

ИНФОРМАЦИЯ ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ

на гл. ас. д-р Людмила Велкова
Разширена хабилитационна справка

за участие в конкурс за доцент по професионално направление 4.2 Химически науки: научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества” за нуждите на лаборатория „Химия и биофизика на белтъци и ензими”

В конкурса участвам, с разширена хабилитационната справка за научните ми приноси в 8 научни публикации (раздел В 4), представни са още и 16 научни публикации (раздел Г 7) и 4 национални патента (раздел Г 9), всички са извън 5-те публикации, използвани за придобиване на образователната и научна степен „доктор”. Забелязани са общо 167 цитата, от които 152 не са използвани при защита на дисертационния ми труд, h-индекс 8.

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

Повишеният интерес към хемоцианините (Хц-те) през последните години се дължи на важната им биологична функция, сложни структури и на възможностите за приложение в медицината и фармацията.

Хц-те са мед-съдържащи кислород пренасящи протеини с изключително висока молекулна маса и сложна четвъртична структура, разтворени в хемолимфата на много артроподни и молюскови организми (мекотели). Повечето от тях са гликопротеини с O- и N-свързани въглехидратни структури. Хц-те не образуват хомогенен клас протеини и в зависимост от структурата си се разделят на два основни класа: Артроподи и Молюски. Въпреки, че двата основни класа хемоцианини изпълняват еднаква физиологична функция, съществуват големи разлики в молекулните им маси, структурна организация, аминнокиселинна последователност и въглехидратно съдържание.

Структурните и биофизични характеристики на Хц-те са интензивно изследвани през последните десетилетия. Хемоцианините от клас молюски са олигомерни протеини с молекулни маси, вариращи от 3,3 до 13,5 MDa. Молекулите им са представени в хемолимфата, като цилиндрични агрегати на декамери, дидекамери или мултидидекамери, изградени от една, две или три структурни субединици (изоформи). Основен елемент на четвъртичната структура на Хц-те от клас молюски е цилиндричен декамер (35-38 nm), образуван от 10 субединици (350-400 kDa) с идентична аминокиселинна последователност (АКП). Независимо от установените разлики в четвъртичната структура на хемоцианините от мекотели, техните структурни субединици са изградени от седем или осем различни функционални единици (ФЕ-и) с молекулна маса 45-65 kDa. Всяка ФЕ включва двойка медни йони в активния си център, свързващи обратимо една молекула кислород.

Важна характеристика на хемоцианините представлява въглехидратната им структура, която има фундаментална роля за структурната им организация, конформационна стабилност,

имунологични свойства и биомедицинско приложение. Проучванията показват, че *N*-глицановите структури на Хц-те имат огромен потенциал за генериране на голям набор от структурни елементи, характерни за въглехидратните структури при еукариотните организми. Хемоцианините от мекотели имат високо въглехидратно съдържание (2-9%), сложни олигозахаридни структури и специфичен монозахариден състав. Ключово значение за антитуморната активност имат *N*-свързаните въглехидратни структури, включващи разнообразни епитопи, които могат да свържат еквивалентни епитопи от повърхността на туморните клетки.

Изследването на конформационната стабилност е от фундаментален интерес 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.

Друг интересен обект на научните ми изследвания са антимикробните пептиди (АМП) – уникална група ендогенни съединения, широко разпространени в природата. АМП са от съществено значение за вродения имунен отговор на организмите от всички клонове и проявяват активност срещу голям брой патогени, като Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии, гъбички, вируси и дори ракови клетки. Повечето АМП, изградени обикновено от 10-50 аминокиселинни остатъка, са амфипатични и хидрофобни α -спирални пептиди, с положително зареден домен, които показват забележително структурно и функционално разнообразие. Досега са открити над 750 различни АМП в много организми, вариращи от насекоми до растения и животни, включително и хора. Поради широкия си спектър на антибиотична активност, противовъзпалителни и имуномодулиращи свойства, АМП се превръщат в модел, за откриването на нови антимикробни лекарства, които могат да отговорят на проблема с нарастващата антибиотична резистентност на патогенни микроорганизми.

Представените резултати в хабилитационната справка са свързани с разработване на методи за изолиране на нови хемоцианини и АМП от мекотели и задълбоченото им охарактеризиране. Друг важен аспект от работата ми е изясняване връзката между структура, функция и биологичната активност на тези молекули. Изследването на въглехидратната структура на хемоцианини от молюски заема важно място в научните ми изследвания и е естествено продължение на дисертационния ми труд.

Научните ми изследвания могат да бъдат тематично обобщени в следните направления:

I. Изолиране, пречистване и характеризирание на хемоцианини от мекотели

Биоразнообразието на хемоцианините е предпоставка за откриване на нови структури, с по-широк спектър биологична активност. Въпреки големия брой изучени хемоцианини, много малко са данните за хемоцианини от семейство Helicidae, род *Helix*. До сега е установено, че хемоцианини изградени от три субединици са изолирани само от градински охлюви *H. pomatia* и *H. aspersa*. Ето защо, научните ми интереси са свързани с изолиране, охарактеризиране и изучаване на структурата на нови хемоцианини с три субединици - *Helix lucorum* (HIL) и *Cornu aspersum* (CaH), наричан още *H. aspersa*.

1. Изолиран и охарактеризиран е нов хемоцианин от хемолимфата от градинския охлюв *H. lucorum*, изграден от три различни структурни субединици, с молекулни маси 1068 kDa (β с-HIH) и 1079 kDa (α _D-HIH и α _N-HIH), които корелират добре с масите на структурните субединици на HрН, от същото семейство Helicidae. (№ 1, № 2)
2. За първи път, чрез трансмисионна електронна микроскопия (ТЕМ), е показана четвъртичната структура на олигомерния HIH и неговите изоформи, изградени предимно от дидекамери, типични за повечето гастроподи. Установени са и тридекамерни структури в нативната молекула на HIH, получени от свързването на един дидекамер с друг декамер. Структурата на мултимерните протеинови комплекси на HIH е допълнително потвърдена с различни методи, като UV-абсорбционна спектроскопия, флуоресцентен анализ и кръгов дихроизъм (CD). (№ 1)
3. Приложен е нов подход за изолирането на трите субединици от нативния хемоцианин HIH, който се основава на различното им поведение на утаяване и кристализация при диализа срещу натриево-ацетатен буфер, с ниска йонна сила. Това позволява изолиране на β с-HIH под формата на кристална утайка и пречистване на DEAE Sepharose CL-6B колона. Двете α -изоформи (α _D-HIH и α _N-HIH) от супернатантата, са изолирани и пречистени чрез анионообменна хроматография на колона Flow Sepharose Q на FPLC. (№ 1, № 2)
4. Установена е съществена разлика в структурната организация на HIH в сравнение с други Хц-ни от молюски, които са представени от една или две структурни субединици. Безспорно доказателство за структурата на HIH са определените N-крайни АКП на три различни структурни субединици (β с-HIH, α _D-HIH и α _N-HIH) чрез Едманово разграждане. От сравнителният анализ с N-крайните последователности на други хемоцианини от мекотели (*R. venosa*, *H. tuberculata*, *O. dofleini*, *N. Pompilius*, *A. Californica* и *H. pomatia*) е устано сходство около 50-67% и наличие на –LVRKNVDXLT– консервативен фрагмент. Определени са три изоелектрични точки (pI), за α _D-HIH, α _N-HIH и β с-HIH чрез 2D-гел електрофореза, които са различни от pI на трите изоформи на хемоцианите HрН и HaH. Демонстрирано е, че изоформи α _D-HIH и β с-HIH са кисели протеини с pI = 4.3 и 5.2, докато α _N-HIH е неутрален протеин с pI = 7.0 (№ 1).
5. Детайлно е охарактеризирана третичната структура на β с-HIH, след ограничена протеолиза с ниски концентрации трипсин, като получените структурни фрагменти са изолирани на FPLC и пречистени на RP-HPLC. Идентифицирани са осем различни функционални единици, чрез техните N-крайни АКП и молекулни маси от 47 до 55 kDa, определени от SDS-PAGE и MALDI-MS анализ. Установено е, че N-крайните АКП на ФЕ-ци от HIH имат по-висока хомоложност с ФУ-ци на АрН, отколкото с HтН. Идентифициран е общ фрагмент (-Val-Arg-Lys-Asp-), типичен за хемоциани от мекотели. (№ 1)

За целите на изследванията са изолирани нативният хемоцианин RvH (*R.venosa*) и неговите две структурни субединици (RvH1 и RvH2), нативният хемоцианин CaH (*Cornu aspersum*), структурна субединица HтH1 и гликозилирана функционална единица RvH2-е, като за целта са използвани различни методи и хроматографски техники. (№2, №3, № 4, №5, №6, №7)

II. Определяне на въглехидратните структури на хемоцианини от мекотели

Гликозилирането е една от най-важните посттранслационни модификации, открити в

природата и има ключова роля за стабилността и функцията на протеините. Значението на гликозилирането при хемоцианините като фактор за техните имуностимулаторни свойства е демонстрирано от изследванията на изоформите KLH1 и KLH2 на хемоцианин от *Megathura crenulata*, широко използван в експерименталната имунология и клиничната практика. Клиничният успех на KLH при пациенти с карцином на пикочния мехур се основава на присъствието на Gal(β 1-3)GalNAc епитоп, който кръстосано реактивно се свързва с еквивалентен епитоп на повърхността на туморните клетки на пикочния мехур.

Въпреки, че е известно значението на въглехидратната структура за имунологичните и антитуморни свойства на Хц-ни от молюски, тя все още не е добре изучена. Ето защо, важно място в научните ми изследвания, заема характеризирането на въглехидратната структура на хемоцианини, изолирани от мекотели.

Структурните субединици на три различни хемоцианини β с-НН (*H. lucorum*), HtH1 (*H. tuberculata*) и RvH2 (*R. venosa*) са дегликозирани със специфична ендогликозидаза PNGase F. Получените *N*-гликани, пречистени от реакционната смес чрез твърдофазова екстракция на CarboGraph колона са анализирани чрез различни масспектрометрични методи. **(№ 3, № 4, № 5)**

1. Доказано е голямо структурно разнообразие на *N*-гликани в три изоформи на различни хемоцианини от молюски (β с-НН, HtH1 и RvH2), след интерпретация на MS спектрите от MALDI-TOF-MS и MS/MS спектрите от ESI-Q-Trap. **(№ 3, № 4, № 5)**

2. Определените олигозахаридни структури на β с-НН (32 гликани), HtH1 (15 гликани) и RvH2 (28 гликани) разкриват сложен модел на гликозилиране, комбиниращ типични структурни особености на различни висши организми (хора, бозайници, растения, насекоми, нематоди, трематоди). Тези резултати имат фундаментално значение и разширяват познанията за разнообразието на *N*-гликановите структури на хемоцианини. **(№ 3, № 4, № 5)**

3. Обогатена е базата данни на природните въглехидратни структури, с нови структурни мотиви, открити в β с-НН и HtH1. **(№ 3, № 4)** Потвърден е нов важен клас *N*-гликани за хемоцианините, включващ вътрешен Fuc остатък, свързан с един GalNAc(β 1-2) и един остатък хексуронова киселина (HexA), в структурната субединица RvH2. **(№ 5)** Подобна структура не е установена в *N*-гликани на HtH1 и β с-НН. Очевидно, този важен клас кисели гликани е характерен само за хемоцианин от *R. venosa*. **(№ 2, № 3, № 4, № 5)**

4. Построените структурни 3D-модели демонстрират, че потенциалните центрове на гликозилиране и олигозахаридните вериги са изложени на повърхността на функционалните единици. Тези данни показват важната им роля при формирането на четвъртичната структура на хемоцианите, тъй като могат да затруднят образуването на по-дълги мултидекамери и тубули. **(№ 3, № 4)**

N*-гликанови структури, определени в структурната субединица β -НН на хемоцианин, изолиран от градински охлюв *H. lucorum

- Определени са 32 структури на *N*-гликани със състав Hex₃₋₇HexNAc₂₋₅MeHex₀₋₄Pent₀₋₁Fuc₀₋₁. Показани са три основни модификации на пентазахаридната сърцевина: β 1-2-свързана Хyl при β 1-4-Man, α 1-6-фукозилиране на вътрешния GlcNAc-остатък (Asn-свързан GlcNAc) и метилиране на Man-остатък. Установени са предимно моно- и би-антенни структури на *N*-

гликани от високоманозен и комплексен тип, както и две структури от хибриден тип с/или без α 1-6-Fuc модификация. Подобни хибридни структури досега са идентифицирани само в KLN и са нетипични за повечето хемоцианини. (№ 3)

- Метилирането на въглехидратните остатъци е необичайна модификация. Известно е, че при бозайниците подобна модификация не се среща, но се наблюдава при други организми, като нематоди и мекотели. Установена е висока степен на метилиране в олигозахаридните структури на β c-HIH. Повечето от идентифицираните гликани съдържат предимно крайни MeHex остатъци, но в някои структури е показан и вътрешен MeHex-остатък, какъвто до момента е определен само в хемоцианин от *H. pomatia* (HrH). Открити са нови структурни мотиви с частично или напълно метилирани крайни хексози, като: MeHex(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3), Hex(β 1-3)GalNAc(β 1-4)GlcNAc(β 1-2), MeHex(β 1-3)-[Hex(β 1-6)-]-MeHex(β 1-3)GalNAc и Hex(β 1-3)[Hex(β 1-6)]GalNAc(β 1-4)GlcNAc(β 1-2), които не са установени досега в други хемоциани от мекотели. (№ 3)

- Идентифицирани са 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 c-HIH. (№ 3)

- Изолирани и пречистени са няколко гликопептида чрез RP-HPLC, след трипсинолиза на структурната субединица β c-HIH. Структурите са анализирани чрез μ LC/ESI-MS и μ LC/ESI-CID-MS. Определени са два гликопептида от олигоманозен тип с маси 2745.12 Da и 2907.10 Da, и гликанови структури Hex₅Man₃HexNAc₂ и Hex₆Man₃HexNAc₂, съответно. (№ 2)

- Построеният 3D-модел на ФЕ β c-HIH-g показва, двата центъра на гликозилиране и разположението на олигозахаридните вериги, изложени на повърхността в двата домена на функционалната единица. (№ 3)

N-гликанови структури, определени в структурната субединица HtH1 на хемоцианин, изолиран от *Haliotis tuberculata*

- За първи път е определена олигозахаридната структура на субединицата HtH1, чрез прилагане на два основни подхода за идентифициране на изолираните гликани. Първият, включва MALDI-TOF-MS анализ на гликаните преди и след третиране със специфичните екзогликозидази β 1-3,4,6-галактозидаза и α 1-6(>2,3,4) фукозидаза, а вторият - секвентен анализ, въз основа на MS/MS-спектри, получени чрез тандем мас-спектрометрия на ESI-Q-Trap. Показаните 15 олигозахаридни структури от високоманозен и комплексен тип се основават на резултатите от приложените два подхода. (№ 4)

- Открит е нов структурен мотив при хемоцианини от клас молюски: MeHex[Fuc(α 1-3)-]GlcNAc, включващ MeHex и (α 1-3)-Fuc остатък, свързан с вътрешен GlcNAc остатък в олигозахаридната верига. Показано е, че N-гликаните на HtH1, съдържат предимно един или два крайно свързани MeHex-остатъци, характерно за повечето хемоцианини от молюски. (№ 4)

- Установени са структури с висока степен на фукозилиране, включващи (α 1-3)-Fuc свързан към вътрешен HexNAc-остатък в олигозахаридната верига и (α 1-6)-Fuc-свързан към крайния GlcNAc-остатък на пентазахаридната сърцевина (-GlcNAc-Asn). Идентифициран е само един гликан с модификация (β 1-2)-Xyl свързан към β 1-4-Man от пентазахаридната сърцевина. (№ 4)

Наличието на (β 1-2)-Xyl и (α 1-3)-Fuc остатъци са относително често срещани в гликопротеини от растения и насекоми, но много рядко се откриват в животински гликопротеини. α 1-6-Фукозилираните *N*-гликани са широко разпространи в различни гликопротеини при бозайници, но има малко информация за тази модификация при сухоземни охлюви.

- Показани са потенциалните центрове на гликозилиране и разположението на олигозахаридните вериги на повърхността на молекулите, въз основа на построените 3D-модели на функционалните единици на HtH1. Изказано е предположение за обяснение на факта, че HtH1 не е в състояние да образува мултидекамерни структури *in vivo*, което може да се дължи на изложените на повърхността олигозахаридни вериги на FE-h, които възпрепятстват образуването на стабилни мултидекамери (№ 4)

N-гlikанови структури, определени в структурна субединица RvH2 на хемоцианин, изолиран от морски охлюв *R. venosa*

- Получена е високо хетерогенна смес от *N*-гликани след дегликозилиране на структурната субединица RvH2 с ендогликозидаза PNGase F. Установени са 28 олигозахаридни структури от високоманозен и комплексен тип със състав Hex₀₋₉ HexNAc₂₋₄ Hex₀₋₃ Pent₀₋₃ Fuc₀₋₃, чрез ESI-Q-Trap. (№ 5)

- Открита е нов тип въглехидратна структура, с вътрешен фукозен остатък, свързващ една GalNAc (β 1-2) и една хексуронова киселина (HexA) в RvH2. Това е потвърждение за нов важен клас *N*-гликани в хемоцианини от молюски. (№ 5)

- Приложен е оригинален подход за разграничаване на HexA и MeHex остатъци, които се различават само с 0.036 Da. Амидирането на гликановата смес води до превръщането на карбоксилната група на HexA в амид, а MeHex-остатък не се променя. Анализът на гликаните преди и след амидиране чрез MALDI-MS показва, че молекулните йони на два гликана се редуцират с ~1 Da. По този начин са идентифицирани 2 гликана, съдържащи HexA остатък и 3 гликана с MeHex остатъци. (№ 5)

- Изследвана е активността на гликозилирани и негликозилирани форми на хемоцианини от молюски HtH и RvH и един артроподен хемоцианин от *C. aestuarii* срещу *Herpes simplex* вирус тип 1 щам Vic (HSV тип 1). За първи път е показан антивирусен ефект на една гликозилирана функционална единица RvH1-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)

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

1. Поповедението на дисоциация/реасоциация на нативните хемоцианини изолирани от градински охлюви *H. lucorum* (HtH) and *C. aspersum* (CaH) и структурните субединици (β S-HtH, α D-HtH и α N-HtH) е анализирано чрез трансмисионна електронна микроскопия. Установено е, че реасоциацията на изследваните хемоцианини протича различно, но зависи от pH на разтвора и концентрацията на Ca²⁺ и Mg²⁺ йони. (№ 1, № 6)

- По-високите концентрации на Ca²⁺ и Mg²⁺ йони водят до по-бързо реасоцииране на HtH и CaH в резултат на което се формират стабилни мултидекамери с различна дължина и при двата

хемоцианина, при нито един от тях не са установени спирални тубули. (№ 1, № 6)

- Трите структурните субединици (β -Hh, α -Hh и α -Hh), демонстрират различно поведение в сравнение с нативните хемоцианини (Hh и CaH), като се реасоциират предимно в дидекамери и тубули. Установено е, β -Hh образува по-дълги и стабилни тубули в сравнение с α -Hh. Подобен капацитет за образуване на тубули се наблюдава и при други хемоцианини от молюски, като *R.venosa* и *H. pomatia*. (№ 1, № 6)

2. Досега не е обяснен факта, защо някои хемоцианини образуват дълги мултикамери или тубули, други формират много къси такива, а при някои хемоцианини се наблюдават дидекамери, или само декамери, както при хитоновите коремоноги. Изказано е предположение за връзката между гликозилирането и образуването на декамери и мултидекамери, 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)

3. Изследвани са конформационните промени на нативния CaH и една функционална единица RvH2-е в широк pH-температурен интервал, при чрез CD спектроскопия. (№ 6, № 7)

- Сравнително малки промени на елиптичността $[\theta]_{222}$ дори при високи температури (над 80°C) показват, че много елементи на вторичната структура са запазени и за двата протеина, особено при неутрално pH. (№ 6, № 7)

- От анализа на конформационните промени в широк pH-температурен интервал, е установено, че олигомерният CaH е с по-висока термостабилност от ФЕ RvH2-е, което може да се обясни с образуването на четвъртичната структура и действието на допълнителни стабилизиращи фактори, като например не-йонни взаимодействия. (№ 6, № 7)

- Установено е, че термично разгъване на олигомерния хемоцианин CaH е необратим процес и механизмът му има сложен характер. (№ 6)

4. Сравнени са конформационните промени на нативната молекула CaH и една ФЕ RvH2-е. Показани са областите, в които процесите на температурно и pH-зависимо разгъване на изследваните протеини могат да протекат обратимо, въз основа на построените pH-T фазови диаграми. (№ 6, № 7)

- Установено е, че нативната молекула CaH има малък интервал на частична обратимост, около pH 5.5 при 25°C. За разлика от CaH, за ФЕ RvH2-е е определен сравнително широк pH-интервал на обратимост между 5.5-7.0, при 25°C. (№ 6, № 7) След анализа на температурните преходни при различни pH за RvH2-е е установено, че с повишаване на температурата между 25-55°C, обратимостта се увеличава и „отваря прозорец на обратимост“ в диапазона pH 5.5-9.0, за който при стандартна температура са изчислени термодинамичните функции ΔH° и $\Delta G^\circ_{\text{exp}}$. Сравнително високата стойност на специфичния топлинен капацитет ΔC_p ($\Delta C_p = 0.550$ kcal/mol.grad) е в съответствие с разгъването на хидрофобната природа на RvH2-е в процеса на денатурация. Установено е че, кривата на свободната енергия на Гибс на обратима денатурация на RvH2-е [$\Delta G^\circ_{\text{exp}}(\text{pH})$] е pH-зависима, с минимум при pH 7.6 ($\Delta G^\circ_{\text{exp}} = 33.4$ kcal/mol), а енталпията при стандартна температура (ΔH°) е pH-независима, което е характерно за процесите на хидрофобно пренареждане на четвъртичната структура. (№ 7)

6. За първи път е изследвана конформационната стабилност на нативния СаН във водни разтвори в присъствието на нарастващи концентрации на четири различни денатуранти (Gdn.HCl, урея, урея + LiCl и LiCl) 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. **(№ 6)**

7. Определена е свободната енергия на стабилизация във вода ($\Delta G_D^{H_2O}$) на нативния СаН, която е в добро съответствие с резултатите на други изследвани Хц-ни. Конформационната стабилност на СаН към различни денатуранти (в диапазона 15.48–16.95 kJ.mol⁻¹) показва, че хидрофилни и полярни сили стабилизират четвъртичната структура, подобно на KLN и RvH. Представените резултати ще улеснят по-нататъшното проучване на свойствата и потенциалните приложения на СаН. **(№ 6)**

IV. Изолиране и характеризирание на антимикробни пептиди

Антимикробните пептиди са уникална и разнообразна група от амфипатични молекули, които имат голям потенциал за използване в нови антимикробни лекарства, тъй като много от тях показват силно изразена цитотоксичност срещу голям брой резистентни към лекарства бактерии.

1. Изследвана е антимикробната активност на различни пептидни фракции, изолирани от слузта на градински охлюв *C. aspersum* срещу грам-отрицателен бактериален щам *Escherichia coli* NBIMCC 8785. Само фракцията под 10 kDa проявява значителна антибактериална активност. За да се обясни наблюдаваният ефект, фракцията е пречистена на RP-HPLC и елуираните 23 пептидни фракции са анализирани чрез тандем мас спектрометрия. **(№ 8)**

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. Установено е, че повечето от тях съдържат високо ниво на Gly и Leu остатъци и принадлежат към нов клас АМП богати на Gly/Leu. Повечето от идентифицираните пептиди, съдържат един или два Pro-остатъка, вмъкнати в последователностите на α -спиралата на С-крайната област и само един пептид има Pro-остатък в N-края, което вероятно е важно за антимикробната им активност и структурна стабилност. **(№ 8)**

ПЕРСПЕКТИВИТЕ ЗА НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРЕЗ СЛЕДВАЩИТЕ 3 ГОДИНИ

Изследователската ми работа ще продължи по гореописаните направления, като ще бъде надградена с нови обекти и разработване на нови подходи за изолиране и охарактеризиране на гликопротеини и АМП.

Перспективите за изследователската ми работа са тясно свързани с участието ми в следните изследователски проекти:

1. ФНИ ДН 01/14 (2016-2020) „Протеомен анализ на нови природни пептиди с антибактериална и противогъбична активност, изолирани от охлюв *Cornu aspersum*“.
2. ФНИ Б 02/275 (2015-2020). “Антитела с индуцирана полиспецифичност – роля в имунната хомеостаза и лечебен потенциал“.

3. ФНИ ДН 03/13 (2016-2020) „Промени в състава и термодинамичните свойства на мозъчния протеом при невродегенеративни нарушения - връзка на екзотермните процеси в протеома с механизма на формиране на плаки”.
4. ФНИ ДН 11/10/ (2017-2021) “Състояние на покой при *Saccharomyces cerevisiae* – модел за изследване на токсикологичен и стресов отговор”.
5. ФНИ КП-06-ОПР-03/10 от 20.12.2018 г. (2018-2021)“Разработване и валидиране на ин силико метод за идентифициране на биотерапевтици в пептидни смеси с природен произход”.
6. ФНИ КП-06-21/13 от 18.12.2018 г. (2018-2021),“Нови ензими от групата на сиалидазите при филаментозни гъби”.
7. FWO (2018-2021) Белгия, „Proteomics investigation of the antibacterial effect of molluscan bio-active peptides”.

Националната научна програма

1. ДО1-217/30.11.2018 (2018-2022) Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед)”.

Център по компетентност

1. BG05M2OP001-1.002-0012-C02, 2018 „Устойчиво оползотворяване на био-ресурси и отпадъци от лечебни и ароматични растения за иновативни биоактивни продукти”.
2. BG05M2OP001-1.002-0019-C02, 2018 „Чисти технологии за устойчива околна среда – води, отпадъци, енергия за кръгова икономика”.

Представените проекти очертават двете основни теми в бъдещата ми работа:

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.

Списък на представените публикации:

1. **Velkova, L.**; Dimitrov, I.; Schwarz, H.; Stevanovic, S.; Voelter, W.; Salvato, B.; Dolashka-Angelova, P. „*Structure of hemocyanin from garden snail *Helix lucorum**“ Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochem. and Mol. Biology **2010**, 157(1), 16-25.
2. Dolashka, P.; **Velkova, L.**; Iliev, I.; Beck, A.; Dolashki, A.; Yossifova, L.; Toshkova, R.; Voelter, W.; Zacharieva, S. „*Antitumor activity of glycosylated molluscan hemocyanins via Guerin ascites tumor*“ Immunological Investigations **2011**, 40(2), 130-149.
3. **Velkova, L.***; Dolashka, P.; Van Beeumen, J.; Devreese, B. „*N-glycan structures of b-HIH subunit of *Helix lucorum* hemocyanin*“ Carbohydrate Research **2017**, 449, 1-10.
4. **Velkova, L.**; Dolashka, P.; Lieb, B.; Voelter, W.; Dolashki, A.; Van Beeumen, J.; Devreese, B. „*Glycan structures of the structural subunit (HtH1) of *Haliotis tuberculata* hemocyanin*“ Glycoconjugate Journal **2011**, 28, 385-395.
5. **Velkova, L.**; Todorov, D.; Dimitrov, I.; Shishkov, S.; Van Beeumen, J.; Dolashka- Angelova, P. „*Rapana venosa hemocyanin with antiviral activity*“ Biotech. Biotech. Equip. **2009**, 23(2), 606-610.
6. Dolashki, A.; **Velkova, L.***; Voelter, W.; Dolashka, P. „*Structural and conformational stability of hemocyanin from the garden snail *Cornu aspersum**“ Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences **2019**, 74(5-6), 113-123.
7. **Velkova, L.**; Dolashka-Angelova, P.; Dolashki, A.; Voelter, W.; Atanasov B. „*Thermodynamic analysis and molecular modeling of *Rapana venosa* hemocyanin –functional unit RvH2-e*“ Biotech. Biotech. Equip. **2009**, 23(2), 601-605.
8. **Velkova, L.***; Nissimova, A.; Dolashki, A.; Daskalova, E.; Dolashka, P.; Topalova, Y. „*Glycine-rich peptides from *Cornu aspersum* snail with antibacterial activity*“ Bulgarian Chemical Communications **2018**, 50C, 169 – 175.