни научни проекта. Ръководила е 1 научен проект финансиран от програмата за

подпомагане на млади учени и докторанти на БАН. В момента Участва в 3 научни проекта финансирани от Фонд научни изследвания и Министерство на финансите.

В заключение мога да кажа, че проектната активност на Елена е повече от добра и тя е допринесла за общото благосъстояние на ИМБ.

**Участия на международни и национални форуми**

Кандидатката има над 10 участия с доклади в различни национални и международни научни форуми и в повече от 20 с постерни презентации. През 2023 г. Елена беше поканен лектор на 47-мия конгрес на FEBS, който се проведе в Тур, Франция и направи отлична презентация.

**Учебна дейност**

Доктор Кръчмарова е била консултант в изготвянето на 2 магистърски дипломни работи (едната на студент по програмата „Еразъм“) към ХТМУ-София.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

Считам, че краткият анализ на статиите, с които Елена Кръчмарова се представя, убедително показват високата научна стойност на получените резултати. Фактът, че 8 от 14

публикации, с които тя се представя в конкурса са с ранг Q1 са достатъчен аргумент за положителна оценка. Безспорен е фактът, че кандидатката има качествата на изграден научен работник, с аналитично мислене, ентузиазъм и отдаденост. Анализът на материалите, с които Елена Кръчмарова се представя, показват високата научна стойност и оригиналност на разработваните тематики. От личните ми впечатления, които се базират на съвместната ни работа по национална програма „Биоактивмед“ на МОН, мога да заключа, че Елена е отличен специалист, който съчетава умения да работи в екип, да обучава по-младите си колеги и да съветва и подпомага по-опитните. Доктор Кръчмарова е добър учен и прекрасен и обичан колега, който заслужава да заеме длъжността „доцент“ в Институт по молекулярна биология – БАН. Считаю доктор Кръчмарова за напълно достойна да заеме академичната длъжност доцент в ИМБ.

Дата: 15.10.2024 г.

/Проф. д-р Ива Угринова/