

РЕЦЕНЗИЯ

от д-р Мая Христова Гунчева, доцент в Институт по органична химия
с Център по фитохимия-БАН

върху материалите, представени за участие в конкурс
за заемане на академичната длъжност „Доцент“

в Институт по органична химия с Център по Фитохимия (ИОХЦФ), БАН

по област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално
направление 4.2 Химически науки, научна специалност „Биоорганична химия, химия на
природните и физиологично активни вещества

В конкурса за „Доцент“, обявен в Държавен вестник брой 43 от 31.05.2019 г и на интернет-страницата на ИОХЦФ-БАН като единствен кандидат в конкурса участва гл. ас. д-р Людмила Георгиева Велкова, лаборатория „Химия и биофизика на белтъци и ензими“ към ИОХЦФ-БАН.

1. Общо представяне на получените материали

В определения по процедурата срок единствения участник в конкурса гл. ас. д-р Людмила Георгиева Велкова е представила пълен комплект от изискуемите материали на хартиен и електронен носител, които напълно отговарят на Правилника за развитие на академичния състав на ИОХЦФ. От приложените документи се вижда, че кандидатът напълно покрива минималните национални изисквания и изискванията на ИОХЦФ по всички показатели за заемане на академичната длъжност „Доцент“ по направление 4.2 Химически науки.

Гл. ас д-р Велкова участва в конкурса с 24 научните публикации, съавтор е на 1 учебник и 1 учебно пособие. Броят на забелязаните цитирания на публикациите на д-р Велкова, които не са били включени в предходни конкурса за заемане на академичната длъжност „Главен асистент“ и процедурата за заемане на научната степен „Доктор“ е 152. Кандидатът е участник в 33 проекта, от които 15 са с Национално финансиране, 2 проекта за изграждане на Център по компетентност, 1 Национална научна програма и 15 проекта по двустранни сътрудничество и/или проекти с външно за страната финансиране. Гл. ас. д - р Велкова е съавтор на 4 патента, регистрирани в България. В съавторство с колектива в който работи д-р Велкова е наградена с 10 престижни отличия за иновативни изследвания и разработки внедрени в индустрията. Представени са копия на статиите и патентите, материали от конференции и списъци на участията ѝ в проекти, цитати и получените награди.

2. Кратки биографични данни на кандидата

Гл. ас д-р Людмила Велкова се дипломира през 1988 г като магистър по специалността „Органична и аналитична химия” в Химически факултет (сега Факултет по химия и фармация) на Софийски университет „Св. Климент Охридски”. Скоро след това тя започва работа в ИОХЦФ-БАН, отначало като химик, а от 2003 г като асистент в лаборатория „Химия и биофизика на белтъци и ензими”. През м. юли 2009 г тя е зачислена като докторант на самостоятелна подготовка в ИОХЦФ-БАН. През 2013 г. д-р Велкова успешно защитава дисертацията на тема: „Структура и функция на въглехидратните вериги на хемоцианин, изолиран от морски охлюв *Rapana venosa*.”. От м. септември 2013 г след отлично представяне на проведен конкурс д-р Велкова заема академичната длъжност „Гл. асистент” в ИОХЦФ-БАН, където работи и до сега. Основните научни интереси на д-р Велкова са в областта на изолиране, структурно и биофизично охарактеризиране на протеини и пептиди с биологична активност. В рамките на установени сътрудничества и двустранни проекти на колектива в който работи, д-р Велкова е имала възможност да реализира над 9 краткосрочни специализации в Тюбингенският университет (Германия), Университета в Падуа (Италия), Университета в Гент (Белгия) и Института по вирусология към Украинската Академия на науките.

По време на дългогодишната си кариера в ИОХЦФ-БАН, многобройните специализации в чужбина и работата ѝ по впечатляващ брой проекти д-р Велкова е усвоила класически и съвременни методи за изолиране и охарактеризиране на протеини и гликопротеини и се е изградила като специалист в областта на „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества”.

3. Обща характеристика на дейностите на кандидата

Осем от публикациите, с които кандидата се явява в конкурса заместват хабилитационния труд (Показател В-4), в шест от тях д-р Велкова е първи автор, в две – втори автор, а на три от статиите е посочена като автор за кореспонденция. Всички публикации по показател В-4 са публикувани в списания, реферирани и индексирани в световноизвестните научни бази данни Web of Science и/или Scopus и са с Q2–3бр, Q3–2 бр и Q4–3 бр.

За участие в конкурса са включени допълнително и шестнадесет публикации, които са извън хабилитационния труд (Показател Г-7). В две от тези публикации д-р Велкова е първи автор и в две – втори. Статиите, според рейтинга на списанието в което са публикувани са разпределени както следва: един брой в списание с Q1, шест броя в списание с Q2, три броя в списание с Q3, два броя в списание с Q4, а четири от статиите са в нереферирани списания или сборници от конференции.

Според научната база данни Scopus наукометричния показател индекс на Хирш (h-фактор) на кандидата, след като са изключени самоцитирания и цитирания от други съавтори е 7.

Д-р Велкова е съавтор на учебник със заглавие „Същност и биологично приложение на маспектрометрията“ и учебно помагало с примери и упражнения към него, предназначени за студенти, изучаващи различни биологични дисциплини като протеомика, метаболомика, биоинформатика, медицина и др.

Основните обекти на изследванията на кандидата са хемоцианини, изолирани от хемолимфата на членестоноги (артроподи) и мекотели (молюски) и биологично-активни пептиди, изолирани от слюзта на градински охлюви.

По-голяма част от изследванията, описани в статиите заместващи хабилитационния труд (Показател В-4) са фокусирани върху изолиране, пречистване, структурно и биофизично охарактеризиране на хемоцианини от различни източници, изолиране на гликаните, изграждащи структурните им субединици и определяне на въглехидратните им структури и центровете на гликозилиране. Проведените изследвания са комплексни и задълбочени като за целта са използвани както класически така и най-съвременни методи за изолиране и охарактеризиране на протеини и гликопротеини. Поставената задача е трудна и амбициозна, предвид сложната мултимерна структура на хемоцианините.

Резултатите от изследванията, описани в статиите заместващи хабилитационния труд, съдържат **нова и оригинална за науката информация**. На кратко основните приноси могат да бъдат обобщени така:

I. Приноси по изолиране и охарактеризиране на нови хемоцианини (Публ. №1 и №2; Показател В-4)

1. **За пръв път** е изолиран нов хемоцианин от градински охлюв *Helix lucorum* (НН) и са охарактеризирани трите изоформи (β -НН, α_D -НН и α_N -НН), в които той е представен. За изолирането на изоформите на НН е предложен нов подход, комбиниращ няколко различни хроматографски техники.

2. Чрез трансмисионна електронна микроскопия (ТЕМ) е установена четвъртичната структура на мултимерния НН и е показано, че неговите изоформи са дидекамери. На микрографските изображения на нативния НН са наблюдавани и тридекамерни структури.

3. Чрез N-крайно секвениране посредством Едманово разграждане са определени N-крайните аминокиселинни последователности на β -НН, α_D -НН и α_N -НН субединиците. Сравнителният анализ на получените резултати с данни за N-крайните аминокиселинни последователности на шест хемоцианина, изолирани от хемолимфата на коремноноги и главноноги мекотели, показва между 50 и 67 % сходство в аминокиселинния състав и наличие на фрагмент

LVRKNVDXLT, консервативен за всички сравнени протеини. Трите НН субединици са допълнително структурно охарактеризирани чрез спектроскопски методи (УВ-вис спектроскопия, флуоресцентна спектроскопия и кръгов дихроизъм), определена е тяхната молекулна маса посредством гел-проникваща хроматография. Чрез двуменсионална гел електрофореза са определени изоелектричните точки (pI) на трите изоформи на НН и е установено, че α_D -НН (pI 4.3) и β -НН (pI 5.2) са кисели протеини, а α_N -НН (pI 7.0) —неутнеутрален.

4. Изучена е в детайли структурата на β -НН, като за целта първо посредством лимитрирана трипсинолиза са получени различни фрагменти (по-къси пептиди и гликопептиди), след което хроматографски (FPLC и RP-HPLC) са изолирани осем функционални единици, по класически методи са определени молекулните им маси и N-крайните им аминокиселинни последователности, за които е установено, че са с висока степен на хомоложност с N-крайните аминокиселинни последователности на функционални единици на хемоцианин от *Helix pomatia*. Установено е наличието на консервативен фрагмент VRKD, типичен за хемоцианините от мекотели.

II. Изследвания на структурната и конформационната стабилност на хемоцианини, изолирани от мекотели (Публ. №1, №6 и №7; Показател В-4)

Чрез използването на ТЕМ и различни спектрални техники за новоизолираните хемоцианини от *H. lucorum* и *C. aspersum* (СаН), и трите изоформи – β -НН, α_D -НН и α_N -НН е установен ефекта на киселинността на средата, влиянието на Ca^{2+} и Mg^{2+} и някои денатуриращи агенти като уреа и гуанидин хлорид, както и на температурата върху дисоциацията и реасоциацията на субединиците в мултимерни структури, както и конформационната стабилност на протеина и термодинамичните параметри на температурна денатурация. Получени са данни и за конформационната и термодинамичната стабилност на RvH₂ субединицата.

III. Приноси за определянето на въглехидратните структури на хемоцианини от мекотели

При хемоцианините, изолирани от мекотели се наблюдават големи различия в процентното въглехидратното съдържание, монозахаридния състав и начина на свързване на гликаните към полипептидните вериги. През последните години беше установено, че именно на въглехидратите се дължат силните имуностимулиращи и имунодулиращи свойства на хемоцианините. Фрагменти от въглехидратната им структура могат да реагират кръстосано с епитопи от повърхността на туморните клетки и по този начин да направят туморните клетки „видими“ и разпознаваеми за имунната система. Тези свойства разкриват голям потенциал на хемоцианините в имуно-онкологията като имуностимуланти, носители на хаптени, адюванти на ваксини и др. Също така на

тях се приписват и други наблюдавани биологични ефекти като: антибактериална, антивирусна, противогъбична и др. активности. Разликите във въглехидратния състав и начина на свързване на въглехидратите към протеина преопределя различната клетъчна специфичност и селективност, а също така и са възможно обяснение за разликите в биологичните активности на хемоциани от различен произход. Данните за подробни изследвания на въглехидратната структура на хемоцианините са оскъдни поради сложността на обектите. В този смисъл получените от д-р Велкова резултати имат **едновременно висок научен принос, дават нова и оригинална за науката информация, но дават и методологията за изследване на тези сложни обекти.**

За охарактеризиране на въглехидратната структура са използвани два подхода. За определяне на N-свързващите центрове на гликозилиране, получените от субединици и/или функционални единици на хемоцианина след лимитирана трипсинолиза гликопептиди са анализирани посредством LC/ESI-MS, като пречистените гликани са изследвани на Q-trap система, снабдена с наноспрей йонен източник. За определяне на структурата на въглехидратната верига, субединици от изследвания хемоцианин са третираны със специфични амидази, при което са получени N-гликани, които в някои случаи са допълнително хидролизирани със специфични екзо-гликозидази и получените фрагменти са подложени на MALDI-TOF-TOF/MS анализ (тандемен Q-trap маспектрометър, снабден с нано-ESI и хибриден квадруполен анализатор).

Основните приноси от тези изследвания са:

1. Определени са олигозахаридните структури, влизащи в състава на някои от субединиците на три хемоцианина от мекотели: β c-HtH (32 гликана), *H. tuberculata* (HtH₁) (15 гликана) и *Rapana venosa* hemocyanin (RvH₂) (28 гликана) (Публ. №3, №4 и №5; Показател В-4). Наблюдавано е разнообразие във въглехидратния състав и сложен модел на гликозилиране и при трите гликопротеина.

2. Открити са нови структурни мотиви във въглехидратната структура на β c-HtH и HtH₁, с което е обогатена базата данни на природните въглехидратни структури (Публ. №3 и №4). При анализа на въглехидратната структура на RvH₂ за първи път е докладвано наличието на нов клас N-гликани, включващи фукозен остатък, свързан с един остатък от N-ацетилгалактозамин (β 1-2) и хексуронова киселина (Публ. №5). Подобни структури не са наблюдавани при β c-HtH и HtH₁. Приложен е оригинален метод за разграничаване на метилиран от неметилиран хексозен остатък чрез амидиране на гликановата смес, при което разликата в молекулните маси на съответните гликани се увеличава и са по-лесно разпознаваеми (Публ. №5).

3. Построени са тридеменсионни модели на функционалната единица на базата на които е направен извода, че потенциалните центрове за свързване са разположени по повърхността на

функционалните единици и е изказана хипотезата, че играят роля при формирането на третичната структура на хемоцианините (Публ. №3 и №4).

4. В определените 32 структури и състав на N-гликаните, изграждащи β c-НН са наблюдавани следните 3 основни модификации на пентазахаридната сърцевина: β 1-4 свързана ксилоза при β 1-4 маноза, α 1-6 фукозилиране на вътрешния остатък на N-ацетилгалактозамин и метилиране на манозния остатък. Установени са моно и би-антенни структури на N-гликани от високоманозен и комплексен тип, хибридни структури с/или без фукозна модификация, които не са типични за повечето хемоцианини. Макар и при някои други хемоцианини да е наблюдавано метилиране въглехидратните остатъци това също е една сравнително рядко срещана модификация на структурата. С помощта на конструиран 3D-модел на β c-НН-g функционалната единица е изказано предположение, че двата центъра за гликозилиране и олигозахаридните вериги са разположени на повърхността в двата домена на функционалната единица (Публ. №3).

5. След трипсинолиза на β c-НН и последващ мас спектрометричен анализ (μ LC/ESI-МС и μ LC/ESI-CID-МС) са определени молекулните маси и въглехидратните структури на два гликопептида от манозен тип (Публ. №2).

6. Чрез описаните по-горе подходи и апаратура за пръв път е определена олигозахаридната структура (мономерен състав и начин на свързване) на субединицата НtН₁. Най-общо, педнадесетте въглехидратни структури са от високо манозен тип, открит е нов структурен мотив нехарактерен за хемоцианини, изолирани от мекотели, установено е наличието на един или два крайно свързани метилирани хексозни остатъка, типични за този вид хемоцианини (Публ. №4). Построени са 3D-модел на функционални единици на НН₁, които предсказват пространственото разположение на въглехидратните остатъци и местата на гликозилиране в протеина.

IV. Приноси по изолиране и охарактеризиране на антимикробни пептиди (Публ. №8)

Чрез прилагане на de novo MALDI-TOF-MS/MS секвентен анализ са определени първичните структури на 9 нови пептида с молекулни маси между 1-3 kDa, изолирани от слюзта на градински охлюв *C. aspersum*. Установено е, че изолираните пептидите са богати на глицилови и левцилови остатъци, повечето имат един или два пролилови остатъка, разположени до α -спирален участък в близост до С-края, а при един от пептидите се наблюдава N-краен пролилов остатък. Изследваните пептиди са показали висока активност спрямо грам-отрицателен бактериален щам *E. coli* NBIMCC 8785.

Приносите на изследванията, включени в публикациите по показател Г-7 имат както **научен така и научно-приложен характер**. Част от изследванията, включени в този раздел са насочени към доизясняване на протеиновата структура и въглехидратното съдържание на

хемоцианини от различни източници (Г-1 Публ. №3, №6–9). В съавторство с колективи от страната и чужбина е установен положителния ефект на RvH върху преживяемостта и подтискане на туморния растеж при хамстери с развит миелоиден тумор на Графи (Г-1 Публ. №1), изследвано е имунологичното действие на хемоцианините RvH, keyhole limpet (KHL), *Helix vulgaris*(HvH), CaH и негови субструктури в миши модел (BDF1 мишки) (Г-1 Публ. №2). Ин витро при миши е изследван потенциала на две изоформи на HvH и една на RvH като носители на хаптени (Г-1 Публ. №3). Изследвани са антибактериалната и антитуморната свойства на пептиди, изолирани от слузта и хемоцианини, изолирани от хемолимфата на морски и градински охлюви от вида Rv, Ha, HhH (Г-1 Публ. №10–13, Публ. №15–16). Установени са антиоксидантните свойства на фракции от слуз на градински охлюв *C. aspersum* (№14). Получени са данни за структурата и стабилността на Cu/Zn супероксид дисмутази, изолирани от гъбични щамове *A. niger* 26 и *H. lutea* 103 (Г-1 Публ. №4 и №5).

Впечатляващ е броят на цитатите на публикациите на д-р Велкова (152 бр), което само по себе си говори, че тематиката е актуална, проведените изследвания са на високо научно ниво и тя е разпознаваем от научната общност изследовател.

Д-р Велкова е съавтор на 4 патента, описващи получаването на екстракти и разработването на продукти на базата на хемоцианини и активни пептиди.

4. Оценка на личния принос на кандидата

Във всички публикации, заместващи хабилитационния труд си проличава ясно водещата роля на д-р Велкова в изследванията по изолиране, структурно и биофизично охарактеризиране на комплексни мултимерни протеини. Тя успешно борави с най-съвременна техника за анализ на структурата на протеини, като същевременно задълбочено и критично тълкува и представя своите резултати.

5. Критични забележки и препоръки

Нямам критични забележки към кандидата. Документите за участие в конкурса са оформени според изискванията. Справката за приносите, съдържа изчерпателна информация за постигнатите резултати.

6. Лични впечатления

Познавам д-р Велкова от постъпването ми в Института през 1999 г. Тя е упорит, скромнен и старателен изследовател. Към настоящия момент д-р Велкова участва в голям брой текущи проекти, финансирани от ФНИ, една Национална научна програма и два проекта за изграждане на

Центърове за компетентност. Тя умее да разпределя времето си, да работи по повече от една тема и задача едновременно. През годините д-р Велкова е обучи голям брой студенти, млади колеги и дипломанти и винаги е проявявала огромно търпение и любов към работата си и е успявала да ги мотивира. Перспективите за работа и обектите на научен интерес са описани в края на хабилитационната справка и показват нейното намерение да продължи да развива качествена наука насочена към решаването на актуални проблеми свързани с човешкото здраве и екологията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Документите и материалите, представени от гл. ас. д-р Людмила Георгиева Велкова за участие в конкурса отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ на БАН и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ на ИОХЦФ-БАН,

Д-р Велкова е представила значителен брой научни трудове, които не са използвани при защитата на ОНС „Доктор” и в конкурса за заемане на академичната длъжност „Главен асистент” в ИОХЦФ-БАН. В работите на кандидата има оригинални научни приноси, като и ясно личи водещата роля в изследванията, описани в публикациите, обект на рецензиране. Изследванията са с висока научна стойност, като същевременно част от тях са послужили за основа за защитаване на 4 патента.

Високата квалификация и постигнатите от д-р Велкова научни резултати са **безспорни и напълно** съответстват на специфичните изисквания на Правилника на ИОХЦФ за прилагане на ЗРАСРБ.

След запознаване с представените в конкурса материали и научни трудове, анализ на тяхната значимост и съдържащите се в тях научни и научно-приложни приноси, намирам за основателно да дам своята **положителна оценка** и да препоръчам на Научното жури да изготви доклад-предложение до Научния съвет на ИОХЦФ-БАН за избор на гл. ас. д-р Людмила Георгиева Велкова на академичната длъжност „Доцент” в ИОХЦФ-БАН по професионално направление 4.2. „Химически науки“; по научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества”.

12.09.2019 г.
гр. София

Подпис:

/ доц. д-р Мая Христова Гунчева/

REVIEW

**by Assoc. Prof. Dr. Maya Hristova Guncheva,
Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, BAS**

of the documents submitted for participation in the competition for the position “Associate Professor “at the Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry (IOCCP), BAS

in the Field of higher education 4.0 Natural sciences, mathematics and informatics”, Professional field 4.2. Chemical Sciences, Scientific specialty “Bioorganic chemistry, chemistry of natural and physiologically active compounds”

Senior Assist. Prof. Dr. Liudmila Georgieva Velkova from the Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry-BAS is the only one candidate in the competition for the position “Associate Professor” announced in the State Gazette, issue 43/31.05.2019.

1. General presentation of the submitted materials

The full set of documents in an electronic and a paper format requested for the participation in the competition for the position of “Associate Professor” has been submitted before the deadline by Senior Assist. Prof. Dr. Liudmila Georgieva Velkova. The documents are in accordance with the requirements of the Act for the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria (ADASRB) and the IOCCP Regulations of the implementation of ADASRB.

From the application is seen that the Applicant fully meets the criteria of the ADASRB and IOCCP for the occupation of the academic position “Associate professor” in the professional field 4.2“Chemical sciences”.

Senior Assist. Prof. Dr. Liudmila Georgieva Velkova participates in the competition with 24 scientific papers. She is a co-author of one textbook and one study notebook. The materials have not been involved and evaluated in the previous competition for the occupation of the position “Senior Assistant Professor” and in the Ph.D. procedure. A list of 152 citations of the papers of the Applicant is presented. Dr. Velkova has participated in 33 scientific projects, 15 of which have been funded by the National Science Fund of Bulgaria, 15 of them are bilateral projects or funded by foreign Institutions, 2 of them are projects for the creation of Centre of competence. Currently, she participates in one National program as well. Senior Assist. Prof. Dr. Velkova is a co-inventor of 4 patents registered in Bulgaria. For their innovative research and products implemented in the industry, Dr. Velkova and her collaborators received more than 10 awards. The set of the submitted documents contains also copies of the 24 scientific papers

and the patents that are an object of the evaluation, abstracts of the studies presented on conferences and symposia, lists of the project titles, citations and awards.

2. Biography in brief

Senior Assist. Prof. Dr. Luidmila Velkova graduated from the Chemical Department (now Department of Chemistry and Pharmacy) of the Sofia University St. "Kl. Ohridski" in 1988, when she obtained the degree "Master of Science" in the Scientific specialty "Organic and Analytical Chemistry". Soon after her graduation, she was appointed as a specialist chemist at IOCCP, and in 2003 she took the position of the assistant professor in the "Laboratory chemistry and biophysics of proteins and enzymes". In July 2009 she was enrolled as self-funded Ph.D. student in IOCCP. Liudmila Velkova obtained a Ph.D. degree in 2013 after the successful defense of her Ph.D. thesis entitled "Structure and function of the carbohydrate chains of a hemocyanin isolated from marine snails *Rapana venosa*". Since September 2013 after the successful winning a competition Dr. Velkova has been appointed to the position of "Senior Assistant Professor" at IOCCP. Her main research interests are in the field of isolation, elucidation of the structure and biophysical characterization of proteins and peptides with biological activities. Dr. Velkova accomplished more than 9 short-term specializations at the University of Tübingen, Germany, University of Padua, Italy, University of Gent, Belgium, and the Institute of Virology, Ukrainian Academy of Sciences within bilateral or collaborative projects.

During her long scientific career at IOCCP as well as a result of her participation in an impressive number of projects, specializations and trainings, Dr. Velkova acquired knowledge to apply classical and modern methods and techniques for isolation and characterization of proteins and glycoproteins. She is recognized as a highly qualified specialist in the field of bioorganic chemistry, chemistry of natural and physiologically active compounds".

3. General characterization of the activities of the candidate

Eight of the presented by Dr. Velkova publications substitute the habilitation work (Indicator C-4). Dr. Velkova is the first author in six of them, the second author in the other two, and she is the corresponding author of the three of the publications. All articles on Indicator C-4 have been referenced and indexed in the world-renowned scientific databases Web of Science and/or Scopus and have been ranked as follows: 3 papers have been published in journals with rank Q2; two — in Q3 and three —Q4.

Additionally, 16 publications on Indicator D are involved in the participation of the competition. Dr. Velkova is the first author in two of them and the second author in two of the papers. One of these papers are in journal of category Q1, six are in journals of Q2; three are in journals with Q3; two are in

journals with Q4 and four are in not indexed and referred journals or are proceedings from conferences. Based on Scopus, Dr. Velkova has h-index 7.

Dr. Velkova is a co-author of a textbook and a training notebook entitled “Principles and application of mass spectrometry in biology” that are oriented to students in biology and medicine.

The main objects in the studies of Dr. Velkova are hemocyanins (Hcs) isolated from the hemolymph of arthropods and mollusks and biologically-active peptides, isolated from the mucus of garden snails.

Most of the papers on Indicator C-4 are focused on the isolation, purification, elucidation of the structure and biophysical characterization of Hcs from various species as well as isolation of the glycans comprising their structural subunits, elucidation of their carbohydrate structures and the centers of glycosylation.

The investigations are complex and detailed and to be accomplished many classical and modern methods for purification and characterization of proteins and glycoproteins have been applied. The study has been challenging and set tough and ambitious tasks having in mind the complex multimeric structure of Hcs.

The research described in the articles on Indicator C-4 is original and provides valuable scientific information. Briefly, the major achievements/findings could be summarized as follows:

I. Scientific contribution on isolation and characterization of novel hemocyanins (Art. №1 and №2; Indicator C-4).

1. A novel Hc from garden snails *Helix lucorum* (HIH) and its three structural subunits (β c-HIH, α D-HIH and α N-HIH) have been isolated for the first time. In the isolation of the HIH isoforms a new approach based on different chromatographic techniques was applied.

2. The quaternary structures of the native HIH and its substructures were determined by transmission electron microscopy (TEM). It was found that HIH isoforms are didecamers, although few tridecameric structures have also been observed.

3. The N-terminal sequences of β c-HIH, α D-HIH and α N-HIH subunits were determined by Edman's degradation method and were compared with the sequences of other arthropodan and molluscan Hcs. The sequence alignment analysis showed between 50 and 67 % similarity among the compared proteins and the presence of a motive LVRKNVDXLT conservative for all of them. The three HIH subunits are additionally structurally characterized by UV-vis spectroscopy, fluorescence, and circular dichroism; their molecular weights were determined by gel-permeating chromatography. Using 2D gel electrophoresis the isoelectric points (pI) of the three proteins were determined and it was found that α D-HIH (pI 4.3) and β c-HIH (pI 5.2) are acid proteins, while α N-HIH (pI 7.0) is a neutral protein.

4. The tertiary structure of β c-HIH has been studied in details. At first, the protein was subjected to limited proteolysis to be fragmented into shorter peptides and glycopeptides. Eight functional units (FU) were purified (FPLC and HPLC) and their molecular weight and N-terminal amino acid (SDS-PAGE and MALDI-MS) were determined. Sequence alignment showed that β c-HIH is highly homologous to the FUs of *Helix pomatia* Hc (HpH) and a presence of the conservative motif VRKD, that is typical for the molluscan Hcs.

II. Studies on the structure and conformational stability of hemocyanins isolated from mollusks (Art. №1, №6 and №7; Indicator C-4).

For the novel Hcs from *H. lucorum* and *C. aspersum* (CaH), and the three HIH– β c-HIH, α _D-HIH and α _N-HIH using TEM and various spectral methods, Dr. Velkova estimated the effect of the pH, temperature, role of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions and some desaturating agents such as urea and guanidine chloride on the dissociation and reassociation of the Hc subunits into multimers. The conformational stability and the parameters of the thermal unfolding of the proteins were estimated as well. Data on the conformational and thermodynamic stability of the RvH₂ were reported for the first time.

III. Original scientific contribution for the determination of the carbohydrate structures of molluscan hemocyanins.

The carbohydrate content in the molluscan Hcs vary between 2 to 9 %, there are differences in the monosaccharide composition and structural organization of the carbohydrates as well. Interestingly, motifs from the carbohydrate sequences of Hcs can be recognized by the tumor cells and cross-react with epitopes spread on their surface, thus subsequently making the tumor cells visible for the immune system cells. In recent years, it has been revealed that the strong immunostimulatory and immunomodulatory properties of Hcs are due to the carbohydrates containing in their molecules. Hcs have huge potential as anticancer immunotherapeutics, immunostimulants, carriers of haptens, vaccine adjuvants, and some other. It is widely discussed also that antibacterial, antiviral, antifungal and some other activities of Hcs are also due to the carbohydrate moieties exposed on the protein surface. The differences in the composition and the structural organization of the carbohydrates as well as the type of glycosylation of the protein among the Hcs from different sources predetermine the differences in their cell specificity, selectivity, and biological activities. Due to the complex structure of the Hcs and difficulties in the analysis, the detailed structural studies on the oligosaccharides of Hcs are scarce. In this aspect, the results obtained by Dr. Velkova are with high scientific value. They they not only provide new information on the oligosaccharide contents and organization of Hcs but also give the efficient methodology and strategies how to study such complex proteins.

For the detailed studies of the oligosaccharide structures two approaches were adopted. For the mapping of the N-linked glycosylation centers in Hcs, their subunits or FUs were subjected to limited proteolysis and the obtained glycopeptides were analyzed by LC/ESI-MS and Q-trap system.

For the determination of the oligosaccharide structure of Hcs, their subunits were subjected to hydrolysis using specific amidases, then in some cases, the obtained N-glycans were additionally treated with specific exo-glycosidases and the obtained fragments were analyzed by MALDI-TOF-TOF/MS and tandem mass spectrometry of ESI-Q-Trap.

The main contributions from these studies are:

1. The oligosaccharide structures comprising the subunits of three molluscan Hcs, β c-HIH (32 glycans), *H. tuberculata* (HtH₁) (15 glycans) и *Rapana venosa* hemocyanin (RvH₂) (28 glycans) were determined (Art. №3, №4 and №5; Indicator C-4). Diversity of the carbohydrate composition and complex glycosylation pattern of all three glycoproteins was observed.

2. New structural motives were found in the oligosaccharide moiety of β c-HIH and HtH₁, which contributes to the enrichment of the available database (Art. №3 and №4). For the first time a new class of structure N-glycans, containing an internal fucose residue connecting one GalNAc (β 1-2) and one hexuronic acid was reported for the RvH₂ (Art. №5). Similar structures were observed in the molecule of β c-HIH and HtH₁. Velkova et al. propose a new original method for distinguishing methylated from unmethylated hexose residues by amidation of the glycan mixture, whereby the difference in molecular weights of the respective glycans increases and they become more easily recognizable (Art. №5).

3. The 3D models of the FUs of β c-HIH and HtH₁ have been constructed, it is suggested that the glycosylation sites likely occur on the surface of the subunits and that they play a role in protein folding (Art. №3 and №4).

4. In all 32 determined N-glycan structures of β c-HIH were observed the following modifications at their inner core: β 1-2-linked xylose to β -mannose, α 1-6-fucosylation of the innermost GlcNAc residue (the Asn-bound GlcNAc), and methylated Man. Besides, the presence of structures untypical for the most of Hcs like primarily mono- and bi-antennary N-glycans from high mannose and complex type as well as two hybrid type structures with or without core-fucosylation were reported. 3D model of the β c-HIH-g FU was constructed and was shown that the carbohydrate chains are located at the surface of the two domains comprising the FU (Art. №3).

5. The molecular weights and carbohydrate structures of two glycopeptides, obtained after trypsinolysis of β c-HIH was determined by μ LC/ESI-MS and μ LC/ESI-CID-MS (Art. №2).

6. The oligosaccharide structure of the HtH₁ subunits has been determined using the same approach and equipment as described above. In summary, all 15 are high-mannose glycans, a new structural motif not typical for the molluscan Hcs, and presence of one or two MeHex residues typical for

the molluscan Hcs were found (Art. №4). 3D models of functional units of HH₁ have been constructed that predict the spatial arrangement of carbohydrate residues and glycosylation sites in the protein.

IV. Contribution to the isolation and characterization of antimicrobial peptides (Art. №8).

By de novo MALDI-TOF-MS/MS sequence analysis have been identified of 9 novel peptides (Mw 1-3 kDa) isolated from the mucus of garden snails *C. aspersum*. The peptides are rich in Gly and Leu, most of them contain one or two Pro, located near the α -helical region near the C-term. One of the peptides has N-terminal Pro residues. The peptides exhibited high antibacterial activity against *E. coli* NBIMCC 8785 strain.

The contributions of the papers included in Indicator D-7 are both scientific and applied. Parts of the studies have been focused on the elucidation of the protein structure and carbohydrate content and organization of Hcs from different sources (D-7, Art. №3, №6–9). In collaboration with researchers from Bulgaria and abroad has been found that RvH enhances the survival and suppresses the tumor growth in myeloid Graffi tumor-bearing hamsters (D-7 Art. №1). The immunostimulatory effect of RvH, keyhole limpet (KHL), *Helix vulgaris*(HvH), CaH, and their substructures in BDF1 mice have been evaluated (D-1 Art. №2). In mice was studied also the potential of two HvH and one RvH isoforms as hapten carriers (D-1 Art. №3). In vitro was assessed the antibacterial and anticancer properties of peptides, isolated from the mucus and Hcs, isolated from the hemolymph of marine and garden snails from Rv, Ha, HH (D-1, Art. №10–13, Art. №15–16). The antioxidant properties of peptide fractions obtained from garden snails *C. aspersum* was tested (№14). Data on the structure and stability of Cu/Zn superoxide dismutases isolated from fungi *A. niger* 26 and *H. lutea* 103 were collected (D-7 Art. №4 and №5).

The papers of Dr. Velkova's publications have been cited 152 times, which itself is an indication that the topic is relevant, the research carried out is of a high scientific level and is visible to the scientific community.

Dr. Velkova co-authored 4 patents on the preparation of extracts and the development of health-care products based on hemocyanins and active peptides.

4. Assessment of the personnel contribution of the applicant

In all publications replacing the habilitation work, Dr. Velkova's leading role in the studies on the isolation, structural and biophysical characterization of complex multimeric proteins is clear. She successfully employs advanced techniques and uses modern equipment for the elucidation of the protein structure and can interpret and to discuss the obtained results critically and in-depth.

5. Critical comments and recommendations

I have no critical remarks to the applicant. The documents for participation in the competition are prepared according to the requirements. The habilitation report contains comprehensive information on the achieved results.

6. Personnel opinion

I have known Dr. Velkova since I joined the Institute in 1999. She is a stubborn, humble and hard-working researcher. At present, Dr. Velkova is involved in a large number of ongoing projects funded by the NSF, one National Science Program and two projects for the creation of Centers of competence. She is organized and is able to work on more than one topic and tasks at a time. Over the years, she has been a mentor of a large number of students, young scientists and diploma workers with whom she has always been very patient and has demonstrated dedication and love in research.

The perspectives of her future scientific work and the objects of her scientific interest are outlined at the end of her habilitation report. Dr. Velkova declares her intention to continue to do high quality research aimed meet the challenges related to human health and ecology.

CONCLUSION

All documents and materials submitted by Senior Assist. Prof. Liudmila Georgieva Velkova for the participation of the competition for the position “Associate Professor” cover and exceed the requirements of the Act for the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria (ADASRB), and its Regulations, as well as the Regulation of the implementation of ADASRB of Bulgarian Academy of Sciences and IOCCP.

Dr. Velkova has participated in the competition with a considerable number of scientific papers that have not been used in her Ph.D. and in the competition for the occupation of the academic position of “Senior Assistant Professor “at IOCCF-BAS. The papers contain original scientific contributions, and the leading role of Dr. Velkova in the research described in the peer-reviewed publications is clear. The studies are of high scientific value, and 4 patents have been registered as an outcome of them.

Dr. Velkova is highly qualified scientists and her results and contributions to the protein science are indisputable and fully meet the specific requirements and criteria of the Regulation of the implementation of ADASRB of IOCCP.

After the analysis of the research output of Senior Assist. Prof. Dr. Liudmila Velkova, its importance and the scientific contributions reflected therein, I give **my positive assessment** and

recommend to the Scientific Jury to prepare a report-proposal to the Scientific Board of IOCCP-BAS for the selection of **Senior Assist. Prof. Dr. Liudmila Velkova** at the academic position of "**Associate Professor**" at IOCCP-BAS in the professional field 4.2. Chemical Sciences, scientific specialty: "Bioorganic chemistry, chemistry of natural and physiologically active compounds".

12.09.2019

Sofia

Signature:

/Assoc. Prof. Dr. Maya Hristova Guncheva/