

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Мариела Константинова Оджакова-Байтошева,  
СУ „Св.Климент Охридски“

на материалите, представени за участие в конкурс  
за заемане на академичната длъжност ‘доцент’

в Институт по Органична химия с Център по Фитохимия (ИОХЦФ), БАН  
в област на висше образование 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 за ‘доцент’, обявен в Държавен вестник, брой 43 от 31.05.2019 г. и в  
интернет-страница на ИОХЦФ, БАН, като кандидат участва гл. ас. д-р Александър  
Долашки от лаб. ХББЕ, ИОХЦФ, БАН.

### 1. Общо представяне на получените материали

За участие в обявения конкурс са подадени документи от **единствен** кандидат гл. ас.  
д-р Александър Долашки от лаб. ХБПЕ, ИОХЦФ, БАН.

Представеният от д-р Александър Долашки 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“. Според  
точковата система, д-р Долашки има 1840 точки и надхвърля изискванията на НАЦИД.

д-р Александър Долашки е публикувал общо 50 научни труда. Приемам за  
рецензиране **24** научни труда. От тях **11 са представени като хабилитационен труд и 13  
са по конкурса**. От останалите 26 - 7 са свързани с дисертацията и 19 са извън  
проблематиката на конкурса. Общото разпределение на 24-те научни труда по съответните  
Q фактори е както следва: Q1 – 7; Q2 – 10; Q3 – 5 и Q4 – 2.

д-р Долашки е съавтор и на **един учебник и едно учебно пособие**.

Предствени са съответните документи за участие в национални и международни  
научни форуми след 2006 г.: **53** национални и международни.

Приложени са и документи за участие и ръководства на проекти, както следва:  
участия в национални научни и образователни проекти – 16, участия в международни  
научни и образователни проекти – 13, **ръководство на национални проекти - 2 и  
ръководство на българския екип в международни проекти – 3**. Привлечените средства  
за института са **300000лв**.

Представен е списък за участие в авторския колектив на **четири патента**.

### 2. Кратки биографични данни на кандидата

Александър Долашки завършва Химико-технологичен и металургичен  
университет, София през 2000 г. с придобита квалификация инженер-химик. От 2001 до  
2005 г. е докторант в Университета на Тюбинген, Германия. През 2005 г. защитава  
дисертационен труд на тема „Структура, функции и свойства на мед-съдържащи  
протеини: хемоцианини и супероксид дисмутаза“. С протокол 26 от 22.11.2006 г., ВАК  
утвърждава получената в Германия ОНС „доктор“ по научната специалност 01.05.10

„Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества“. От 2006 г до сега работи като главен асистент в ИОХЦФ, БАН.

Д-р Долашки има множество сътрудничества по научни проекти и специализации в следните институти: Институт по биохимия, Университет Тюбинген, Германия (2000-2015); Институт по биология, Университет Падова, Италия (2008, 2011); Макс Планк институт и Университет Тюбинген, Германия (2002 и 2011); Университет Гент, Белгия (2005 – 2011); Институт по клетъчна биология, Университет Тюбинген, Германи (2001-2011); Институт по зоология, Университет Маинц, Германия (2011-2013); Университет Киев, Украйна (2011) ; Университет Циндао, Китай (2012).

Като резултат той е придобил високо ниво на компютърна грамотност и значителен опит в експлоатацията на специфично оборудване и машини необходими за провеждане на научните изследвания, като маспектрометър, кръгов дихроизъм, секвенатор и др.

### **3. Обща характеристика на дейността на кандидата**

Представена е разширена хабилитационна справка, която отразява научните приноси, публикувани в 11 научни труда. Отделно за участие в конкурса са приложени още 13 научни публикации, които са реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация с общ ИФ 43. Общият ИФ на всички статии е **80.458**. Представени са и 53 публикувани абстракти от участия в международни и национални научни форуми. д-р Долашки е съавтор и на **един учебник и едно учебно пособие** (Същност и биологично приложение на маспектрометрията).

Всички научни трудове, представени за участие в конкурса, са в областта на биоорганичната химия и по-специално структура и свойства на протеини и гликопротеини.

Основните научни приноси на проведените изследвания могат да бъдат обобщени тематично в следните направления:

#### 1. Изолиране и характеризиране на структурата и свойствата на протеини с един меден йон в активния център – супероксид дисмутази (SOD) - статии №1 и №2 (според номерирането на статиите дадени в справката за приносите и приложенията).

Проведените изследвания предоставят информация за локализацията на нова Cu/Zn-супероксид дисмутаза в нисши еукариоти - гъбичен щам *Humicola lutea* (Cu/Zn-HISOD). Резултатите, основани на електрофоретична подвижност, чувствителност към KCN и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и имуноблотен анализ, подкрепят съществуването на Cu/Zn-SOD в митохондриалното междумембранно пространство (IMS) и в цитозола на клетките. Ензимната активност е почти еднаква в двата компартмента, като по този начин се предполага, че междумембранното пространство може да бъде едно от основните места на излагане на супероксидни анионни радикали. Митохондриалната Cu/Zn-SOD е пречистена и сравнена с цитозолния ензим. Те имат идентична молекулна маса, чувствителност към цианид и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, N-крайна аминокиселинна последователност, места на гликозилиране и въглехидратен състав. Резултатите показват, че една и съща Cu/Zn-SOD функционира както в IMS, така и в цитозола.

Изолирана и характеризирана е супероксид дисмутаза и от гъбичния щам *Aspergillus niger* (Cu/Zn- AnSOD). Чрез Едманово разграждане е определена първичната структура на Cu/Zn-HISOD и Cu/Zn- AnSOD . Чрез MALDI-MS и ESI-MS са определени молекулните им маси (15821 Da и 15912 Da), потвърдени и от изчисленията от аминокиселинните последователности.

Митохондриалната Cu/Zn-SOD от *H. lutea* е първият идентифициран естествено гликозилиран ензим от гъбичен щам. Изолираният ензим от *A. niger* не е гликопротеин, тъй като във въглеводородната верига не е идентифициран N-свързващ център (-Asn-Ile-Thr-). Данните от флуоресцентната спектроскопия и кръгов дихроизъм относно температурната и рН стабилности показват висока стабилност на ензима, което може да се обясни със стабилизиращия ефект на дисулфидния мост.

## 2. Изолиране и характеризирание на структурата и свойствата на протеини с два медни йона в активния център – хемоцианини (статии № 3, 4 и 5)

Изолирани са нови хемоцианини от рак *Eriphia verrucosa* (EvH) и морски охлюв *Rapana venosa* (RvH), обитаващи Черно море и са анализирани чрез маспектрометрия и кръгов дихроизъм. Представена е и допълнителна информация за структурата и свойствата на хемоцианини от Molluscs and Artropods.

За първи път е изолиран артроподен хемоцианин от рак *E. verrucosa* (EvH). Хексамерната четвъртична структура се базира на свързването на шест 75 кДа субединици. Четири структурни субединици (EvH1, EvH2, EvH3 и EvH4) са пречистени чрез йонообменна хроматография и са охарактеризирани. Субединица 3 (EvH3) показва висок процент на съответствие (съответно 75.0, 87.5, 91.7 и 75.0%) в сравнение с N-крайната последователност на субединица 1 от *Cancer pagurus* (Cp1), субединици 3 и 6 от *Cancer magister* (Cm3 и Cm6) и субединица 2 на *Carcinus aestuarii* (CaSS2), съответно. Изолирана е и частична кДНК последователност (1309 bp) на хемоцианин от *E. verrucosa*, кодираща 435 аминокиселини, които показват висока степен на хомоложност (81-84% ) със субединици 3, 4, 5 и 6 от *Cancer magister*. (№3).

Структурата и поведението на асоциация/дисоциация на нативните макромолекулни комплекси на хемоцианини от мекотелите *Octopus vulgaris*, *Sepia officinalis* и *Rapana venosa* и на техните субединици са охарактеризирани с помощта на маспектрометрични техники (електроспрей йонизация (ESI), матрично абсорбционна лазерна десорбция/йонизация (MALDI)) и многоъгълно разсейване на лазерната светлина (MALS). Доказани са разликите в четвъртичните и третични структури на хемоцианините, като само един тип субединица изгражда интактната и дисоциирана молекула на цефалоподния хемоцианин *O. vulgaris* (съответно с Мм 3545 kDa и 359.3 kDa) и *S. officinalis* (съответно с Мм 4134 kDa и 443.8 kDa), докато присъствието на две субединици с различни маси (съответно с Мм 422.8 kDa и 400.0 kDa) са установени за гастроподния хемоцианин *R. venosa*, който агрегира в дидекамери. Разликите в структурните субединици са определени след лимитирана протеолиза с трипсин. Двете субединици на RvH и една изоформа на *S. officinalis* са изградени от осем функционални единици (ФЕ-ци) с молекулни маси ~ 50 kDa, докато седем ФЕци са установени при хемоцианин от *O. vulgaris*. Маспектрометричните изследвания показват гликозилиране, което се потвърждава и от разликата в молекулните маси измерени чрез ESI-MS и изчислени от аминокиселинната последователност (№4).

Изучена е стабилността и поведението на реасоциация на нативните молекули на хемоцианина на *Rapana venosa* и неговите две субединици (RvH1 и RvH2). При наличието на различни концентрации на  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  йони и рН стойности, субединиците се различават не само по дисоциацията си, но и във формирането на спирални тубули и мултидекамери. По-високите концентрации водят до по-бързо реасоцииране на нативната молекула на RvH и нейните субединици, в резултат на което се формират стабилни мултидекамери с различна дължина. RvH1 показва по-голяма стабилност при по-високи

стойности на рН в сравнение с RvH2. Като цяло се установява, че стабилността на свързаните RvH и неговите структурни субединици зависи от рН на средата (№5).

Конформационната стабилност на RvH, изследвана чрез кръгов дихроизъм в широк диапазон на рН-температура, показва запазване на много вторични структурни елементи, дори при високи температури над 80°C и 90°C, особено при неутрално рН. Механизмът на термично разгъване на хемоцианин от градински ихлюв *Carnu aspersumi* (CaH) има сложен характер, като процесът е необратим. Повишената стабилност на интактните хемоцианини и на техните субединици, определени от индуцираните от рН CD преходи (кисела и алкална денатурация), може да се обясни с образуването на четвъртичната им структура (№5 и №6).

Повечето от хемоцианините са гликозилирани и три предполагаеми O-свързващи центъра са идентифицирани в частичната аминокиселинна последователност на EvH, съответно на позиции 444-446, 478-480 и 547-549. По-високата стабилност на нативните хемоцианини от *Eriphia verrucosa* (EvH) и *R. venosa* (RvH), в сравнение с техните субединици, определени чрез кръгов дихроизъм, може да се обясни с образуването на стабилизираща четвъртична структура. Повишаването на стабилността, както на цялата молекула на хемоцианините, така и на изграждащите ги субединици, показани чрез индуцирани от рН CD преходи (кисела и алкална денатурация), също могат да бъдат обяснени с олигозахаридната структура (№3 и №5).

Представените резултати ще улеснят по-нататъшното изследване на свойствата и потенциалните приложения на хемоцианините.

### 3. Изолиране и характеризирание на структурата и свойствата на гликопротеини с три медни йона в активния център – тирозинази (статии № 6, 7, 8 и 9)

За първи път бактериални щамове *Streptomyces albus* и *Laceyella sacchari* са изследвани за тирозиназна активност.

След центрофугиране, утаяване с амониев сулфат и ултрафилтрация, от супернатантите на *S. albus* и *L. sacchari* са изолирани две тирозинази, пречистени на анионообменна колона Servacell DEAE 52 и колона SEC Sephacryl S-100 (№6,7). Молекулните маси на получените ензими (30096 Da и 30910 Da съответно), определени чрез SDS-PAGE, маспектрометричен анализ и анализ на N-крайните аминокиселинни последователности, потвърждават хомоложността им с други тирозинази. Определените с MALDI-MS/MS аминокиселинни последователности SDRQVTTGPFAYRHG, WVGGQMATGVSPN и DTDSGERTGHR на няколко изолирани пептиди показват много голямо сходство с последователностите от базата данни за други тирозинази от *Streptomyces species* (№8). Доказана е монофенолазна и дифенолазна активност на тирозиназата от *S. albus* като ензимната активност се индуцира в присъствието на L-метионин и CuSO<sub>4</sub>. Използвайки дифенол L-DOPA и монофенол L-тирозин като субстрати са определени кинетичните параметри K<sub>m</sub> и k<sub>cat</sub>, както и оптималните рН стойности за активността на пречистените ензими. Бактериалните тирозинази, за разлика от еукариотните организми, не са гликозилирани, като това е потвърдено от орцинол/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> тест (№6,8).

Проведените анализи показват, че *Streptomyces albus* и *Laceyella sacchari* може би са бъдещи източници за по-голямо производство на тирозиназа. Получаването, пречистването и охарактеризирането им е в основата и на три финансирани проекта, ръководени от д-р Долашки (Fund for Scientific Research –Flanders (FWO-Vlaanderen)

VS.016.09N / 2008 (20102012) „Структурно охарактеризиране на бактериални тирозинази от *Streptomyces albus* и *Laceyella sacchari* с биотехнологично значение"; Проект EAP.RIG No 982552 NATO (2007-2009) Изолиране и структурно изследване на бактериални тирозинази за биотехнологично приложение; POSTDOC-06 Стипендия – МОН (2007 – 2009) Изолиране и структурно изследване на бактериални тирозинази за биотехнологично приложение).

Проучена е о-дифенолоксидазната активност (o-diPO) на химически модифицирана функционална единица RvH1-a на хемоцианин от *Rapana venosa* използвайки L-Dopa и допамин като субстрати. Доказано е, че нативната RvH1-a не проявява дифенолоксидазна активност, но след третиране с SDS, трипсин или урея и при различни стойности на pH се превръща в ензимно активна форма. Най-висока индуцирана о-дифенолоксидазна активност е определена след инкубиране на функционалната единица с 3.0 mM SDS, като RvH1-a показва активност и към двата субстрата, допамин и L-Dopa, дължаща се на откриване на активния център на ензима и по-добър достъп на субстратите. Определената стойност на  $K_m$  за SDS-активираната RvH1-a и субстрат допамин е по-висока от публикуваните стойности за хемоцианини от *Helix vulgaris*, *Helix pomatia* и тирозиназата от *Ipomoea batatas*, но е много по-ниска от тирозиназата от *Ilex argentinus* (ST94) и хемоцианина от *Carcinus aestuarii*. Стойността на  $K_m$  на SDS-активирана RvH1-a спрямо L-Dopa е по-висока от тази на хемоцианините от *Helix vulgaris* и *Cancer magister*, но по-ниска от тази на тирозиназата от *Streptomyces albus*. Резултатите демонстрират, че независимо от факта, че хемоцианините и тирозиназите са от семейството на тип-3 медните протеини, които притежават сходна структура на активния си център, разликите в достъпността на субстрата до активните центрове определя и разлика във функциите им (№9).

#### 4. Протеомни анализи на антитуморната активност на хемоцианини (статии №10 и №11)

Изследвано е влиянието на хемоцианини от мекотели *Helix lucorum* (НН), *Rapana venosa* (RvH), *Megatura crenulata* (KLH) и техните функционални единици (ФЕ-ци) върху растежа на човешки туморни клетъчни линии от човешки пикочен мехур CAL-29 и нормална клетъчна линия и T10/29 в сравнение с действието на доксорубицин. Получените резултати показват, че клетъчната линия на човешкия тумор CAL-29 е чувствителна към действието на тестваните хемоцианини и техните изоформи. Показана е дозова и времева зависимост на инхибирането на туморния растеж след инкубиране с НН и функционалните му единици (bc-НН-a и FU bc-НН-h). bc-НН-h показва изненадващо по-силен ефект от третирането с доксорубицин, като се наблюдават апоптотични и некротични клетки. За първи път е предоставена протеомна карта за цитостатичното действие на хемоцианина от *H. lucorum* върху човешката клетъчна линия CAL-29. Идентифицирана е понижена експресия на осем различни протеини, както и повишена експресия на два протеина, с които може да бъде свързана с наблюдаваната апоптоза. Не е установено инхибиране на нормални уроепителни клетки HL10/29 след третиране с НН и изоформите ѝ. Изказано е предположение за специфичната роля на олигозахаридните структури на протеините за тяхното биологично действие срещу рак на пикочния мехур (№10)

За първи път са изследвани антимикробните активности на хемоцианините от мекотелите *R. venosa* и *H. aspersa*. Изолирани са една структурна единица subunit ( $\beta$ c-НаН) и 8 функционални единици (FUs,  $\beta$ c-НаН-a до  $\beta$ c-НаН-h) и са определени N-крайните им

последователности и молекулни маси. Антимикробните тестове показват, че само две ФЕ от *R. venosa* (RvH1-b и RvH1-e) имат нисък инхибиращ ефект върху растежа на бактериалния щам *Staphylococcus aureus*. Интерес представлява структурната субединица  $\beta$ -НаН of *H. aspersa*, която показва силна антимикробна активност срещу растежа на бактериални щамове *S. aureus* и *Streptococcus epidermidis*, но също и срещу *Escherichia coli*. (№ 11).  $\beta$ -НаН има потенциал за включване във фармацевтични препарати и използването ѝ като заместител на обичайно използваните антибиотици, които развиват бактериална резистентност.

Приносите от останалите 13 публикации са в същите научни направления като реабилитационния труд.

Комбинирайки ензимни и неензимни методи са изолирани и пречистени хемоцианини и функционалните им единици от различни източници. Изследвани са техните структури, свойства и функция. (1, 2, 3, 4, 5, и 12). Проведените изследвания доказват гликозилирания характер на хемоцианини от различни организми от Arthropoda и Mollusca. Резултати показват, че въглехидратните части играят основна роля в организацията на структурните единици. Продуцираните хемоцианини от молюски свързват сложни въглехидратни структури с предимно N-свързани гликани. Използвайки различни маспектроскопични техники е доказан хетерогенния характер на гликаните от функционалните единици на хемоцианин от *Rapana* (Hex<sub>0-9</sub> HexNAc<sub>2-4</sub> Hex<sub>0-3</sub> Pent<sub>0-3</sub> Fuc<sub>0-3</sub>). Намерен е нов тип на N-гликан, при който вътрешен фукозен остатък е свързан с GalNAc и една хексуронова киселина (6). Идентифицирани са 15 различни гликанови структури в структурна единица HtH1 на хемоцианин от *Haliotis tuberculata*. Както в повечето хемоцианини от мекотели, гликаните на HtH1 съдържат крайна MeHex. Идентифициран е нов структурен мотив MeHex [Fuc ( $\alpha$ 1-3) -] GlcNAc, свързан с вътрешен GlcNAc остатък (9). Определените специфични позиции на гликозилиране допълват информацията за структурата на хемоцианините, което дава възможност за по-задълбочено вникване в процеса на гликозилиране и изясняване на значението му за тези огромни молекули.

Изследвана е структурната и конформационна стабилност на хемоцианин от градински охлюв *Cornu aspersum*. За първи път е показано поведението му във водни разтвори в присъствие на различни денатуриращи агенти. (12). Клонирани и секвенирани са три структурни единици от градински охлюв *Helix lucorum*. Сравнявайки нуклеотидните им последователности с базата данни за хемоцианини от публикувани секвенции за други мекотели е построено филогенетично дърво, илюстриращо молекулната еволюция на хемоцианините от мекотели (4).

Изолирани, пречистени и характеризирани са супероксид дисмутаза от *Humicola lutea* (7) и L-фенилаланин аминокептидаза от котиледони на *Cicer arietinum* L. (10) и е доказана O-дифенол оксидазната активност на хемоцианини от мекотели (11).

Изследвани са имуно-адювантни свойства на хемоцианините, техните производни и конюгати, свързани с клетъчно медиран имунитет при експериментални животни с асцитен тумор на Guerin. Те активират имунната система на експерименталните животни и биха могли да бъдат включени в състава на неспецифични противотуморни ваксини за повишаване на техните ефекти (8). Цитотоксичната активност на хемоцианина от *Rapana venosa* и неговите структурни субединици са изследвани *in vitro* върху клетъчни линии на рак на пикочния мехур CAL-29, T-24 и нормалната уротелиална клетъчна линия HL 10/29. Наблюдаван е значителен цитотоксичен ефект за функционалната единица RvH1-c за разлика от нативния RvH (13).

Д-р Долашки е съавтор на четири национални патента: „Биоактивен продукт, съдържащ хемоцианин“. Защитен № 66374 Б1 / 31.10.2013 г. ; „Състав за профилактика и

лечение на стомашни заболявания“ Защитен № 2194 В1 / 31.03.2016 г. ; „Биологично активни пептиди от хемолимфата на *Rapana venosa*“. Защитен № 66614 В1 / 31.10.2017 г. и „Състав на биологично активни смеси от слуз на *Helix aspersa* за влагане в хранителни добавки и в козметичната индустрия“. Защитен № 66832 В1 / 04.02.2019г.

Научните приноси на д-р Долашки могат да бъдат групирани като приноси, съдържащи нова и оригинална за науката информация; приноси с потвърдителен характер; приноси с методичен характер и приноси с приложен характер.

За значимостта на научните трудове може да се съди по рейтинга на списанията, в които са публикувани (общ ИФ --**80.458 – 43** за конкурса ) и високата им цитируемост. Намерени са общо над 450 цитата по Scopus (**h-индекс - 14**), като публикациите с които Александър Долашки участва **в конкурса са цитирани 262** пъти от независими автори в престижни международни издания. Д-р Долашки е получил признание сред научните среди у нас и в чужбина. Свидетелство за това са получените самостоятелно и в колектив 18 награди и номинации за такива.

Всички публикации на д-р Долашки са в съавторство. В публикуваните 11 научни труда, представени като хабилитационен труд, Ал. Долашки е първи автор в 8 статии и втори в две от тях, което е показател за личното му участие в изработването им.

Според Ал. Долашки научната му дейност в бъдеще е свързана с участието му в два проекта: Национална научна програма ДО1-2017/30.11.2018, „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед) и Център по компетентност BG05M2OP001-1.002-0019/03.2018 г.–12.2023 г. „Чисти технологии за устойчива околна среда – води, отпадъци, енергия за кръгова икономика“. Научните изследвания са свързани с изолиране на нативните пептиди и гликопептиди от екстракти от мекотели и тяхното характеризиране чрез MALDI-TOF/TOF-MS, Q-Trap MS и MS/MS, и ESI-MS измервания, за които методи д-р Долашки е изключително компететен. Особено внимание заслужава установяването на терапевтичния ефект на биологично-активните вещества и изясняване на механизма им на действие.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Документите и материалите, представени от д-р Долашки 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 представил значителен 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 международни списания с висок рейтинг. Теоретичните му разработки имат практическа приложимост. Научната и методична квалификация на Александър Долашки е несъмнена.

Постигнатите от Александър Долашки 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 убедено своята положителна оценка и да препоръчам на Научното жури да изготви доклад-предложение до Научния съвет на ИОХЦФ-БАН за избор на Александър Долашки на академичната длъжност 'доцент'/ в ИОХЦФ-БАН по професионално направление 4.2 Химически науки: научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества”

15.09.2019 г.

(Проф. д-р Мариела Оджакова)

## **REVIEW**

by Prof. Dr. Mariela Konstantinova Odjakova-Baytocheva,  
Sofia University "St. Kliment Ohridski"  
of the materials submitted for the competition  
to occupy the academic position of 'Associate Professor'  
at the Institute of Organic Chemistry with the Center for Phytochemistry (IOCCP), BAS  
in the field of higher education 4.2 Chemical sciences: scientific specialty "Bioorganic  
chemistry, chemistry of natural and physiologically active substances" for the needs of the  
laboratory "Chemistry and biophysics of proteins and enzymes".

In the competition for 'Associate Professor', announced in the State Gazette, issue 43 of  
31.05.2019 and on the web site of IOCCP, BAS, as a candidate participates Ch. Assistant  
Professor Alexander Dolashki, Ph.D. IOCCP, BAS.

### **1. General presentation of the received materials**

For the participation in the announced competition documents have been submitted by a  
single candidate Assistant Professor Alexander Dolashki, Ph.D. IOCCP, BAS.  
The set of paper materials presented by Dr. Alexander Dolashki is in accordance with the  
Regulations for the Development of the Academic Staff of IOCCP and meets the criteria of the  
IOCCP - BAS for the occupation of the academic position "Associate Professor". According to  
the scoring system, Dr. Dolashki has 1840 points and exceeds the NACID requirements.  
Dr. Alexander Dolashki has published a total of 50 scientific papers. I accept 24 scientific  
papers for review. Of these, 11 are presented as habilitation work and 13 are in the  
competition area. Of the remaining 26 - 7 are related to the PhD dissertation and 19 are out of  
the field of competition. The total distribution of the 24 scientific papers by the relevant  
Quartiles (Q) is as follows: Q1 - 7; Q2 - 10; Q3 - 5 and Q4 - 2. Dr. Dolashki has co-authored  
one textbook and one help textbook. The relevant documents for participation in national and  
international scientific forums after 2006 are presented: 53 national and 51 international.  
Attendance documents and project guides are also attached, as follows: participations in  
national scientific and educational projects - 16, participations in international scientific and  
educational projects - 13, national project management - 2 and leadership of the Bulgarian  
team in international projects - 3. The funds raised for the Institute are BGN 300000.  
A list of four patents is presented.

### **2. Short biography of the applicant**

Alexander Dolashki graduated from the University of Chemical Technology and  
Metallurgy, Sofia in 2000 with a qualification as a chemical engineer. From 2001 to 2005 he  
holds a PhD from the University of Tübingen, Germany. In 2005 he defended his dissertation  
on the structure, functions and properties of copper-containing proteins: hemocyanins and  
superoxide dismutase. By protocol 26 of 22.11.2006, the HAC approves the Doctor's degree  
obtained in Germany in the specialty 01.05.10 "Organic Chemistry, Chemistry of Natural and  
Physiologically Active Substances". From 2006 until now he has been working as a chief  
assistant at IOCCP, BAS.

Dr. Dolashki has numerous collaborations in scientific projects and specializations at  
the following institutes: Institute of Biochemistry, University of Tübingen, Germany (2000-  
2015); Institute of Biology, University of Padova, Italy (2008, 2011); Max Planck Institute

and University of Tübingen, Germany (2002 and 2011); Ghent University, Belgium (2005 - 2011); Institute of Cell Biology, Tübingen University, Germany (2001-2011); Institute of Zoology, Mainz University, Germany (2011-2013); Kiev University, Ukraine (2011); Qingdao University, China (2012).

As a result, he has acquired a high level of computer literacy and considerable experience in the operation of specific equipment and machines needed for research, such as a mass spectrometer, circular dichroism, sequencer, etc.

### **3. Evaluation of the applicant's scientific and applied scientific activity**

An extended habilitation report is presented to reflect the scientific contributions published in 11 scientific papers. In addition to the competition, another 13 scientific publications have been attached, which have been referenced and indexed in world-renowned databases of scientific information with IF ~ 43. The total IF of the articles is **80.458**. 53 published abstracts from participation in international and national scientific forums were also presented. Dr. Dolashki is a co-author of one textbook (Nature and Biological Application of Mass Spectrometry). All the scientific papers submitted for the competition are in the field of bio-organic chemistry and in particular the structure and properties of proteins and glycoproteins.

The main scientific contributions of the conducted research can be summarized thematically in the following directions:

- Isolation and characterization of the structure and properties of proteins with one copper ion in the active center - superoxide dismutases (SOD) - Articles No. 1 and No. 2 (according to the numbering of the articles given in the contribution reference).

Studies have been conducted to provide information on the localization of new Cu/Zn-superoxide dismutase in lower eukaryotes - the fungal strain *Humicola lutea* (Cu/Zn-HISOD). Results based on electrophoretic motility, KCN and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity and immunoblot analysis support the existence of Cu/Zn-SOD in the mitochondrial intermembrane space (IMS) and in the cytosol of cells. Enzymatic activity is almost the same in the two compartments, thus suggesting that the membrane space may be one of the major sites of exposure to superoxide anion radicals. The mitochondrial Cu/ Zn-SOD was purified and compared with the cytosolic enzyme. They have identical molecular weight, cyanide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity, N-terminal amino acid sequence, glycosylation sites, and carbohydrate composition. The results show that the same Cu/Zn-SOD functions in both the IMS and the cytosol.

Superoxide dismutase (Cu/Zn-AnSOD) from the fungal strain *Aspergillus niger* were isolated and characterized. The primary structure of Cu/Zn-HISOD and Cu/Zn-AnSOD was determined by Edman decomposition. The molecular weights (15821 Da and 15912 Da) were determined by MALDIMS and ESI-MS, and confirmed by the calculations for the amino acid sequences.

The mitochondrial Cu/Zn-SOD of *H. lutea* is the first naturally occurring glycosylated enzyme from a fungal strain. The isolated enzyme from *A. niger* is not a glycoprotein since no N-binding center (-Asn-Ile-Thr-) is identified in the carbohydrate chain.

Fluorescence spectroscopy and circular dichroism data on temperature and pH stability indicate high enzyme stability, which can be explained by the stabilizing effect of the disulfide bridge.

- Isolation and characterization of the structure and properties of proteins with two copper ions in the active center - hemocyanins (Articles 3, 4 and 5)

New crustacean hemocyanins *Eriphia verrucosa* (EvH) and Black snail *Rapana venosa* (RvH) were isolated and analyzed by mass spectrometry and circular dichroism. Additional information on the structure and properties of hemocyanins from Molluscs and Artropods is also provided.

Arthropod hemocyanin from *E. Verrucosa* (EvH) was isolated for the first time. The hexameric quaternary structure is based on the binding of six 75 kDa subunits. Four structural subunits (EvH1, EvH2, EvH3, and EvH4) were purified by ion-exchange chromatography and characterized. Subunit 3 (EvH3) showed a high percentage of compliance (75.0, 87.5, 91.7 and 75.0%, respectively) compared to the N-terminal sequence of *Cancer pagurus* subunit 1 (Cp1), *Cancer magister* subunits 3 and 6 (Cm3 and Cm6) and *Carcinus aestuarii* subunit 2 (CaSS2), respectively. The partial cDNA sequence (1309 bp) of *E. verrucosa* hemocyanin encoding 435 amino acids was also isolated, showing a high degree of homology (81-84%) with *Cancer magister* subunits 3, 4, 5 and 6. (№3).

The structure and behavior of the association / dissociation of native macromolecular complexes of hemocyanins from molluscs *Octopus vulgaris*, *Sepia officinalis* and *Rapana venosa* and their subunits are characterized by mass spectrometric techniques (electrospray ionization) and polygonal laser light scattering (MALS). The differences in the quaternary and tertiary structures of the hemocyanins have been demonstrated, with only one subunit type building the intact and dissociated molecule of the cephalopod hemocyanin *O. vulgaris* (respectively with Mm 3545 kDa and 359.3 kDa) and *S. officinalis* (respectively Mm 4134 kDa), while the presence of two subunits of different masses (with Mm 422.8 kDa and 400.0 kDa, respectively) were established for the gastropod hemocyanin *R. venosa*, which aggregates into didecamers.

Differences in structural subunits were determined after limited proteolysis with trypsin. The two subunits of RvH and one isoform of *S. officinalis* are composed of eight functional units (FUs) with molecular masses of ~ 50 kDa, while seven FUs are established in hemocyanin by *O. Vulgaris*. Mass spectrometric studies show glycosylation, which is also confirmed by the difference in molecular weights measured by ESI-MS and calculated from the amino acid sequence. (№4).

The stability and behavior of the reassociation of the native hemocyanin molecules of *Rapana venosa* and its two subunits (RvH1 and RvH2) were studied. In the presence of different concentrations of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions and pH values, the subunits differ not only in their dissociation but also in the formation of helical tubules and multidecamers. Higher concentrations lead to a faster reassociation of the native RvH molecule and its subunits, resulting in stable multidecams of different lengths. RvH1 shows greater stability at higher pH values than RvH2. It is generally found that the stability of bound RvH and its structural subunits is pH dependent. (№5).

The conformational stability of RvH, studied by circular dichroism over a wide pH range, indicates the preservation of many secondary structural elements, even at high temperatures above 80 ° C and 90 ° C, especially at neutral pH. Most of the hemocyanins are glycosylated and three putative O-binding centers are identified in the partial amino acid sequence of EvH at positions 444-446, 478-480 and 547-549, respectively. The higher stability of native hemocyanin *Eriphia verrucosa* (EvH) and *R. venosa*, compared to their

subunits determined by circular dichroism, may be explained by the formation of a quaternary stabilizing structure. The increase in stability, both of the whole hemocyanin molecule and of the subunit constituents shown by pH-induced CD transitions (acidic and alkaline denaturation), can also be explained by the oligosaccharide structure. (№5 и №6).

Most of the hemocyanins are glycosylated and three putative O-binding centers are identified in the partial amino acid sequence of EvH at positions 444-446, 478-480 and 547-549, respectively. The higher stability of native hemocyanins from *Eriphia verrucosa* (EvH) and *R. Venosa* (RvH), compared to their subunits determined by circular dichroism, can be explained by the formation of a stabilizing quaternary structure. The increase in stability, both of the whole hemocyanin molecule and of the subunit constituents shown by pH-induced CD transitions (acidic and alkaline denaturation), can also be explained by the oligosaccharide structure. (3 and 5).

The results presented will facilitate further study of the properties and potential applications of hemocyanins.

- Isolation and characterization of the structure and properties of glycoproteins with three copper ions in the active center - tyrosinases (Articles 6, 7, 8 and 9)

For the first time, bacterial strains of *Streptomyces albus* and *Laceyella sacchari* were tested for tyrosinase activity.

After centrifugation, ammonium sulfate precipitation and ultrafiltration, two tyrosinases were purified from the supernatants of *S. albus* and *L. sacchari*, purified on an Servacell DEAE 52 anion exchange column and SEC Sephacryl S-100 column (No. 6.7). The molecular weights of the enzymes obtained (30096 Da and 30910 Da, respectively), determined by SDS-PAGE, MALDI mass spectrometry and analysis of the N-terminal amino acid sequences, confirmed their homology with other tyrosinases. The amino acid sequences determined by MALDI-MS / MS of the SDRQVTTGPFAYRHG, WVGGMATGVSPN and DTDSGERTGHR amino acids of several isolated peptides show very similarities to the sequences of the database for other tyrosinases from *Streptomyces* species (No. 8). The monophenolase and diphenolase activity of *S. albus* tyrosinase has been demonstrated and the enzyme activity is induced in the presence of L-methionine and CuSO<sub>4</sub>. Using diphenol L-DOPA and monophenol L-tyrosine as substrates, the kinetic parameters K<sub>m</sub> and k<sub>cat</sub> were determined as well as the optimum pH values for the activity of the purified enzymes. Bacterial tyrosinases, unlike eukaryotic organisms, are not glycosylated, as confirmed by the orcinol / H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> test. (№ 6.8).

Analyzes show that *Streptomyces albus* and *Laceyella sacchari* may be future sources of increased tyrosinase production. The preparation, purification and characterization of these tyrosinases are also the basis of three funded projects led by Dr. Dolashki (Fund for Scientific Research–Flanders (FWO-Vlaanderen) VS.016.09N/2008 (20102012) “Structural characterization of bacterial tyrosinases by *Streptomyces albus* and *Laceyella sacchari* of biotechnological importance”; Project EAP.RIG No 982552 NATO (2007-2009) Isolation and structural study of bacterial tyrosinases for biotechnological applications; POSTDOC-06 Scholarship - MES (2007 - 2009) Isolation and structural study of bacterial tyrosinases for biotechnological use).

The o-diphenoloxidase activity (o-diPO) of a chemically modified functional unit RvH1-a of *Rapana venosa* hemocyanin using L-Dopa and dopamine as substrates was studied. Native RvH1-a has been shown to exhibit no diphenoloxidase activity, but after

treatment with SDS, trypsin or urea, and at different pH values, it converts to an enzymatically active form. The highest induced o-diphenoloxidase activity was determined after incubation of the functional unit with 3.0 mM SDS, with RvH1-a showing activity on both substrates, dopamine and L-Dopa due to detection of the enzyme's active center and better access to substrates. The  $K_m$  value for SDS-activated RvH1- $\alpha$  and dopamine substrate is higher than published values for hemocyanins from *Helix vulgaris*, *Helix pomatia*, and tyrosinase from *Ipomoea batatas*, but much lower than tyrosinase from *Illex argentinus* (ST94) hemocyanin from *Carcinus aestuarii*. The  $K_m$  value of SDS-activated RvH1-a relative to L-Dopa is higher than that of hemocyanins from *Helix vulgaris* and *Cancer magister*, but lower than that of tyrosinase from *Streptomyces albus*. The results demonstrate that, despite the fact that hemocyanins and tyrosinases are from the type-3 copper protein family, which have a similar structure to their active center, differences in substrate accessibility to the active centers also determine their function. (№9).

- Proteomic analyzes of the antitumor activity of hemocyanins (Articles 10 and 11)

The effect of hemocyanins of *Helix lucorum* (HIH), *Rapana venosa* (RvH), *Megatoura crenulata* (KLH) molluscs and their functional units (FEs) on the growth of human BAL tumor cells and normal cell bladder CAL-29 was investigated line and T10 / 29 compared with doxorubicin. The results obtained indicate that the human tumor cell line CAL-29 is sensitive to the action of the tested hemocyanins and their isoforms. The dose and time dependence of inhibition of tumor growth after incubation with HIH and its functional units (bc-HIH-a and FU bc-HIH-h) is shown. bc-HIH-h shows a surprisingly stronger effect than doxorubicin treatment, observing apoptotic and necrotic cells. For the first time, a proteomic map for the cytostatic action of *H. lucorum* hemocyanin on the human CAL-29 cell line has been provided. Reduced expression of eight different proteins was identified, as well as increased expression of two proteins that may be associated with the observed apoptosis. No inhibition of normal uroepithelial cells HL10 / 29 after treatment with HIH and its isoforms has been established. The specific role of oligosaccharide structures of proteins for their biological action against bladder cancer has been suggested. (No. 10)

For the first time, the antimicrobial activities of the hemocyanins of the molluscs *R. venosa* and *H. aspersa* were examined. One subunit structural unit ( $\beta$ c-HaH) and 8 functional units (FUs,  $\beta$ c-HaH-a to  $\beta$ c-HaH-h) were isolated and their N-terminal sequences and molecular masses were determined. Antimicrobial tests show that only two FEs of *R. venosa* (RvH1-b and RvH1-e) have a low inhibitory effect on the growth of the bacterial strain *Staphylococcus aureus*. Of interest is the structural subunit  $\beta$ c-HaH of *H. aspersa*, which exhibits strong antimicrobial activity against the growth of bacterial strains of *S. aureus* and *Streptococcus epidermidis*, but also against *Escherichia coli*. (No. 11).  $\beta$ c-HaH has the potential to be incorporated into pharmaceuticals and used as a substitute for commonly used antibiotics that develop bacterial resistance.

Contributions from the other 13 publications are in the same scientific fields as habilitation work.

Combining enzymatic and non-enzymatic methods, hemocyanins and their functional units from different sources are isolated and purified. Their structures, properties and function were investigated. (1, 2, 3, 4, 5, and 12). Studies have shown the glycosylated character of hemocyanins from various organisms from Arthropoda and Mollusca. The results show that carbohydrate moieties play a major role in the organization of structural units. The molluscan

hemocyanins produced bind complex carbohydrate structures to predominantly N-linked glycans. Using the various mass spectroscopic techniques, the heterogeneous nature of the glycans from the functional units of *Rapana* hemocyanin (Hex<sub>0-9</sub> HexNAC<sub>2-4</sub> Hex<sub>0-3</sub> Pent<sub>0-3</sub> Fuc<sub>0-3</sub>) has been demonstrated. A new type of N-glycan has been found in which an internal fucose residue is bound to GalNAc and one hexuronic acid (6). 15 different glycan structures have been identified in the hemocyanin structural unit HtH1 of *Haliothis tuberculata*. Like most molluscan hemocyanins, HtH1 glycans contain terminal MeHex. A novel MeHex [Fuc ( $\alpha$ 1-3) -] GlcNAc structural motif associated with an internal GlcNAc residue (9) has been identified. The specific glycosylation positions identified add to the information on the structure of hemocyanins, which enables a deeper insight into the glycosylation process and clarifies its importance for these huge molecules.

The structural and conformational stability of hemocyanin from garden snail *Cornu aspersum* was investigated. For the first time, its behavior in aqueous solutions in the presence of various denaturing agents is demonstrated (12). Three structural units of the garden snail *Helix lucorum* were cloned and sequenced. Comparing their nucleotide sequences with the hemocyanin database of published sequences for other molluscs, a phylogenetic tree was constructed to illustrate the molecular evolution of the molluscan hemocyanins (4).

The superoxide dismutase from *Humicola lutea* (7) and the L-phenylalanine aminopeptidase from *Cicer arietinum* L. cotyledons (10) have been isolated, purified and characterized, and the O-diphenol oxidase activity of molluscan hemocyanins (11) has been demonstrated.

The immuno-adjuvant properties of hemocyanins, their derivatives and conjugates related to cell-mediated immunity in experimental animals with Guerin ascites tumor have been investigated. They activate the immune system of experimental animals and could be included in non-specific anti-tumor vaccines to enhance their effects (8). The cytotoxic activity of the hemocyanin by *Rapana venosa* and its structural subunits was tested *in vitro* on bladder cancer cell lines CAL-29, T-24 and normal urothelial cell line HL 10/29. A significant cytotoxic effect was observed for the RvH1-c functional unit in contrast to native RvH (13).

Dr. Dolaski is a co-author of four national patents: "Bioactive product containing hemocyanin". Protected No 66374 B1/31.10.2013; "Gastric Disease Prevention and Treatment Composition" Protected No 2194 B1/31.03.2016; "Biologically active peptides from the hemolymph of *Rapana venosa*". Protected No 66614 B1/31.10.2017, and "Composition of biologically active slime mucus mixtures of *Helix aspersa* for use in food additives and the cosmetic industry". Protected No. 66832 B1 / 04/02/2019.

Dr. Dolashki's scientific contributions can be grouped as contributions containing new and original information for science; contributions of a confirmatory nature; methodological contributions and applied contributions.

The importance of scientific works can be judged by the rating of the journals in which they were published (total IF - ~ 80.458 - 43 for the competition) and their high citation. A total of over 450 Scopus citations (h-index - 14) have been found, and the publications with which Alexander Dolashki has participated in the competition have been

cited 262 times by independent authors in prestigious international publications. Dr. Dolashki has received recognition among the scientific community at home and abroad. This is evidenced by the 18 awards and nominations received.

All publications by Dr. Dolashki are co-authored. In the published 11 scientific papers, presented as habilitation work, Al. Dolashki is the first author in 8 articles and the second in two of them, which is an indicator of his personal involvement in their drafting.

According to Al. Dolaski in the future, his scientific activity will be related to his participation in two projects: National scientific program K1-2017 / 30.11.2018, "Innovative low-toxic biologically active precision medicine (BioActMed)" and Competence Center BG05M2OP001-1.002-0019/03.2018-12.2023 "Clean technologies for a sustainable environment - water, waste, energy for a circular economy". Scientific studies are related to the isolation of native peptides and glycopeptides from mollusc extracts and their characterization by MALDI-TOF/TOF-MS, Q-Trap MS and MS / MS, and ESI-MS measurements, for which methods Dr. Dolaski is extremely competent. Particular attention should be paid to establishing the therapeutic effect of biologically active substances and clarifying their mechanism of action.

## **CONCLUSION**

The documents and materials presented by Dr. Dolashki meet all the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria (LDASRB), the Regulations for the Implementation of the LDASRB, the Rules for the Implementation of the LDASRB of BAS and the Regulations of IOCCP-BAS.

The candidate submitted a significant number of scientific papers published after the materials used in the defense of the Doctor 's NSA. The applicant's works have original scientific and applied contributions that have received international recognition as a representative part of them have been published in international journals with a high rating. Its theoretical developments have practical applicability. The scientific and methodological qualifications of Alexander Dolashki are beyond doubt.

The results achieved by Alexander Dolashki in the research activity are fully in compliance with the specific requirements of the IOCCP-BAS Regulations 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, applied and applied contributions contained therein, I find it reasonable to give my positive opinion and to recommend to the Scientific Jury to prepare a report proposal to IOCCp-BAS Scientific Council for the selection of Alexander Dolashki 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 substances

09/15/2019

(Prof. Dr. Mariela Odjakova)