

ПРИНОСИ НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ

на гл. ас. д-р, инж. Александър Константинов Долашки

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“.

За участие в конкурса е представена разширена хабилитационна справка, която отразява научните ми приноси, публикувани в 11 научни труда. Представени са и 13 научни труда извън използваните в дисертационния труд за придобиване на образователната и научна степен „доктор“. Общо научните ми трудове са 49, публикувани в списания с импакт фактор и са цитирани 225 пъти. h-индекс10.

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

Един от най-разпространените химични елементи в природата е медта. Медните йони участват в много биологични процеси, включващи пренос на електрони, активиране на кислорода и пренос на кислорода.

Медните протеини са класифицирани като тип I, тип II или тип III в зависимост от обкръжението на металния йон и спектроскопските им характеристики. Ето защо моята работа е продължение на извършените изследвания в дисертационния ми труд, което включва изолиране и характеризиране на медни гликопротеини: супероксид дисмутази, хемоцианини и тирозинази.

Ензимът Cu/Zn-супероксид дисмутаза (Cu/Zn-COD) (тип I), който включва един меден йон в активния център, играе ключова роля за неутрализиране на супероксидния анионен радикал ($\bullet\text{O}_2^-$) и ограничава образуването на водороден пероксид (H_2O_2). Той играе ключова роля в антиоксидантната защита на организма.

Различна функция изпълняват гликопротеини от тип II "хемоцианин", с два медни йона в активния център, които свързват молекула кислород и я пренасят до клетките на респираторните организми. Представената подробна информация за хемоцианини от двата основни вида: Molluscs и Arthropods, показва, че те изпълняват еднаква функция, транспорт на кислорода до клетките, но има значителни различия в структурата и свойствата им.

Друг кислород-свързващ гликопротеин е тирозиназата (тип III) и сродните

катехол оксидази от семейството ензими с три медни йона в молекулата, открити в много видове животни, растения, гъби и бактерии. Те използват фенолоподобни изходни материали за получаване на различни биологично важни съединения, като меланин и други полифенолни съединения.

Медните йони в активния център свързват молекула атмосферен кислород, за да катализират два различни вида ензимни реакции: (I) орто-хидроксилиране на монофеноли (крезолазна активност) и (II) окисление на о-дифеноли до о-дихинони. Сложните механизми в активния център все още са напълно изяснени.

Проведените изследвания показват някои специфични характеристики на хемоцианините и тирозинази, като ензими с фенолоксидазна активност.

Последните години медните гликопротеини се използват за лечение на различни заболявания. Ензимът Cu/Zn-СОД подобрява антиоксидантната защита на пациентите и ускорява процеса на възстановяване, след увреждане на мозъка. Въпреки че има много доказателства за терапевтичния ефект на СОД-зите, тяхното приложение все още е ограничено, поради много малко изолирани естествени гликозилирани СОД-зи и недостатъчно производство на подходящи препарати.

Другите кислород-свързващи медни гликопротеини "хемоцианините" също са широко използвани във фармацевтичната и медицинска области. Те са добре познати като имуностимуланти и носители на хаптени. Областите на приложение на изолирани хемоцианини от мекотели се считат като потенциални нови адюванти за имунизация и възможна имунотерапия на някои видове тумори, като добре изследвания антитуморен ефект на KLN при лечението на рак на пикочния мехур. Хемоцианините от артроподи са подходящи за приложение срещу определени вирусни и бактериални инфекции.

Последно време проучванията върху свойствата и функцията на тирозинази предизвикват огромен интерес, поради значението им за редица биотехнологични приложения. Тирозиназите имат съществено значение за пигментацията, важни фактори за заздравяване на рани и първичен имунен отговор. Те са използвани като фенолни биосензори за свързване на протеини или за отстраняване на феноли от отпадни води.

Въпреки представената информация за значението и различните области на приложение на тирозинази, хемоцианини и Cu/Zn-СОД-зи, то механизмите на проявените ефекти все още не са напълно обяснени, като са направени само предположения. Това изисква откриване и пречистване на нови тирозинази, Cu/Zn-СОД-зи и хемоцианини, които ще допринесат за разширяване на изследванията и

за представяне на допълнителен поглед върху сложната структура на гликопротеините.

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

I. ИЗОЛИРАНЕ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА СТРУКТУРАТА И СВОЙСТВАТА НА ПРОТЕИНИ С ЕДИН МЕДЕН ЙОН В АКТИВНИЯ ЦЕНТЪР - СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗИ (СОД) (статия №1)

1. Проведени са изследвания, които предоставят информация за необичайното местоположение на новата Cu/Zn-супероксид дисмутаза в нисшите еукариоти, като гъбичен щам *Humicola lutea* (Cu/Zn-HiCOD). Пречистените митохондриална и цитозолна Cu/Zn-COD-зи имат идентична молекулна маса, цианидна и H₂O₂ чувствителност, N-крайна аминокиселинна последователност (АКП). Тези открития показват, че Cu/Zn-COD съществува в митохондриалното интермембранно пространство и в цитозола на клетките (**№1**).
2. Два вида супероксид дисмутази, Cu/Zn-COD и Mn-COD, също са изолирани от гъбичния щам *Aspergillus niger* (Cu/Zn-AnCOD) (**№2**). Определените чрез MALDI-MS и ESI-MS молекулни маси, 15821 Da и 15912 Da, за Cu/Zn-COD-зи от двата вида гъбични щамове са потвърдени от изчислените АКП-ти.
3. Първичните структури на Cu/Zn-HiCOD и Cu/Zn-AnCOD, определени чрез Едманово разграждане и масспектрометричен анализ, са изградени от 153 аминокиселинни остатъка, с много висока степен на структурна хомоложност с АКП-ти на други Cu/Zn-COD-зи (**№1 и №2**).
4. Установено е, че митохондриалната Cu/Zn-COD от *H. lutea* е първият идентифициран природно гликозилиран ензим от гъбичен щам. Докато, изолираният ензим от *A. niger* не е гликопротеин, тъй като във въглехидратната верига не е идентифициран N-свързващ център (-Asn-Ile-Thr-).
5. Температурната и рН стабилности, анализирани чрез флуоресцентна спектроскопия и кръгов дихроизъм, потвърждават високата стабилност на ензима, което може да се обясни със стабилизиращия ефект на дисулфидния мост (**№1 и №2**).

II. ИЗОЛИРАНЕ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА СТРУКТУРАТА И СВОЙСТВАТА НА ПРОТЕИНИ С ДВА МЕДНИ ИОНА В АКТИВНИЯ ЦЕНТЪР (ХЕМОЦИАНИНИ) (статии 3,4,5)

Кислородът-пrenaсящите гликопротеини, хемоцианини са разтворени в хемолимфата на артроподни организми и мекотели, свързват два йона в активния център и имат много сложна структура. Изолирани са нови хемоцианини от рак *Eriphia verrucosa* (EvH) и морски охлюв *Rapana venosa* (RvH), обитаващи Черно море, като са анализирани чрез мас спектрометрия и кръгов дихроизъм. Представена е допълнителна информация за структурата и свойствата на хемоцианини от Molluscs and Artropods.

1. За първи път е изолиран артроподан хемоцианин от рак *E. verrucosa*. Мулти-хексамерният молекулен състав (6x75 kDa) е определен с помощта на йонообменна хроматография, като четири структурни субединици (EvH1, EvH2, EvH3 и EvH4) са пречистени и охарактеризирани. Също така е определена частичната сДНК последователност (1309 bp) на хемоцианин от *E. verrucosa*, кодираща 435 аминокиселини от протеин, които са с висока степен на хомоложност със субединица 5 (**№3**).

2. Определянето на 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 масспектрометрични техники (електроспрей йонизация (ESI), матрично абсорбционна лазерна десорбция/йонизация (MALDI)) и многоъгълно разсейване на лазерната светлина (MALS) (**№4**).

3. 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.

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 ФЕ-ци са установени при хемоцианин от *O. vulgaris* (**№4**).

4. Поведението на реасоциация на хемоцианин от морския охлюв *R. venosa* (**№5**), в сравнение с хемоцианите от мекотели, е анализирано чрез електронна микроскопия. По-високите концентрации на Ca^{2+} и Mg^{2+} йони водят до по-бързо реасоцииране на нативната молекула на RvH и нейните изоформи (структурни

субединици), в резултат на което се формират стабилни мултидекамери с различна дължина. Поведението на реасоциация на структурните субединици на двата хемоцианина, в присъствие на различни концентрации на Ca^{2+} и Mg^{2+} йони и рН стойности на разтвора, се различават не само по отношение на протичане на реасоциацията, но и при образуването на спирални тубули и мултидекамери. RvH1 показва по-голяма стабилност при по-високи стойности на рН в сравнение с другите субединици (**№5**).

5. Конформационната стабилност на RvH, изследван 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 *Carni aspersum* (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**).

5. 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 нативния хемоцианин *Eriphia verrucosa* (EvH) и *R. venosa*, в сравнение с техните субединици, определени чрез кръговия 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.

III. ИЗОЛИРАНЕ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА СТРУКТУРАТА И СВОЙСТВАТА НА ГЛИКОПРОТЕИНИ С ТРИ МЕДНИ ИОНИ В МОЛЕКУЛАТА (ТИРОЗИНАЗИ).

(статии № 6,7,8,9)

Бактериите щамове *Streptomyces albus* и *Laceyella sacchari* не са изследвани за тирозиназна активност. Проучванията показват, че те са може би бъдещите източници за по-голямо производство на тирозиназа. Следователно, във фокуса на

три проекта, ръководени от мен, са пречистени и анализирани две бактериални тирозинази от *S. albus* и *L. sacchari* чрез различни методи.

1. След центрофугиране, утаяване с амониев сулфат и ултрафилтрация, от супернатантите на *S. albus* и *L. sacchari* са изолирани две тирозинази на анионообменна колона Servacell DEAE 52 и колона SEC Sephacryl S-100 (**№6,7**). Молекулните маси на получените ензими, съответно 30096 Da и 30910 Da, определени чрез маспектро-метричен анализ и *N*-крайните аминокиселинни последователности потвърждават хомоложността им с други тирозинази.

Също така определените с MALDI-MS/MS аминокиселинни последователности SDRQVTTGPFAYRHG, WVGGMATGVSPN и DTDSGERTGHR на няколко изолирани пептида показват много голямо сходство с последователностите от базата данни за други тирозинази от *Streptomyces species* (**№8**).

2. Бактериалните тирозинази, за разлика от еукариотните организми, не са гликозилирани, като това е потвърждено от орцинол/H₂SO₄ тест.

3. Доказана е монофенолазна и дифенолазна активност на тирозиназата от *S. albus*. Ензимната активност се индуцира в присъствието на L-метионин и CuSO₄, като са определени кинетичните параметри за дифенолните субстрати L-DOPA и допамин, както и за монофенолния субстрат L-тирозин. Установено е, че максималната активност на пречистения ензим при pH 6.8 на разтвора (**№ 6, 8**).

Тези характеристики правят *S. albus* тирозиназа интересен кандидат за бъдещи аналитични и биотехнологични приложения.

4. Хемоцианините и тирозиназите представляват тип III протеини, като химически модифицираната функционална единица (ФЕ) RvH1-а от хемоцианин *R. venosa* проявява ензимна о-дифенолоксидазна активност, в присъствие на субстрати L-Dopa и допамин. Доказано е, че нативната ФЕ RvH1-а не проявява дифенолоксидазна активност, но след третиране с SDS, трипсин, урея и при различни стойности на pH се превръща в ензимно активна форма. Най-висока индуцирана о-дифенолоксидазна активност е определена след инкубиране на ФЕ с 3.0 mM SDS, като RvH1-а показва активност и към двата субстрата, допамин и L-Доба, дължаща се на откриване на активния център на ензима и по-добър достъп на субстратите. Определената стойност на K_m за SDS-активираната RvH1-а и субстрат L-Dopa е по-висока от публикуваните стойности за хемоцианини от *H. vulgaris* и *Cancer magister*, но по-ниска от активността на тирозиназата, изолирана от *Streptomyces albus* (**№9**).

V. ПРОТЕОМНИ АНАЛИЗИ НА АНТИТУМОРНАТА АКТИВНОСТ НА ХЕМОЦИАНИНИ (статии №10 и №11)

Хемоцианините са добре проучени и тяхната антитуморна активност е добре известна. Ето защо растежът на човешки туморни клетъчни линии от човешки пикочен мехур, CAL-29 и T24, е проследен в присъствие на хемоцианини от мекотели *Helix lucorum* (HlH), *Rapana venosa* (RvH), *Megatura crenulata* (KLH) и техните функционални единици (ФЕ-ци) (**№10**).

1. Третирането на двата вида клетки с β -HlH-h показва по-силен ефект от доксорубицина, като се наблюдават апоптотични и некротични клетки. Най-ефективен инхибиращ ефект на CAL-29 туморни клетки е доказан след третиране с β -HlH-h, което вероятно е свързано със специфичната олигозахаридна структура на HlH, предимно с метилирани хексози (**№ 10**).

2. Проследяване на промяната в експресията на протеини в клетките след третиране с хемоцианините е постигнато чрез двуизмерна полиакриламидна гел електрофореза. 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 HlH и изоформите ѝ. Тези резултати предполагат, че гликозилирането на хемоцианините играе важна роля за антитуморната им активност (**№ 10**).

3. За първи път са изследвани антимикробните активности на хемоцианините от мекотелите *R. venosa* и *H. aspersa*. Установен е нисък инхибиращ ефект на ФЕ-ци RvH1-b и RvH1-e върху растежа на бактериалния щам *Staphylococcus aureus*. Интерес представлява структурната субединица β -HlH of *H. aspersa*, която показва силна антимикробна активност срещу растежа на бактериални щамове *S. aureus* и *Streptococcus epidermidis*, но също и срещу Грам⁻ бактерия *Escherichia coli*. Предполагаме, че тази субединица има потенциал да се превърне в заместител на обичайно използваните антибиотици, които развиват бактериална резистентност (**№ 11**).

НАСОКИ ЗА БЪДЕЩА НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКА РАБОТА:

Работата ще продължи главно в две насоки, заложи в участието ми в :

1. 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“.

2. Национална научна програма ДО1-2017/30.11.2018, „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед).

Научните изследвания обхващат :

Направление 1 :

1. Изолиране на нативните пептиди и гликопептиди от екстракти от мекотелни.
 2. Характеризиране на получените природни пептидите и гликопептидите по техните молекулярни маси, аминокиселинни последователности с помощта на мас спектрометрични анализи чрез MALDI-TOF/TOF-MS, Q-Trap MS и MS/MS, и ESI-MS измервания;
 3. Установяване на терапевтичния ефект на биологично-активните вещества и изясняване на механизма на действие;
 4. Анализ на протеомни профили на бактериални, гъбични и туморни клетки за прогнозиране на ефекта на биоактивните съединения (пептиди, гликопептиди, протеини и гликопротеини) след лечението.
- Протеомно профилиране на моделни клетки, третирани с изолирани пептиди с антимикробна активност и моделирани клетки, третирани с комплексите на пептиди и нанодиаменти;

Сравнение на профилите на експресия на протеини на бактериални, гъбични и туморни клетки преди и след третиране с различни биоактивни съединения;

Направление 2 :

Води и Отпадъци има направления „Мониторинг, оценка и идентификация на проблемите” и

1. Определяне на екологичното състояние на водоприемниците (води и седименти);
2. Анализ и ранкиране на въздействието на източници на замърсяване върху екологичното състояние на водни тела.

- 1/ Разработване на иновативни технологии за пречистване на води, съдържащи токсични замърсители със създаване на селективен адаптивен алгоритъм
2. разработване на чисти технологии за преработка на отпадни продукти.

ЛИТЕРАТУРА :

1. Krumova, E., **Dolashki, A.**, Pashova, S., Dolashka, P., Stevanovic, S., Hristova, R., Stefanova, L., Voelter, W., Angelova, M.. Unusual location and characterization of Cu/Zn-containing superoxide dismutase from filamentous fungus *Humicola lutea*. Arch. Microbiol., 189, 2, 2008, 121-130.
2. **Dolashki, A.**, Abrashev, R., Stevanovic, S., Stefanova, L., Ali, S., Velkova, L., Hristova, R., Angelova, M., Voelter, W., Devreese, B., Van Beeumen, J., Dolashka-Angelova, P.. Biochemical properties of Cu/Zn-superoxide dismutase from fungal strain *Aspergillus niger* 26. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 71, 3, 2008, 975-983.
3. **Dolashki, A.**, Radkova, M., Todorovska, E., Ivanov, M, Stevanovic, S., Molin, L., Traldi, P., Voelter, W., Dolashka, P.. Structure and Characterization of *Eriphia verrucosa* Hemocyanin. Marine Biotechnology, 17, 6, 2015, 743-752.
4. Dolashka, P., Franck, Z., **Dolashki, A.**, Laura, M., Pietro, T., Salvato, B.. ESI-MS and MALLS analysis of quaternary structure of molluscan and arthropodan hemocyanins.. J. Mass Spectrometry 47, 7, 2012, 47, 940–947.
5. **Dolashki, A.**, Velkova, L., Atanasov, B., Voelter, W., Stevanovic, S., Schwarz, H., Di Muro, P., Dolashka-Angelova, P.. Reversibility and “pH-T phase diagrams” of *Rapana venosa* hemocyanin and its structural subunits. Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, 1784, 11, 2008, 1617-1624.
6. **Dolashki, A.**, Gushterova, A., Voelter, W, Tchorbanov, B.. Purification and Characterization of tyrosinases from *Streptomyces albus*. Z. Naturforsch, 64 (9-10), 2009, 724-732.
7. **Dolashki, A.**, Voelter, W., Gushterova, A., Van Beeumen, J., Devreese, B, Tchorbanov, B.. Isolation and characterization of novel tyrosinase from *Laceyella sacchari*. Protein Pept Lett. 19(5), 2012, 538-543.
8. **Dolashki, A.**, Gushterova, A., Voelter, W., Tchorbanov B.. Identification and characterization of tyrosinase from *Streptomyces albus* by mass spectrometry. Biotechnol. & Biotechnol. Equip. Special, 23, 2009, 946-950.

9. **Dolashki, A.**, Voelter, W., Dolashka, P.. Phenoloxidase activity of intact and chemically modified functional unit RvH1-a from molluscan *Rapana venosa* hemocyanin. Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology, 160, 1, 2011, 1-7.
10. **Dolashki, A.**, Dolashka, P, Stenzl, A, Stevanovic, S., Devreesse, B, Aicher, WK, Velkova, L, Voelter, W. Antitumor activity of Helix hemocyanin against bladder carcinoma permanent cell lines. Biotechnology & Biotechnological Equipment 33, 2019, 20-32.
11. Dolashka, P., **Dolashki, A.**, Van Beeumen J, Floetenmeyer M, Velkova, L., Stevanovic, S., Voelter, W.. Antimicrobial activity of molluscan hemocyanins from Helix and Rapana snails. Current Pharm. Biotechn, 17(3), 2016, 263-270.