

РЕЦЕНЗИЯ

от д-р Румяна Димитрова Цонева – професор в Институт по биофизика и
биомедицинско инженерство - БАН

на 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“

(научната специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично
активните вещества“)

В конкурса за ‘доцент’, обявен в Държавен вестник, бр. 43 от 31.05.2019 г. и в интернет-страница на ИОХЦФ, БАН, като единствен кандидат участва гл. ас. д-р Людмила Георгиева Велкова от лаборатория „Химия и биофизика на белтъци и ензими” на ИОХЦФ, БАН

1. Общо представяне на получените материали

За участие в обявения конкурс е подал документи единствен кандидат:

гл. ас. д-р Людмила Георгиева Велкова от ИОХЦФ, БАН

Представеният от гл. ас. д-р Людмила Георгиева Велкова комплект материали на хартиен носител е в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав на ИОХЦФ, и отговаря на критериите на ИОХЦФ-БАН за заемане на академичната длъжност „доцент“.

Кандидатът гл. ас. д-р Людмила Георгиева Велкова е приложил общо 24 научни труда, 2 броя учебници и учебни пособия и списък на 4 научноизследователски разработки. Приемат се за рецензиране 24 научни труда, които са извън дисертацията и се отчитат при крайната оценка и 33 научноизследователски проекта. Не се рецензират 5 научни труда по дисертацията за придобиване на образователната и научна степен „доктор”. Разпределението на научните трудове по съответните Q фактори е както следва: Q1-1, Q2-9, Q3-5, Q4-5 и SJR-4.

2. Кратки биографични данни

Людмила Велкова е завършила СУ ” Св. Климент Охридски”, Химически факултет, гр. София. Тя се дипломира като магистър по специалност „Органична и аналитична химия“ през 1988 г. През 2013 г. защитава докторска дисертация по научната специалност „Биоорганична химия и химия на природните и физиологично активни вещества“ (шифър 01.05.10).

Професионалната си кариера д-р Велкова развива в ИОХЦФ-БАН, където последователно израства от длъжност химик-специалист до гл. асистент. Професионалният ѝ опит е главно в областта на химия и биофизика на белтъци и ензими.

3. Обща характеристика на дейността на кандидата

Оценка на научната и научно-приложна дейност на кандидата

Д-р Людмила Велкова участва в конкурса с 24 научни статии, от които 20 са в издания с импакт-фактор, а в 10 от тях тя е водещ автор. Трудовете ѝ са цитирани досега общо 167 пъти, от които 152 не са използвани при защита на дисертационния ѝ труд. Съавтор е и на 4 национални патента и полезни модела в областта на фармацевтичната биотехнология. Участвала в разработването на 18 научни проекта с национално финансиране и 15 научни проекта с международно финансиране. Людмила Велкова взема участие и в една **Националната научна програма в областта на „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина“** и два **Центъра по компетентност** – „Устойчиво оползотворяване на био-ресурси и отпадъци от лечебни и ароматични растения за иновативни биоактивни продукти“ и „Чисти технологии за устойчива околна среда – води, отпадъци, енергия за кръгова икономика“. Гл. ас. д-р Людмила Велкова е участвала в 42 национални и 13 международни научни конференции.

Оценка на учебно-педагогическа дейност

Д-р Людмила Велкова е съавтор на публикуван университетски учебник: Тематичен сборник „Същност и биологично приложение на масспектрометрията“ и на Учебна тетрадка към Тематичен сборник „Същност и биологично приложение на масспектрометрията“.

Приноси (научни, научно-приложни, приложни) и цитирания

Кандидатът д-р Людмила Велкова участва в настоящия конкурс главно с 8 научни публикации (раздел В 4 от таблица с критериите за академична длъжност "доцент") обобщени в хабилитационен труд, за които са описани подробно приносите в хабилитационна справка.

Всички статии, подадени за участие в конкурса, са в областта на биоорганичната химия. Научният интерес на кандидата е насочен към изолиране и характеризиране на биологично активни вещества от природни източници, предимно хемоцианини и антимицробни пептиди от мекотели и тяхното потенциално приложение в медицината и фармацията.

Представените резултати в хабилитационната справка са свързани с разработване на методи за изолиране на нови хемоцианини и антимицробни пептиди от мекотели и задълбоченото им охарактеризиране. Акцент в работата на кандидата е изясняване на връзката между структура, функция и биологичната активност на тези молекули. В научните изследвания на д-р Людмила Велкова особено важно място заема изследването на въглеродната структура на хемоцианини от молюски.

Научните приноси са тематично обобщени в следните направления:

I. Изолиране, пречистване и характеризиране на хемоцианини от мекотели

Тук приносите са свързани с изолиране, охарактеризиране и изучаване на структурата на нови хемоцианини с три субединици - *Helix lucorum* (НН) и *Cornu aspersum* (СаН), наричан още *H. Aspersa* както следва:

1. Изолиран и охарактеризиран е нов хемоцианин от хемолимфата от градинския охлюв *H. lucorum*, изграден от три различни структурни субединици и са определени техните молекулни маси (№ 1, № 2 от приложения списък със статии).
2. За първи път, чрез трансмисионна електронна микроскопия (ТЕМ), е показана четвъртичната структура на олигомерния ННН и неговите изоформи, както и изграждащите го структури. Структурата на мултимерните протеинови комплекси на ННН е допълнително потвърдена с UV-абсорбционна спектроскопия, флуоресцентен анализ и кръгов дихроизъм (CD) (№ 1 от приложения списък със статии).
3. Приложен е нов подход за изолирането на трите субединици от нативния хемоцианин ННН, който включва пречистване на DEAE Sepharose CL-6B колона и изолиране и пречистване чрез анионообменна хроматография на колона Flow Sepharose Q на FPLC (№ 1, № 2 от приложения списък със статии)
4. Установена е структурната организация на ННН чрез определяне на N-крайни АКП на три различни структурни субединици (β -ННН, α D-ННН и α D-ННН) чрез Едманово разграждане. Чрез сравнителен анализ с N-крайните последователности на други хемоцианини от мекотели (*R. venosa*, *H. tuberculata*, *O. dofleini*, *N. Pompilius*, *A. Californica* и *H. pomatia*) е установено сходство около 50-67%. Чрез 2D-гел електрофореза са определени изоелектрични точки на структурни субединици (№ 1 от приложения списък със статии).
5. Детайлно е охарактеризирана третичната структура на β -ННН чрез FPLC и RP-HPLC. Чрез SDS-PAGE и MALDI-MS анализ са идентифицирани осем различни функционални единици. Чрез сравнителен анализ с N-крайните последователности е идентифициран общ фрагмент (-Val-Arg-Lys-Asp-), типичен за хемоциани от мекотели (№ 1 от приложения списък със статии).

Проучванията, на които са базирани приносите в това научно направление играят важна роля при изясняване на връзката между структура, функция и биологичната активност на хемоцианините и прави переспективно тяхното приложение в медицината. Приносите са предимно с научен характер, като принос 3 е с методичен характер, като те могат да бъдат причислени главно към категорията **създаване на нови класификации, методи, конструкции, технологии**. В тази част от представените от д-р Велкова научни резултати се демонстрира висока степен на компетентност в прилагането на разнообразни и съвременни методи в областта, като флуоресцентен анализ и кръгов дихроизъм (CD), FPLC, RP-HPLC и MALDI-MS анализ.

Наред с това, личните качества и високата ангажираност в експерименталните постановки са ясно демонстрирани чрез професионалното представяне на материалите. Статиите, на които са базирани горните приноси са цитирани 14 пъти за (статия № 1) в реномирани международни издания като Mol Phylogenet Evol., International Journal of Biological Macromolecules, Reviews of Environ. Contamin. and Toxic и т.н. Статия № 2 е цитирана 12 пъти в издания като BMC Genomics и американски патенти свързани с медикобиологичното приложение на хемоцианините.

II. Определяне на въглехидратните структури на хемоцианини от мекотели

Важно място в научните изследвания на д-р Людмила Велкова, заема характеризирането на въглехидратната структура на хемоцианини, изолирани от мекотели, тъй като тя играе важна роля за имунологичните и антитуморни свойства на тези съединения. Структурните субединици на три различни хемоцианини β -НН (*H. lucorum*), НtН1 (*H. tuberculata*) и RvН2 (*R. venosa*) са анализирани чрез различни масспектрометрични методи и резултатите са изведени главно в следните приноси:

1. Доказано е голямо структурно разнообразие на *N*-гликани в три изоформи на различни хемоцианини от молюски (β -НН, НtН1 и RvН2), след интерпретация на MS спектрите от MALDI-TOF-MS и MS/MS спектрите от ESI-Q-Trap (№ 3, № 4, № 5 от приложения списък със статии).

2. Определени са олигозахаридни структури на β -НН (32 гликани), НtН1 (15 гликани) и RvН2 (28 гликани), които разкриват сложен модел на гликозилиране, разкриващ структурни особености на различни висши организми (хора, бозайници, растения, насекоми, нематоди, трематоди). Приносът е с фундаментално значение и разширява познанията за разнообразието на *N*-гликановите структури на хемоцианини (№ 3, № 4, № 5 от приложения списък със статии).

3. Обогатена е базата данни на природните въглехидратни структури, с нови структурни мотиви, открити в β -НН и НtН1 (№ 2, № 3, № 4 и № 5 от приложения списък със статии).

4. Демонстрирано е чрез използване на 3D-модели и мас-спектрометрични данни за хемоцианините, че потенциалните центрове на гликозилиране и олигозахаридните вериги са изложени на повърхността на функционалните единици, като те оказват важна роля при формирането на четвъртичната структура на хемоцианите (№ 3, № 4 от приложения списък със статии).

Във връзка с горните приноси са и резултатите свързани с определянето на 32 структури на *N*-гликани в структурната субединица β -НН на хемоцианин, изолиран от градински охлюв *H. Lucorum* ((№ 3). Открити са нови структурни мотиви с частично или напълно метилирани крайни хексози ((№ 3) и няколко структури с висока степен на метилиране, включващи модифицирана пентазахаридна сърцевина с α 1-6-Fuc. Повечето от тези структури са установени за пръв път в β -НН (№ 3). При вида *Haliotis tuberculata* за първи път е определена олигозахаридната структура на субединицата НtН1 (№ 4). Открит е нов структурен мотив при хемоцианини от клас молюски, като е показано е, че *N*-гликаните на НtН1 съдържат предимно един или два крайно свързани структурни мотива (№ 4). Въз основа на построените 3D-модели на функционалните единици на НtН1 са показани потенциалните центрове на гликозилиране и разположението на олигозахаридните вериги на повърхността на молекулите (№ 4). Установени са 28 олигозахаридни структури от високоманозен и комплексен тип в структурна субединица RvН2 на хемоцианин, изолиран от морски охлюв *R. Venosa* и нов тип въглехидратна структура, с вътрешен фукозен остатък, което е потвърждение за нов важен клас *N*-гликани в хемоцианини от молюски (№ 5).

За първи път е показан антивирусен ефект на една гликозилирана функционална единица RvН1-Fu на хемоцианин от молюски срещу репликацията на HSV тип 1, което е потвърждение за връзка между въглехидратните структури и антивирусните

свойства на хемоцианините (№ 5). Приносите имат както научен (№ 3, № 4, № 5), така и научно-приложен (№ 5) и методичен характер (№ 3, № 4). Те могат да бъдат причислени към следните групи: **доказване с нови средства на съществени нови страни на вече съществуващи научни области, проблеми, теории, хипотези; и създаване на нови класификации, методи, конструкции, технологии.** Личният принос на кандидата е безспорен чрез задълбоченото излагане на експерименталните постановки (чрез владеене и използване на различни MS техники) и формулирането на свързаните приноси. Статиите, на които са базирани горните приноси са цитирани 35 пъти (за статия № 2, № 3, № 4, № 5) в реномирани международни издания.

III. Изследване на структурна и конформационна стабилност на хемоцианини от мекотели

Кандидатът д-р Людмила Велкова отделя важно място в своите изследвания на конформационната стабилност на хемоцианини от мекотели, тъй като този въпрос е от фундаментално значение за изясняване на връзката между структура и функция на тези сложни гликопротеини. Различни аспекти на биомедицинското приложение на хемоцианините, свързано с техните имуногенни свойства и антитуморна активност, насочват към задълбочен анализ на структурната и конформационната им стабилност. Във връзка с това са формулирани следните приноси:

1. Установено е, че дисоциация/реасоциация на нативните хемоцианини изолирани от градински охлюви *H. lucorum* (НН) and *C. aspersum* (СаН) и структурните субединици (β c-НН, α D-НН и α N-НН) анализирана чрез трансмисионна електронна микроскопия, протича различно, но зависи от рН на разтвора и концентрацията на Ca^{2+} и Mg^{2+} йони (№ 1, № 6 от приложения списък със статии).
2. Изложена е хипотеза за връзката между гликозилирането и образуването на декамери и мултидекамери при хемоцианините, а именно, че въглехидратните вериги, свързани към предполагаемите центрове на гликозилиране, разположени на повърхността на декамера, затрудняват взаимодействието между декамерите и формирането на дълги мултидекамери и тубули (№ 1 от приложения списък със статии).
3. Изследвани са конформационните промени на нативния СаН и една функционална единица RvH2-e в широк рН-температурен интервал, чрез CD спектроскопия, като е установена взаимовръзка между по-висока термостабилност и образуването на четвъртичната структура (№ 6, № 7 от приложения списък със статии).
4. Въз основа на построените рН–Т фазови диаграми са сравнени конформационните промени на нативната молекула на СаН и една ФЕ RvH2-e и са установени областите, в които процесите на температурно и рН-зависимо разгъване на изследваните протеини могат да протекат обратимо (№ 6, № 7 от приложения списък със статии).
6. За първи път е изследвана конформационната стабилност на нативния СаН във водни разтвори в присъствието на нарастващи концентрации на четири различни денатуранти чрез CD спектроскопия. Установено е, че разгъването на СаН във воден разтвор с урея + LiCl е подобно на това с Gdn.HCl. Използването на двукомпонентния разтвор (урея + LiCl) може да послужи като нов инструмент за изследване на повторно нагъване на протеини

чрез независимо вариране на концентрациите на урея и LiCl (№ от приложения списък със статии).

7. Определена е свободната енергия на стабилизация във вода (ΔG_{DH2O}) на нативния CaH, която корелира добре с резултатите на други изследвани хемоцианини. Конформационната стабилност на CaH към различни денатуранти (в диапазона 15.48–16.95 kJ.mol⁻¹) показва, че хидрофилни и полярни сили стабилизират четвъртичната структура. Представените резултати ще улеснят по-нататъшното проучване на свойствата и потенциалните приложения на CaH (№ 6 от приложения списък със статии).

Приносите обобщени към направление „Изследване на структурна и конформационна стабилност на хемоцианини от мекотели“ имат главно научен характер. Разнообразните аналитични методи, които са използвани (трансмисионна електронна микроскопия, калориметрична техника, CD спектроскопия) свидетелстват за отличната методологична подготовка на кандидата, а умението да интерпретира и обобщава получените резултати е видно от задълбочения начин на формулиране на приносите. Статиите, участващи при формулирането на горните приноси (№ 1, № 6, № 7) са цитирани общо само 16 пъти, но за сметка на това в реномирани международни издания като *Amino Acids*, *Mol Phylogenet Evol.*, *International Journal of Biological Macromolecules*, *Reviews of Environ. Contamin. and Toxic.* и т.н.

Последното тематично направление, в което д-р Людмила Велкова формулира приноси се отнася до:

IV. Изолиране и характеризиране на антимикробни пептиди

Антимикробните пептиди са уникална и разнообразна група от амфипатични молекули, които показват силно изразена цитотоксичност срещу голям брой резистентни към лекарства бактерии. Поради тази причина, тези молекули имат голям потенциал за приложение в нови антимикробни лекарства.

Изследванията на гл. асистент Велкова в тази област носят следните приноси:

1. Демонстрирана е антибактериална активност на пептидна фракция, изолирана от градински охлюв *C. aspersum* срещу грам-отрицателен бактериален щам *Escherichia coli* NBIMCC 8785 (№ 8 от приложения списък със статии).

2. Използвайки *de novo* MALDI-TOF-MS/MS секвентен анализ са определени първичните структури на 9 нови АМП с молекулни маси между 1000-3000 Da. Установена е взаимовръзка между първичната им структура, структурна стабилност и антимикробната им активност (№ 8 от приложения списък със статии).

Приносите тук са с научно-приложен характер и независимо, че са формулирани на базата на резултати от една статия (№ 8 от приложения списък със статии), имат важно значение за доказване на медикобиологичното приложение на АМП.

Трудовете на гл. ас. Людмила Велкова намират международен отзвук, са цитирани общо 167 пъти, като за настоящия конкурс цитатите са 152. Голяма част от тях са в реномирани международни издания с висок импакт фактор и обстойно коментират цитираната статия.

Съгласно Правилника на ИОХЦФ-БАН кандидатът надхвърля минималните изисквания по показател Д. Кандидатът покрива и изискванията по показател Ж, където за заемане на академичната длъжност „доцент“ се изисква притежаване на h-индекс по-висок от 5, а при доктор Людмила Велкова този показател е 8.

Оценка на признанието на кандидата д-р Людмила Велкова сред научните среди у нас са получените грамоти и награди, сред които са Грамота-Благодарност от 91 немска езикова гимназия за подготовка на нейни възпитаници в проекта „Jugend forscht“ в Германия, 2013; сребърен медал за иновации на Третото национално изложение "Изобретения, технологии, иновации – ”ИТИ’ 09.11-11.11.2011“; статуетка и грамоти «Изобретател на годината 2012», на IV-то изложение за ”ИТИ’2012” за разработката - «Биоактивни компоненти с доказани терапевтични свойства»; златен плакет за отлично представяне в петото национално изложение ИТИ 2014“ с разработката Натурален продукт „Екстракт от охлюви“; Номинация за „Изобретател на годината’2014, в категория „Химия и биохимия”, от Патентното ведомство на Република България и Съюза на изобретателите, за патент “Биологично активен продукт, съдържащ хемоцианин и метод за получаването му“, както и от чужбина - почетна грамота от Московский Городской Съвет и Диплом на IV-то изложение ”ИТИ’2012”. Като участник в колектив д-р Велкова е отличена с награда ПИТАГОР ‘2017 в категорията за фирма с най-много инвестиции в научно-изследователската и развойна дейност на "АЛЕКС–1977" ЕООД и награда ПИТАГОР‘ 2018 за научен колектив с успешна експлоатация и комерсиализация на научните резултати, с ръководител проф. д-р П. Долашка.

Внедрителска дейност

Голяма част от изследванията, в които е участвала доктор Велкова са по 33 научно-изследователски проекта, финансирани от национални и международни източници. Наред с тях, кандидатът е участвал в 4 национални патента.

Насоките за бъдеща научно-изследователска работа, които е формулирала доктор Людмила Велкова са обособени в две теми:

Тема 1:

- Изолиране, охарактеризиране и идентифициране на първичната структура на нови природни пептиди и гликопептиди с антибактериална и противогъбична активност на молюски и артроподи и генериране на база данни за техния потенциален фармакологичен ефект.
- Получаване и характеризирание на нови протеини и гликопротеини, изолирани от хемолимфата на артроподи и молюски, чрез прилагане на различни подходи и съвременни хроматографски методи.
- Изучаване на въглехидратните структури на нови гликопротеини от молюски.
- Идентифициране на протеини от вътреклетъчни екстракти на пролифериращи клетки, отговорни за оксидативния и токсичен стрес.

Тема 2:

- Анализ на въздействието на източниците на замърсяване върху състоянието на водите в околната среда;
- Разработване на иновативни технологии за третиране на водите, съдържащи токсични замърсители, чрез създаване на селективен адаптивен алгоритъм;

- Разработване на чисти технологии за преработка на отпадъчни продукти, от различни биологични източници.

4. Оценка на личния принос на кандидата/-ите

В половината от публикациите гл. ас. Людмила Велкова е първи или втори автор, а в шест от тях тя е автор за кореспонденция. Това е показателен факт, че тя има съществена роля както в изработването на експериментите, както и при написването на тези публикации.

5. Критични забележки и препоръки

Представените резултати в научните трудове на гл.ас. Людмила Велкова и свързаните с тях научни приноси имат връзка главно с разработване на методи за изолиране на нови хемоциани и антимикуробни пептиди от мекотели и задълбоченото им охарактеризиране. В тази връзка статия *Proteomic Analyses of Exothermic Processes in Rat Brain Homogenate, Y Voynikov et al., J Proteomics Bioinform 2018, 11:3* се оказва извън посочената област. Моята препоръка към кандидата е в бъдещата си научна работа, както и той сам е определил в насоките си за бъдещи научни планове, да обърне важно внимание чрез интердисциплинарни сътрудничества на изясняване на биологичната активност на отлично охарактеризирани хемоцианинови молекули и АМП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Кандидатът в конкурса е представила **достатъчен** брой научни трудове, публикувани след материалите, използвани при защитата на ОНС „доктор“. В работите на кандидата има оригинални научни и приложни приноси, които са получили международно признание като представителна част от тях са публикувани в списания и научни сборници, издадени от международни академични издателства.

Научната квалификация на гл. ас. доктор Людмила Георгиева Велкова е **несъмнена**.

Постигнатите от гл. ас. доктор Людмила Георгиева Велкова резултати в научно-изследователската дейност, **напълно** съответстват на специфичните изисквания на Правилник на ИОХЦФ-БАН за приложение на ЗРАСРБ.

След запознаване с представените в конкурса материали и научни трудове, анализ на тяхната значимост и съдържащи се в тях научни, научно-приложни и 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. доктор Людмила Георгиева Велкова на академичната длъжност ‘доцент’ в ИОХЦФ-БАН по професионално направление 4.2. Химически науки (научна специалност 01.05.10 „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“).

17.09. 2019 г.

Рецензент: Проф. д-р Румяна Цонева

София

.....

REVIEW

by **Rumiana Dimitrova Tzoneva, PhD - Professor at the Institute of Biophysics and Biomedical Engineering-BAS**

of the materials submitted for the competition

to occupy the academic position of "Associate Professor"

in Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry (IOCCP), BAS.

in area of higher education 4. Natural sciences, mathematics and informatics

professional field 4.2. Chemical Sciences

(01.05.10 Bioorganic Chemistry, Chemistry of Natural and Physiologically Active Substances)

In the competition for „Associate Professor“, announced in the State Gazette, issue. 43 of 31.05.2019 and on the website of IOCCP, BAS, participates as the only one candidate Assistant Professor **Lyudmila Velkova**, PhD from the laboratory "Chemistry and Biophysics of Proteins and Enzymes" at the IOCCP, BAS.

1. General presentation of the materials received

Only one candidate has applied for participation in the announced competition:

Assistant Professor **Lyudmila Velkova**, PhD from IOCCP, BAS

Presented by Assistant Professor Lyudmila Georgieva Velkova, a set of paper materials is in accordance with the Rules for the Development of the Academic Staff of the IOCCP, and meets the criteria of the IOCCP -BAS for occupying the academic position "Associate Professor".

The candidate Dr. Lyudmila Georgieva Velkova has applied a total of 24 scientific papers, 2 textbooks and teaching aids and a list of 4 research papers. Twenty-four scientific papers, which are outside the thesis, are accepted for review and are reported in the final evaluation and 33 research projects. Five scientific papers on the dissertation for obtaining the educational and scientific degree "doctor" are not reviewed. The distribution of scientific papers according to the relevant Q factors is as follows: Q1-1, Q2-9, Q3-5, Q4-5 and SJR-4.

2. Brief biographical information

Lyudmila Velkova is finished SU " St. Kl. Ohridski", Faculty of Chemistry, Sofia. She graduated with a Master's Degree in "Organic and Analytical Chemistry" in 1988. In 2013 she defended her doctoral dissertation in the scientific specialty "Bioorganic chemistry and chemistry of natural and physiologically active substances" (code 01.05.10).

Dr. Velkova has developed her professional career at IOCCP - BAS, where she has consistently grown from a position as a chemist to Ch. assistant. Her professional experience is mainly in the chemistry and biophysics of proteins and enzymes.

2. General characteristics of the applicant's activities

Evaluation of the applicant's scientific and applied scientific activity

Dr. Lyudmila Velkova participates in the competition with 24 scientific articles, 20 of which are with Impact Factor, and in 10 of them she is a leading author. So far, her works have been cited a total of 167 times, of which 152 have not been used to defend her dissertation. She is also a

co-author of 4 national patents and utility models in the field of pharmaceutical biotechnology. Participated in the development of 18 nationally funded scientific projects and 15 internationally funded scientific projects

Lyudmila Velkova participates in one National Scientific Program in the field of "Innovative low-toxic biologically active precision medicine" and two Centers of competence - "Sustainable utilization of bio-resources and waste of medicinal and aromatic plants for innovative bioactive products" and "Clean technologies" on a sustainable environment - water, waste, energy for a circular economy ". Assistant Professor Lyudmila Velkova has participated in 42 national and 13 international scientific conferences.

Assessment of educational and pedagogical activity

Dr. Lyudmila Velkova is the co-author of a published textbook: Thematic collection "The essence and biological application of mass spectrometry" and of the Notebook to the Thematic collection "Nature and biological application ".

Contributions (scientific, applied, applied) and citations

The candidate Dr. Lyudmila Velkova participates in this competition mainly with 8 scientific publications (section C 4 of the table with criteria for academic position "Associate Professor") summarized in the habilitation work, for which the contributions in the habilitation report are described. All entries submitted for the competition are in the field of bio-organic chemistry. Applicant's scientific interest is directed to the isolation and characterization of biologically active substances from natural sources, mainly hemocyanins and antimicrobial peptides of mollusks and their potential application in medicine and pharmacy.

The results presented in the habilitation report relate to the development of methods for isolation of new hemocyanins and antimicrobial peptides from mollusks and their in-depth characterization. An emphasis in the applicant's work is to clarify the relationship between the structure, function and biological activity of these molecules. In the research of Dr. Lyudmila Velkova, the study of the carbohydrate structure of hemocyanins of mollusks occupies a particularly important place.

The scientific contributions are thematically summarized in the following directions:

I. Isolation, purification and characterization of molluscan hemocyanins.

The contributions here are related to the isolation, characterization and study of the structure of new three-subunit hemocyanins - *Helix lucorum* (HIH) and *Cornu aspersum* (CaH), also known as *H. Aspersa* as follows:

1. Isolated and characterized by new hemocyanin from hemolymph from garden snail *H. lucorum*, made up of three different structural subunits and their molecular masses determined (**№ 1**, **№ 2** from the attached article list).

2. For the first time, by transmission electron microscopy (TEM), the quaternary structure of the oligomer is shown HIH and its isoforms, as well as its structures. The structure of HIH multimeric protein complexes is further confirmed by UV absorption spectroscopy, fluorescence analysis and circular dichroism (CD) (№ 1 from the attached article list).
3. A new approach is implemented to isolate the three subunits from native hemocyanin HIH, which involves purification of DEAE Sepharose CL-6B column and isolation and purification by anion exchange column chromatography Flow Sepharose Q of FPLC (№ 1, № 2 from the attached article list)
4. The structural organization of HIH was determined by determining the N-terminals AAS of three different structural subunits (β c-HIH, α D-HIH и α D-HIH) through Edman's degradation. By comparative analysis with the N-terminal sequences of other molluscan hemocyanins (*R. venosa*, *H. tuberculata*, *O. dofleini*, *N. Pompilius*, *A. Californica* and *H. pomatia*) a similarity of about 50-67% was found. The isoelectric points of structural subunits were determined by 2D gel electrophoresis (№ 1 from the attached article list).
5. The tertiary structure of β c-HIH by FPLC and RP-HPLC is characterized in detail. By SDS-PAGE and MALDI-MS analysis, eight different functional units have been identified. By comparison with the N-terminal sequences, a common fragment was identified (-Val-Arg-Lys-Asp-), typical of molluscan hemocyanins (№ 1 from the attached article list).

The studies on which contributions in this scientific field are based play an important role in clarifying the relationship between the structure, function and biological activity of hemocyanins and make their application in medicine prospective. The contributions are mainly scientific in nature, with contributions 3 being methodical in nature, and they can be classified mainly in the category of creation of new classifications, methods, constructions, technologies. This part of the scientific results presented by Dr. Velkova demonstrates a high degree of competence in the application of diverse and modern methods in the field, such as fluorescence analysis and circular dichroism (CD), FPLC, RP-HPLC and MALDI-MS analysis.

In addition, the personal qualities and high commitment to the experimental productions are clearly demonstrated through the professional presentation of the materials. The articles on which the contributions above are based are cited 14 times (for article № 1) in reputable international publications such as Mol Phylogenet Evol., International Journal of Biological Macromolecules, Reviews of Environ. Contamin. and Toxic and etc. Article № 2 has been cited 12 times in issues as BMC Genomics and US patents related to the biobiological application of hemocyanins.

II. Determination of carbohydrate structures of molluscan hemocyanins

Important place in Dr. Lyudmila Velkova occupies the characterization of the carbohydrate structure of hemocyanins isolated from mollusks, since it plays an important role for the immunological and antitumor properties of these compounds. The structural subunits of three different hemocyanins β c-HIH (*H. lucorum*), HtH1 (*H. tuberculata*) and RvH2 (*R. venosa*) have been analyzed by various mass spectrometric methods and the results are mainly derived from the following contributions:

1. High structural diversity of N-glycans in three isoforms of different hemocyanins of mollusks has been demonstrated (β c-HIH, HtH1 and RvH2), after interpretation of the MS spectra of MALDI-TOF-MS and MS/MS the spectra of ESI-Q-Trap (№ 3, № 4, № 5 from the attached article list).
2. Oligosaccharide structures of β c-HIH (32 glycans), HtH1 (15 glycans) and RvH2 (28 glycans) are defined, which reveal a complex pattern of glycosylation revealing structural features of various higher organisms (humans, mammals, plants, insects, nematodes, trematodes). The contribution is fundamental and broadens the knowledge of the diversity of N-glycan structures of hemocyanins (№ 3, № 4, № 5 from the attached article list).
3. The database of natural carbohydrate structures has been enriched, with new structural motifs found in β c-HIH and HtH1 (№ 2, № 3, № 4 and № 5 from the attached article list).
4. It has been demonstrated through the use of 3D models and mass spectrometric data for hemocyanins that potential glycosylation centers and oligosaccharide chains are exposed on the surface of functional units, and they play an important role in the formation of the quaternary structure of hemocyanins (№ 3, № 4 from the attached article list).

Also related to the above contributions are the results connected to the determination of 32 N-glycan structures in the structural subunit β -HIH of hemocyanin isolated from garden snail *H. Lucorum* (№ 3). New structural motifs with partially or fully methylated terminal hexoses have been discovered (№ 3) and several high-methylation structures including a modified pentasaccharide core with α 1-6-Fuc. Most of these structures were first established in β c-HIH (№ 3). For the species *Haliotis tuberculata*, the oligosaccharide structure of the HtH1 subunit is determined for the first time (№ 4). A new structural motif has been discovered in mollusc class hemocyanins, and it has been shown that the HtH1 N-glycans contain mainly one or two highly linked structural motifs (№ 4). Based on the constructed 3D models of the functional units of HtH1, the potential glycosylation centers and the location of oligosaccharide chains on the surface of the molecules are shown (№ 4). 28 oligosaccharide structures of high mannose and complex type have been identified in the hemocyanin structural subunit RvH2 isolated from sea snail *R. Venosa* and a new type of carbohydrate structure, with an internal fucose residue, which is confirmation of a new important class N-glycans in molluscan hemocyanins (№ 5).

For the first time, the antiviral effect of a glycosylated functional unit RvH1-Fu of hemocyanin from molluscs against HSV type 1 replication has been demonstrated, which confirms the link between carbohydrate structures and the antiviral properties of hemocyanins (№ 5). The contributions are scientific (№ 3, № 4, № 5), and scientifically applied (№ 5) and methodical in nature (№ 3, № 4). They can be assigned to the following groups: proving with new means of essential new sides of already existing scientific fields, problems, theories, hypotheses; and creating new classifications, methods, constructions, technologies. The personal contribution of the applicant is indisputable through a thorough exposition of the experimental formulations (through mastering and using various MS techniques) and the formulation of related contributions. The articles on which the contributions above are based have been cited 35 times (for articles № 2, № 3, № 4, № 5) in reputable international publications.

III. Study of structural and conformational stability of mollusc hemocyanin

The candidate, Dr. Lyudmila Velkova, plays an important role in her research on the conformational stability of molluscan hemocyanins, since this question is from fundamental to elucidate the relationship between structure and function of these complex glycoproteins. Various aspects of the biomedical application of hemocyanins, related to their immunogenic properties and antitumor activity, direct an in-depth analysis of their structural and conformational stability.

The following contributions have been formulated in this connection:

1. The dissociation / reassociation of native hemocyanins isolated from garden snails *H. lucorum* (HIH) and *C. aspersum* (CaH) and structural subunits (β c-HIH, α D-HIH and α N-HIH) was found to be analyzed by transmission electron microscopy different, but depends on the pH of the solution and the concentration of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions (№ 1, № 6 from the attached article list).
2. The hypothesis for the relationship between glycosylation and the formation of decamers and multidecamers in hemocyanins has been put forward, namely that the carbohydrate chains attached to the putative glycosylation centers located on the surface of the decamer are hampering the interaction between decamers and multidecamers (№ 1 from the attached article list).
3. The conformational changes of native CaH and one functional unit RvH2-e over a wide pH range were investigated by CD spectroscopy, and a relationship was found between higher thermal stability and the formation of the quaternary structure. (№ 6, № 7 from the attached article list).
4. Based on the constructed pH – T phase diagrams, the conformational changes of the native CaH molecule and one PE RvH2-e are compared and the areas in which the temperature and pH-dependent unfolding processes of the proteins under study can be reversed (№ 6, № 7 from the attached article list).
6. For the first time, the conformational stability of native CaH in aqueous solutions was investigated in the presence of increasing concentrations of four different denaturants by CD spectroscopy. The unfolding of CaH in aqueous urea + LiCl solution was found to be similar to that of Gdn.HCl. The use of the two-component solution (urea + LiCl) can serve as a new tool for the study of protein folding by independently varying the concentrations of urea and LiCl (№ from the attached article list).
7. The free stabilization energy in water (Δ GDH_{2O}) of native CaH was determined, which correlates well with the results of other hemocyanins tested. The conformational stability of CaH to various denaturants (in the range 15.48–16.95 kJ.mol⁻¹) indicates that hydrophilic and polar forces stabilize the quaternary structure. The results presented will facilitate further study of the properties and potential applications of CaH (№ 6 from the attached article list).

The contributions summarized in the section "Investigation of the structural and conformational stability of molluscan hemocyanins" are mainly scientific. The various analytical methods used (transmission electron microscopy, calorimetric technique, CD spectroscopy) testify to the excellent methodological preparation of the candidate, and the ability to interpret and summarize the results obtained is evident from the in-depth way of formulating the contributions. Articles involved in formulating the above contributions (№ 1, № 6, № 7) have been cited a total of only

16 times, but on the other hand in reputable international publications such as Amino Acids, Mol Phylogenet Evol., International Journal of Biological Macromolecules, Reviews of Environ. Contamin. and Toxic. and etc.

The last thematic area in which Dr. Lyudmila Velkova formulates contributions relates to:

IV. Isolation and characterization of antimicrobial peptides

Antimicrobial peptides are a unique and diverse group of amphipathic molecules that exhibit pronounced cytotoxicity against a large number of drug resistant bacteria. For this reason, these molecules have great potential for use in novel antimicrobials.

The studies of Dr. Velkova in this area make the following contributions:

1. Antibacterial activity of peptide fraction isolated from *C. aspersum* garden snail against gram-negative bacterial strain of *Escherichia coli* NBIMCC 8785 was demonstrated (№ 8 from the attached article list).
2. Using *de novo* MALDI-TOF-MS / MS sequence analysis, the primary structures of 9 new AMPs with molecular masses between 1000-3000 Da were determined. The relationship between their primary structure, structural stability and their antimicrobial activity has been established. (№ 8 from the attached article list).

The contributions here are scientifically applied, and although they are formulated based on the results of a single article (№ 8 from the attached article list) are important for demonstrating the biobiological use of AMPs.

The works of Dr. Lyudmila Velkova are internationally renowned, have been cited 167 times in total, and for this competition the citations are 152. Many of them are in reputable international publications with a high impact factor and comment extensively on the article.

According to the regulations of the IOCCP-BAS, the candidate exceeds the minimum requirements for indicator E. The candidate also meets the requirements for indicator G, where holding an h-index higher than 5 is required for occupying the academic position of "associate professor", and in the case of Dr. Lyudmila Velkova the indicator is 8.

Assessment of the recognition of the candidate Dr. Lyudmila Velkova among the scientific circles in the country are certificates and awards, including Certificate of Appreciation from 91 German Language Schools for the preparation of her graduates in the project "Jugend forscht" in Germany, 2013; silver medal for innovation at the Third National Exhibition "Inventions, Technologies, Innovations -" ITI '09.11-11.11.2011 "; statuette and certificates «Inventor of the Year 2012», at the 4th ITI2012 Exhibition for the development - "Bioactive Components with Proven Therapeutic Properties"; Gold Plaque for Excellence in the Fifth ITI 2014 National Exhibition with the development of the Natural Snail Extract product; Nominee for "Inventor of the Year'2014, in the category" Chemistry and Biochemistry ", from the Patent Office of the Republic of Bulgaria and the Union of Inventors, for the patent" Biologically active product containing

hemocyanin and method for its production“, as well as from abroad - a certificate of honor from Московский Городской Съвет and Diploma for the 4th ITI2012 Exhibition. As a participant in the team Dr. Velkova was awarded the Pythagoras' 2017 Award in the category for the company with the most investments in the research and development activity of "ALEX-1977" Ltd. and Pythagoras' 2018 Award for a Scientific Team with Successful Exploitation and Commercialization of Scientific Outcomes, headed by Prof. Dr. P. Dolashka.

Implementation activities

Much of the research in which Dr. Velkova has participated is in 33 research projects funded by national and international sources. In addition, the applicant has participated in 4 national patents.

Guidelines for future research formulated by Dr. Ludmila Velkova is divided into two topics:

Topic 1:

- Isolation, characterization and identification of the primary structure of new natural peptides and glycopeptides with antibacterial and antifungal activity of molluscs and arthropods and generation of a database for their potential pharmacological effect.
- Preparation and characterization of novel proteins and glycoproteins isolated from the hemolymph of arthropods and molluscs by applying different approaches and modern chromatographic methods.
- Studying the carbohydrate structures of new shellfish glycoproteins.
- Identification of proteins from intracellular extracts of proliferating cells responsible for oxidative and toxic stress.

Topic 2:

- Analysis of the impact of pollution sources on the water status in the environment;
- Development of innovative technologies for the treatment of waters containing toxic pollutants by creating a selective adaptive algorithm;
- Development of clean technologies for the treatment of waste products from various biological sources.

4. Assessment of the applicant's personal contribution

In half of the publications Ludmila Velkova is the first or second author, and in six of them she is the author of correspondence. It is a telling fact that it is essential role in both the design of the experiments and the writing of these publications.

5. Critical comments and recommendations

Results presented in the scientific works of Dr. Lyudmila Velkova and the related scientific contributions are mainly related to the development of methods for isolation of new hemocyanins and antimicrobial peptides from molluscs and their in-depth characterization. In this respect related article *Proteomic Analyses of Exothermic Processes in Rat Brain Homogenate*, Y Voynikov et al., *J Proteomics Bioinform* 2018, 11:3 turns out to be outside the specified area. My recommendation to the applicant is that in her future scientific work, as she has outlined in her

guidelines for future scientific plans, it is important, through interdisciplinary collaborations, to clarify the biological activity of the well-characterized hemocyanin molecules and AMPs.

CONCLUSION

The documents and materials presented by Dr. Lyudmila Georgieva Velkova **meet all the requirements** of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria (LDASRB), the Rules for the implementation of the LDASRB, the Rules for the Implementation of the LDASRB of BAS and the Rules of the IOCCP-BAS. The candidate has submitted a sufficient number of scientific papers published after the materials used in the defense of the Doctor of Science. The candidate's works contain original scientific and applied contributions that have received international recognition, as a representative part of them have been published in journals and scientific publications published by international academic publishers. The scientific qualification of Dr. Lyudmila Georgieva Velkova **is undoubtedly**.

Achieved by Dr. Lyudmila Georgieva Velkova results in the research activity fully correspond to the specific requirements of Regulations of IOCCP-BAS for the application of LDASRB.

After getting acquainted with the materials and scientific works presented in the competition, an analysis of their importance and the scientific, scientific-applied and applied contributions contained therein. I find it reasonable to give my positive assessment and to recommend to the Scientific Jury to prepare a report proposal to the Scientific board of IOCCP-BAS to select Dr. Lyudmila Georgieva Velkova at the academic position of Assistant Professor at IOCCP-BAS by professional field 4.2. Chemical Sciences (01.05.10 “Bioorganic Chemistry, Chemistry of Natural and Physiologically Active Substances”).

17.09. 2019 г.

Sofia

Reviewer: Prof. Dr. Rumiana Tzoneva

.....