

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Мариела Константинова Оджаква-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**.

Представени 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 статиите 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 характеризирание 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 H₂O₂ 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 H₂O₂, 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 CuSO₄. Използвайки дифенол L-DOPA и монофенол L-тирозин като субстрати са определени кинетичните параметри K_m и k_{cat}, 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/H₂SO₄ 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* (HN), *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 HN и функционалните му единици (bc-HN-a и FU bc-HN-h). bc-HN-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 HN 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 (β c-HaH) и 8 функционални единици (FUs, β c-HaH-a до β c-HaH-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 β -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). β -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* (Hex₀₋₉ HexNAc₂₋₄ Hex₀₋₃ Pent₀₋₃ Fuc₀₋₃). 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 (α 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 характеризирание 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)