

## РЕЦЕНЗИЯ

от д-р Красимира Николова Идакиева – доцент в Институт по органична химия с  
Център по фитохимия – БАН

на дисертационен труд за присъждане на научна степен „доктор на науките”  
в област на висше образование „Природни науки”, шифър 4.0,  
професионално направление „Химически науки”, шифър 4.2,  
научна специалност „Биорганична химия, химия на природните и физиологично активни  
вещества”

**Автор:** проф. д-р Павлинка Александрова Долашка – Институт по органична химия с  
център по фитохимия – БАН

**Тема:** „Структура и функция на медни гликопротеини, свързващи кислородни  
форми”

### 1. Предмет на рецензиране

Представеният от проф. д-р Павлинка Александрова Долашка комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав на ИОХЦФ, и отговаря на критериите на ИОХЦФ-БАН за придобиване на научната степен „доктор на науките”.

В дисертационния труд са включени 50 научни труда, включително глава от книга, както и 4 кратки съобщения, публикувани в научни списания. Резултатите, включени в дисертационния труд, са представени на 71 научни форуми. Приложен е списък на автори и публикации, цитирали научни трудове, включени в дисертацията, чийто общ брой е 527. Дисертантът е приложил списък на национални и международни проекти, свързани с материала по дисертацията, както и 6 броя заявки за патенти и полезни модели. Приложен е списък с награди, получени от проф. д-р Долашка и научния колектив, който тя ръководи. Представената от проф. д-р Долашка документация по конкурса е добре оформена и съдържа необходимата информация.

### 2. Кратки биографични данни

Проф. д-р Долашка завършва висшето си образование във Висш химико-технологичен институт „Асен Златарев”, гр. Бургас, квалификация „инженер-химик”, през 1980 г. В ИОХЦФ-БАН разработва дисертация на тема “Структурни изследвания върху протеиназа К и сродни ензими със спектрални и кинетични методи” под ръководството на проф. д-р Николай Генов. През 1993 г. придобива научна и образователна степен „доктор”. Хабилитира се като „старши научен сътрудник” II степен („доцент”) в лаб. „Структурен анализ на белтъци” (понастоящем лаб. „Химия и биофизика на белтъци и ензими”) на ИОХЦФ-БАН през 2004 г. От 2014 г. заема академичната длъжност „професор” в лаб. „Химия и биофизика на белтъци и ензими” на ИОХЦФ-БАН. Специализирала е многократно в Университета в гр. Тюбинген, Германия и Университета в гр. Гент, Белгия, което несъмнено е допринесло за повишаване на нейната квалификация.

От тези кратки биографични данни се вижда, че работата на проф. д-р Долашка от защита на дисертацията за получаване на образователна и научна степен „доктор” до настоящия момент, е изцяло в рамките на професионалното направление и научната специалност на обявения конкурс.

### **3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи**

Дисертационният труд на проф. д-р Долашка се отнася до много актуална област на протеиновата и въглехидратна химия, която се занимава с изследване на природни гликопротеини. В последно време интересът към тях непрекъснато расте, както поради доказаното им участие в редица биохимични процеси в растителния и животински свят, така и поради възможностите за практическото им приложение в медицината за лечебни и диагностични цели. Ето защо, изследванията на проф. д-р Долашка, които имат за цел изолиране и характеризирание на нови медни гликопротеини – супероксид дисмутази и хемоцианини, както и определяне на техните въглехидратните структури и влиянието им върху биологичните свойства на протеините, безспорно представляват актуална научна тематика. За постигане на основната цел на дисертационния труд ясно са формулирани пет основни задачи, като тяхното успешно разрешаване е представено в отделните глави на дисертационния труд.

### **4. Познание на проблема**

Литературният обзор обхваща публикуваните научни резултати в изследваната област в общо 441 съвременни литературни източници и е структуриран в отделни раздели, съобразно поставените за решаване задачи в дисертационния труд. Глава I на литературния обзор прави преглед на изследванията върху мед-съдържащите супероксид дисмутази и хемоцианини. Глава II и III на обзора разглеждат публикуваните данни за въглехидратните структури и тяхното влияние върху биологичната активност на гликопротеините. Авторът отбелязва научните постижения в съответните области, като същевременно творчески анализира и посочва нерешените важни въпроси. В глава IV на литературния обзор е обоснована необходимостта от изолиране и структурно характеризирание на нови гликозилирани супероксид дисмутази и хемоцианини, както и от характеризирание на връзката между гликозилираната природа и биологичната функция на тези протеини, което от своя страна ще доведе до по-задълбочено изясняване на терапевтичния ефект и механизмите на действие на новите гликопротеини във връзка с тяхното медицинско приложение.

### **5. Методика на изследването**

В дисертационния труд са използвани редица методи от биохимията, биофизиката и молекулярната биология, които позволяват постигане на поставената цел и получаване на адекватен отговор на поставените за разрешаване задачи. Наред с класическите хроматографски и спектроскопски методи за пречистване и характеризирание на протеини, са използвани нови съвременни методи за анализ, като масспектрометричен анализ, тандем-масспектрометричен анализ, геномен и протеомен анализ, гликомика.

Специфични техники са използвани при определяне на потенциалния терапевтичен ефект на изследваните гликопротеини: антибактериални, антивирусни и антитуморни свойства.

## 6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд, представен от проф. д-р Долашка, обхваща общо 317 страници и съдържа: увод – 2 стр.; използвани съкращения – 3 стр.; литературен обзор – 45 стр.; цел и задачи – 2 стр.; материали и методи – 19 стр.; резултати и дискусия – 145 стр.; изводи – 3 стр.; научни приноси – 2 стр.

Разделът „Материали и методи” оправдано е с по-голям обем, тъй като в него са описани многообразието от методи, използвани в експерименталната работа по дисертацията. Отделено е внимание на новите методи, които през последните години намират все по-голямо приложение в научно-изследователската дейност: геномен и протеомен анализ, масспектрометричен анализ и видове масспектрометри, и др.

Основната част на дисертацията раздел „Резултати и дискусия“ се състои от шест глави, съответно подразделени:

- Изолиране и структурно характеризирание на Cu/Zn-супероксид дисмутази.

В тази глава са описани резултатите от пречистване и структурно характеризирание на нови кислород-свързващи гликопротеини с един меден йон в активния център (Cu/Zn-СОД-зи). Представено е определянето на първичните структури на ензимите, което е важна структурна информация, свързана с тяхната стабилност и функция.

- Хемоцианини от вид Arthropoda – изолиране и структурно характеризирание.

- Хемоцианини от вид Mollusca - изолиране и структурно характеризирание.

В горните две глави е представена огромната експериментална работа извършена за пречистване на хемоцианините от различни организми, принадлежащи към двата подвида, както и тяхното структурно характеризирание – определяне на молекулни маси и N-крайни последователности. Определена е първичната структура на някои представители на подвидовете. Всеки протеин има уникална аминокиселинна последователност, която се определя от нуклеотидната последователност на гена кодиращ този протеин. Въз основа на определената нуклеотидната последователност е изведена първичната структура и потенциалните центрове на гликозилиране на трите изоформи на хемоцианина от *Helix lucorum*.

- Въглехидратни структури на медни гликопротеини (супероксид дисмутази и хемоцианини);

Основната част от дисертационния труд е глава IV, в която са представени получените резултати от работата по определяне на разнообразни сложни въглехидратни структури и центрове на гликозилиране в изследваните гликопротеини. Изследванията са проведени на високо научно ниво при използване на най-нова масспектрометрична техника.

- Функция на олигозахаридните структури в медни гликопротеини, свързващи кислородни форми;

В глава V са изложени резултатите от изследванията на физико-химичните свойства на новите гликопротеини. Изказани са предположения за ролята на гликаните, и тяхното влияние върху структурата, стабилността и функцията на гликопротеините. В тази глава са представени и изследвания върху проявяваната от молюсковите хемоцианини ензимна активност.

- Участието на гликани в потенциален терапевтичен ефект на Cu/Zn-супероксид дисмутази и хемоцианини.

В глава VI са представени установените възможности за терапевтично приложение на изолираните Cu/Zn-супероксид дисмутази и хемоцианини, като нови продукти с антибактериален, антивирусен и противотуморен ефект. Изказани са и предположения за участието на гликаните за потенциалния терапевтичен ефект на гликопротеините.

Дисертационният труд завършва със 17 изводи и със справка за приносите. Изводите кореспондират отлично с представените и обсъдени резултати и представят най-важните научни и научно-приложни постижения в дисертационния труд. Показват, че поставените задачи и цели са изпълнени успешно.

## **7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката**

Дисертационният труд, представен от проф. д-р Долашка, съдържа значителни научни постижения в областта на биоорганичната химия, както и такива с възможност за практическо приложение. Приносите са класифицирани в 4 групи:

- приноси, съдържащи нова и оригинална за науката информация;
- приноси с потвърдителен характер;
- приноси с методичен характер;
- приноси с приложен характер.

Към първата група **приноси, съдържащи нова и оригинална за науката информация**, се отнасят резултатите от изследванията върху Cu/Zn-супероксид дисмутаза, ензим който играе важна роля в антиоксидантната защита като елиминира супероксидните радикали (*публикации 1, 2, 9, 13, 15, 21, 27, 29, 30, 33, 36*). Изолирани и пречистени са нови Cu/Zn-супероксид дисмутази от гъбични щамове *Humicola lutea* 110, *Humicola lutea* 103, *Aspergillus niger* 26 и от дрожди *Kluyveromyces marxianus* NBIMCC 1984. Разработените лабораторни технологии са позволили пречистване на ензимите с висок добив и висока степен на чистота. Супероксид дисмутазите са охарактеризирани структурно с помощта на съвременни методи и техники като: секвентен анализ, маспектрометричен анализ, кръгов дихроизъм, флуоресцентна спектроскопия, атомно-абсорбционна спектроскопия и др. Определени са първичните структури на Cu/Zn-супероксид дисмутаза от *H. lutea* 103, *A. niger* 26 и *K. marxianus* NBIMCC 1984. Посредством молекулно моделиране са построени модели на триизмерната структура на Cu/Zn-супероксид дисмутази, определени са елементи на вторичната структура. Проведен е задълбочен анализ на стабилността на супероксид дисмутазите в зависимост от рН на средата и температурата, както и на факторите които оказват влияние върху стабилността на тези ензими. За първи път са характеризирани въглехидратни структури на природно гликозилирани супероксид дисмутази посредством маспектрометричен анализ (MALDI TOF MS, MALDI TOF TOF и др.). Тези изследвания, изискващи специализирана апаратура, са проведени благодарение на сътрудничеството на проф. д-р Долашка с изследователски центрове в Германия и Белгия.

Към групата приноси, съдържащи нова и оригинална за науката информация, се отнасят и резултатите от изследванията върху кислород-пренасящите протеини, хемоцианини. Изолирани и структурно охарактеризирани са хемоцианини от различни моллюсков и артроподни организми, представена е информация за структурата на въглехидратните вериги, свързани към хемоцианиновите молекули (*публ. 3-7, 9-11, 13, 15, 16, 18, 27, 30, 33, 34, 45*).

В сътрудничество с Университета в гр. Гент, Белгия е определена пълната генна секвенция на две от изоформите на хемоцианина, изолиран от градински охлюви от вида *Helix lucorum* (НН), съответно  $\beta$ -НН и  $\alpha_D$ -НН, и частично на третата ( $\alpha_N$ -НН). Посредством анализ на нуклеотидната последователност е определена тяхната първична структура и потенциалните центрове на гликозилиране (публ. 37). Това несъмнено е най-ефективният подход за определяне на първичната структура на високомолекулни протеини, каквито са хемоцианините. Пълното структурно охарактеризиране на хемоцианина от *H. lucorum* представлява сериозен принос в познанието за кислород-пренасящите протеини от безгръбначни.

Резултатите от изследванията на проф. д-р Долашка върху определяне на въглехидратните структури и установяване на влиянието им върху структурата и свойствата на гликопротеини представляват безспорен научен принос. Определени са центрове на гликозилиране и структурите на въглехидратните вериги в молекулата на хемоцианина от *Rapana venosa* (RvH). На базата на голям брой изследвания са доказани 53 въглехидратни структури от високоманозен и комплексен тип в молекулата на RvH (публ. 18, 21, 30, 31). Описан е нов клас N-гликани при хемоцианините от молюски, включващ хексууронова киселина и GlcNAc, свързани към вътрешен фукозен остатък. Разработен е ефективен метод за определяне и идентифициране на въглехидратни структури на хемоцианини с неизвестна или частично известна първична структура (публ. 21). Установено е, че към полипептидната верига на структурната субединица HtH1 на хемоцианина от *Haliotis tuberculata* (HtH) са свързани 15 гликана, които притежават сложни въглехидратни структури (публ. 39). Предложен е нов спектрален метод за определяне на разположението на гликаните в молюсковите хемоцианини (публ. 43). Определените въглехидратни структури при хемоцианини от вида *Mollusca* обогатяват базата данни за въглехидратни структури на гликопротеини. Резултатите от изследванията на проф. д-р Долашка върху гликопротеини с помощта на масспектрометрия са публикувани в глава от книга (Tandem Mass Spectrometry and Glycoproteins. Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles) (публ. 41). За първи път е изказана хипотеза за участие на гликаните при сформирание на третичната структура на молюсковите хемоцианини (публ. 19).

Резултатите от изследванията на хемоцианина от *R. venosa* и негови подструктури (субединици и функционални единици) посредством кръгов дихроизъм, демонстрират влиянието на четвъртичната структура и олигозахаридите върху стабилитетните им характеристики (публ. 27, 34).

Сериозен принос има проф. д-р Долашка при разкриването на възможности за медицинско приложение на изолираните гликопротеини. Представени са доказателства за влиянието на олигозахаридните структури за инхибиращия ефект на функционални единици срещу репликацията на вируси, туморни клетъчни линии и бактерии (публ. 30, 31, 42, 47).

За първи път е показано участието на молюсковите хемоцианини в защитната функция на организма, като осигуряват първоначална защита срещу инфекциозни патогени. Субединица  $\beta$ -HtH на хемоцианина от охлюви от вида *Helix aspersa* е доказана, като много перспективна за включване във фармацевтични препарати срещу инфекции, причинени от *Staphylococcus* (публ. 47).

Доказана е противотуморната активност на молускови хемоцианини, изолирани от морски и сухоземни охлюви, върху клетъчни линии T-24 и CAL-29 от рак на пикочния мехур. Най-силно изразен ефект е наблюдаван при функционална единица  $h$  на  $\beta$ -НИН. За първи път е предоставена протеомна карта за цитостатичното действие на хемоцианина от охлюви от вида *H. lucorum* върху човешката клетъчна линия CAL-29. Изказано е предположение за специфичната роля на олигозахаридните структури на хемоцианините за тяхното биологично действие срещу рак на пикочния мехур (нубл. 48, 50).

Към втората група **приноси с потвърдителен характер** са отнесени някои резултати от изследванията върху структурата и свойствата на Cu/Zn-супероксид дисмутази от различни източници (нубл. 12, 26). Потвърдена е направената констатация от други автори, че през последните години еволюцията на ензима е достигнала почти константна величина.

Посредством анализ с трансмисионна електронна микроскопия е потвърдена информацията за сложна пространствена структура на молусковите хемоцианини, както и различното поведение на нативните молекули на хемоцианини и техните изоформи, изолирани от различни организми, при промяна на условията на средата: рН, наличие на  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  (нубл. 10, 27, 33). Интерес представлява полученият резултат относно молекулната маса на нативна хемоцианинова молекула RvH ( $8455 \pm 51$  kDa), измерена посредством MALLS анализ, определянето на която, поради големия размер, е затруднено с конвенционалните методи (нубл. 40).

Въз основа на големия брой изследвания върху структурата на гликаните при молусковите хемоцианини RvH и НН, е потвърдено съществуването на предимно N-гликозилирани сложни въглехидратни структури, сходни на наблюдаваните при повечето хемоцианини от вида *Mollusca* (нубл. 18, 21, 30, 31, 39, 49). При хемоцианините от вид *Arthropoda* са доказани и къси O-гликозилирани структури (нубл. 16, 45). Потвърдено е участието на въглехидратните структури в стабилизирането на четвъртичната структура на хемоцианиновата молекула при вида *Mollusca* (нубл. 39).

Получени са потвърдителни данни относно възможностите за приложение на супероксид дисмутази и хемоцианини при създаване на нови подходи за превенция и лечение на вирусни, бактериални и туморни заболявания (нубл. 25, 36, 42, 50).

Към третата група **приноси с методичен характер** се отнасят разработените методи и условия за пречистване на протеините, които са обект на изследване в дисертационния труд. Разработени са нови, ефективни схеми за пречистване на ензимите Cu/Zn-супероксид дисмутази от гъбични щамове и дрожди, в резултат на което са получени електрофоретично чисти и с висока активност ензими (нубл. 1, 26, 29). Изследваните щамове и разработените методи са приложими за индустриално производство на пречистени ензими за нуждите на фармацевтичната и хранително-вкусова промишлености. При изолиране на нативните хемоцианинови молекули, както и изграждащите ги субединици и функционални единици, е използвана течна хроматография (FPLC) с набор от колони с висока разделителна способност: Resource Q, Mono Q HR 10/10, Mono Q HR 16/10, Sepharose Fast Flow Q DEAE-Sepharcel и др. (нубл. 9, 10, 33, 47).

Към тази група приноси се определят и предложените: нов метод за анализ на гликани в смеси; нов подход за определяне на сложни въглехидратни структури и центрове на гликозилиране в изследваните гликопротеини. Разработеният флуоресцентен метод,

представляващ титруване с комплекс от анионно флуоресцентно багрило и o-BBV (N,N'-bis-(benzyl-2-boronic acid)-[4,4']bipyridinium dibromide), е подходящ за откриване на гликани, както и за определяне на тяхното разположение – „изложени” или „погребани” във вътрешността на протеиновата молекула (*публ. 43*). Чрез амидиране и перметилиране на гликаните и MALDI-MS анализ е доказана хексууронова киселина в структурата на гликани от субединиците на хемоцианина от *R. venosa* (*публ. 31*).

Към групата **приноси с приложен характер** се отнасят предложените лабораторни технологии за пречистване на Cu/Zn-супероксид дисмутази и хемоцианини от различни източници, както и показаните в дисертационния труд възможности за използването на тези протеини при лечение на вирусни, бактериални и туморни заболявания. Сериозен принос представлява създаването на гена банка структури (ДНК и РНК) и база от структури на гликани, които могат да бъдат полезни при бъдещи изследвания по тези тематики.

В заключение, представените научните приноси в публикациите на проф. д-р Долашка са новост в науката и имат значим приложен потенциал. За приложния характер на резултатите от изследванията на проф. д-р Долашка свидетелстват създадените 6 броя полезни модели и патенти.

#### **8. Преценка на публикациите по дисертационния труд**

В дисертационния труд на проф. д-р Долашка са включени 50 публикации (с общ импакт фактор 98.359), които са извън включените в дисертацията за „доктор“. Публикациите са резултат на колективен труд, повечето са със 6 – 7 съавтори. Несъмнен, обаче, е приносът и водещата роля на проф. д-р Долашка в публикациите – в 35 от тях тя е първи автор и/или автор за кореспонденция. Резултатите от научноизследователската дейност проф. д-р Долашка са публикувани в авторитетни международни списания в областта: *Biochimica et Biophysica Acta*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *Spectrochimica Acta*, *Carbohydrate Research*, и др. От представената справка за изпълнение на критериите на ИОХЦФ-БАН за научна степен „доктор на науките“ става ясно, че 20 от публикациите са в Q1 област (WoS или Scopus), 18 са в Q2 област, и съответно 8 и 2 са публикациите в области Q3 и Q4. Има 1 публикация в издание със SJR без IF. Една от представените публикации представлява глава от книга: „Tandem Mass Spectrometry and Glycoproteins”, в „Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles, с единствен автор проф. д-р Долашка. В дисертацията са включени и 4 кратки съобщения, публикувани в научни списания, по които са забелязани цитати.

Представени са 83 участия в международни и национални научни форуми, от които 14 устни доклада изнесени на престижни международни форуми. Показателни за международна разпознаваемост и значимост на научните резултати от изследванията на проф. д-р Долашка са големият брой цитирания на нейните трудове. В приложената справка са представени 527 цитирания в WoS или Scopus.

Резултатите, постигнати в дисертацията на проф. д-р Долашка, са свързани с редица национални и международни проекти. Тя е ръководител общо на 21 национални научни или образователни проекти, ръководител е на българския екип в други 21 международни проекти и е участник в 2 международни проекти.

Резултати, постигнати в дисертационния труд, са основа за патенти и полезни модели.

### **9. Лично участие на автора**

Представеният дисертационен труд на проф. д-р Долашка за присъждане на научна степен „доктор на науките” е резултат от почти 20 годишна изследователска дейност. Безспорно е личното участие на дисертанта в проведените изследвания. Формулираните приноси и получени резултати, са резултат от нейното пряко участие в проведените експерименти или от работата на ръководените от нея докторанти. Свиделство за това са и публикациите, които отразяват резултатите по дисертацията – в по-голямата част от тях проф. д-р Долашка е първи или втори автор, и/или автор за кореспонденция.

### **10. Автореферат**

Авторефератът е добре оформен, направен е според изискванията на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ИОХЦФ-БАН, като съдържа целите и задачите, основните резултати постигнати в дисертацията, изводите и приносите на дисертационния труд.

### **11. Критични забележки и препоръки**

Нямам критични забележки към представянето на дисертационния труд и представените по конкурса материали.

### **12. Лични впечатления**

Познавам проф. д-р Долашка от момента на постъпването ѝ в ИОХЦФ-БАН. Моите лични впечатления са, че тя е много работоспособен, целеустремен и отдаден на работата си учен, което несъмнено е довело до значителни постижения, както научи, така и с възможност за приложение в практиката.

### **13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати**

Резултатите от проведените в дисертацията изследвания вече намират своето практическо приложение. Проф. д-р Долашка и ръководеният от нея колектив са носители на 10 национални награди, получени за експлоатация и комерсиализация на научни резултати. Препоръчвам на проф. д-р Долашка да предаде своите знания и богат експериментален опит на млади колеги.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационният труд *съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката* и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ на БАН. Представените материали и дисертационни резултати **напълно** съответстват на специфичните изисквания на Правилника на ИОХЦФ-БАН за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че дисертантът проф. д-р Павлинка Долашка **притежава** задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност „Биорганична химия, химия на природните и физиологично активни



вещества” като **демонстрира** качества и умения за провеждане на изследвания с получаване на оригинални и значими научни приноси.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди научната степен „доктор на науките”** на проф. д-р инж. Павлинка Долашка в област на висше образование: „Природни науки”, професионално направление „Химически науки”, научна специалност „Биорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества”.

30.07.2019 г.

Рецензент:

(доцент д-р Красимира Идакиева)

## REVIEW

by Assoc. Prof. Dr. Krassimira Nikolova Idakieva, Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences

of Doctoral Thesis for awarding a “**Doctor of Sciences**”  
in a field of higher education 4.0. "Natural Sciences",  
professional field 4.2. "Chemical Sciences",  
scientific specialty „*Bioorganic Chemistry, Chemistry of Natural and Physiologically Active Substances*”

**Author:** Prof. Dr. Pavlinka Alexandrova Dolashka, Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, BAS

**Topic:** "Structure and function of copper glycoproteins, binding oxygen forms”

### 1. Subject of review

Presented by Prof. Dr. Pavlinka Alexandrova Dolashka, a set of materials in paper and electronic form, is in accordance with the Rules for the Development of the Academic Staff of the Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences (IOCCP-BAS) and meets the criteria of IOCCP-BAS for acquiring the scientific degree "Doctor of Sciences".

The dissertation includes 50 scientific papers, including a chapter of a book, as well as 4 short papers published in scientific journals. The results, included in the dissertation, are presented in 71 scientific forums. A list of authors and publications quoting scientific papers, included in the dissertation, with a total number of 527, is attached. Prof. Dolashka has applied a list of national and international projects, related to the dissertation material, as well as 6 patent applications and utility models. A list of awards, received by Prof. Dolashka and the scientific team she manages, are attached. The documentation presented by Prof. Dolashka is well-designed and contains the necessary information.

### 2. Brief biographical data

Prof. Dr. Dolashka graduated from Higher Institute of Chemical Technology “Asen Zlatarev”, Burgas, in 1980, with a qualification "engineer-chemist". In 1993, she defended her PhD thesis entitled "Structure Studies on Proteinase K and Related Enzymes with Spectral and Kinetic Methods" (supervisor Prof. Nikolay Genov, IOCCP-BAS). Habilitated as a "senior research associate" II degree (Associate Professor) in Lab. "Structure Analysis of Proteins" (currently Laboratory of "Chemistry and Biophysics of Proteins and Enzymes") of IOCCP-BAS in 2004. Since 2014, she holds the academic position "Professor" in Lab. "Chemistry and Biophysics of Proteins and Enzymes" of IOCCP-BAS. She has specialized many times at the University of Tübingen, Germany and the University of Gent, Belgium, which has undoubtedly contributed to the enhancement of her qualifications.

From these brief biographical data it is evident that the work of Prof. Dolashka from the defense of her PhD thesis till now is entirely within the professional field and the scientific specialty of the announced competition.

### **3. Topicality of the subject and relevance of the objectives and tasks set**

Professor Dolashka's doctoral thesis deals with a very recent area of protein and carbohydrate chemistry, which is concerned with the study of natural glycoproteins. In recent times, interest in them has been growing, both because of their proven participation in a number of biochemical processes in the plant and animal world, and because of the possibilities for their practical application for medical and diagnostic purposes. Therefore, the studies of Prof. Dolashka, which aim is: isolation and characterization of new copper glycoproteins, structure determination of their glycan residues and their influence on the biological properties of the native glycoproteins, are undoubtedly a topical scientific subject. In order to achieve the main goal of the dissertation work, five main tasks are clearly formulated and their successful solving is presented in the individual chapters of the thesis.

### **4. Knowing the problem**

The literary review covers the published scientific results in the field of study in a total of 441 contemporary literary sources and is structured in separate sections, according to the problems solved in the dissertation. Chapter I of the literary review considers the studies on copper-containing superoxide dismutases and hemocyanins. Chapter II and III of the review examine the published data on carbohydrate structures and their effect on the biological activity of glycoproteins. The author notes the scientific achievements in the relevant fields, while creatively analyzing and pointing out the outstanding issues. Chapter IV of the literature review justifies the need to isolate and structurally characterize new glycosylated superoxide dismutases and hemocyanins as well as to characterize the relationship between glycosylated nature and the biological function of these proteins, which in turn will lead to a deeper clarification of the therapeutic effect and mechanisms of action of new glycoproteins in connection with their medical application.

### **5. Methodology of the study**

In the dissertation, a number of methods of biochemistry, biophysics and molecular biology have been used, which allow the achievement of the stated goal and obtain an adequate response to the tasks to be solved. Along with classical chromatographic and spectroscopic methods for purification and characterization of proteins, new advanced methods of analysis such as mass spectrometry, tandem mass spectrometry, genomic and proteomic analysis, glycomics, have been used.

Specific techniques have been applied to determine the potential therapeutic effect of the glycoproteins tested: antibacterial, antiviral and anti-tumor properties.

### **6. Characterization and evaluation of doctoral thesis**

The doctoral thesis, presented by Prof. Dolashka, covers a total of 317 pages and contains: introduction - 2 pages; used abbreviations - 3 pages; literary review - 45 pages; purpose and tasks - 2 pages; materials and methods - 19 pages; results and discussion - 145 pages; conclusions - 3 p.; scientific contributions - 2 p.

The "Materials and Methods" section is justified by a larger volume, as it describes the variety of methods used in the experimental work. Attention is drawn to the new methods, which in recent years have been increasingly used in research: genomics and proteomic analysis, mass spectrometry analysis with various types of mass spectrometers, etc.

The main part of the dissertation, "Results and discussion" section, consists of six chapters, respectively subdivided:

- Isolation and structural characterization of Cu / Zn-superoxide dismutases.

This chapter describes the results of purification and structural characterization of new oxygen-binding glycoproteins with a copper ion in the active site (Cu / Zn-SODs). The determination of primary structures of the enzymes is presented. The primary structure of proteins is important structural information, related to their stability and function.

- Hemocyanins of the *Arthropoda* species - isolation and structural characterization.
- Hemocyanins of the *Mollusca* species - isolation and structural characterization.

The above two chapters present the huge experimental work done for the purification of hemocyanins from different organisms belonging to the two subspecies, as well as their structural characterization - determination of molecular masses and N-terminal sequences. The primary structures of hemocyanins from some subspecies have been determined. Each protein has a unique amino acid sequence that is determined by the nucleotide sequence of the gene encoding this protein. Based on the determined nucleotide sequence, the primary structure and potential glycosylation sites of the three hemocyanin isoforms from garden snails *Helix lucorum* are derived.

- Carbohydrate structures of copper glycoproteins (superoxide dismutases and hemocyanins);

The main part of the doctoral thesis is chapter IV, which presents the results of the work on determination of various complex carbohydrate structures and glycosylation sites in the studied glycoproteins. Research has been conducted at a highly scientific level, using the latest mass spectrometric technique.

- Function of the oligosaccharide structures in oxygen-binding copper glycoproteins;

In chapter V, are presented the results of research on the physico-chemical properties of the new glycoproteins. There are also hypotheses about the role of glycans and their influence on the structure, stability and function of the glycoproteins. This chapter also presents studies on the enzyme activity of molluscan hemocyanins.

- The involvement of glycans in the potential therapeutic effect of Cu / Zn-superoxide dismutases and hemocyanins.

Chapter VI presents the established possibilities for therapeutic use of isolated Cu / Zn-superoxide dismutases and hemocyanins, as new products with antibacterial, antiviral and antitumor effects. Assumptions about the contribution of glycans to the potential therapeutic effect of glycoproteins are discussed.

The doctoral thesis ends with 17 conclusions and a reference to the scientific contributions. The conclusions correspond perfectly to the presented and discussed results, and present the most important scientific and applied research achievements in the dissertation. They show that the assigned tasks and goals are performed successfully.

## **7. Contributions and significance of the work for the science and practice**

The dissertation, presented by Prof. Dr. Dolashka, contains significant scientific achievements in the field of bioorganic chemistry, as well as those with practical applicability. Contributions are classified into 4 groups:

- contributions containing new and original scientific information;
- contributions with a confirmatory nature;

- contributions with a methodical nature;
- contributions with an applied nature.

To the first group of contributions, **containing new and original scientific information**, refer the results of the studies on the Cu / Zn-superoxide dismutase, an enzyme that plays an important role in antioxidant protection by eliminating superoxide radicals (*publications 1, 2, 9, 13, 15, 21, 27, 29, 30, 33, 36*). Isolated and purified are new Cu / Zn-superoxide dismutases from the fungal strains *Humicola lutea* 110, *Humicola lutea* 103, *Aspergillus niger* 26 and the yeast strain *Kluyveromyces marxianus* NBIMCC 1984. Developed laboratory technologies have enabled the purification of enzymes with high yield and high purity. Superoxide dismutases are characterized structurally by modern methods and techniques such as sequence analysis, mass spectrometry, circular dichroism, fluorescence spectroscopy, atomic absorption spectroscopy and others. The primary structures of Cu / Zn-superoxide dismutase from the *H. lutea* 103, *A. niger* 26 and *K. marxianus* NBIMCC 1984. By means of molecular modeling, models of the three-dimensional structure of Cu / Zn-superoxide dismutases are constructed, secondary structure elements are defined. An in-depth analysis of the stability of superoxide dismutases has been carried out, depending on the pH and temperature, as well as on the factors that affect the stability of these enzymes. For the first time, the carbohydrate structures of naturally glycosylated superoxide dismutases are characterized by means of mass spectrometry analysis (MALDI TOF MS, MALDI TOF TOF, etc.). These studies, requiring specialized modern equipment, have been carried out thanks to the collaboration of Prof. Dolashka with research centers in Germany and Belgium.

The results of studies on oxygen-transporting proteins, hemocyanins, also refer to the group of contributions, containing new and original scientific information. Isolated and structurally characterized are hemocyanins from different *Mollusc* and *Arthropod* organisms, information on the structure of carbohydrate chains attached to hemocyanin molecules is presented (*publ. 3 -7, 9-11, 13, 15, 16, 18, 27, 30, 33, 34, 45*).

In collaboration with the University of Gent, Belgium, the complete gene sequence of two of the hemocyanin isoforms isolated from garden snails *Helix lucorum* (HH), respectively  $\beta$ -HH and  $\alpha_D$ -HH, and partly of the third one ( $\alpha_N$ -HH). By means of analysis of the nucleotide sequence, their primary structure and potential glycosylation sites are determined (*publ. 37*). This is undoubtedly the most effective approach for determining the primary structure of high-molecular proteins, such as hemocyanins. Full structural characterization of hemocyanin from garden snails *H. lucorum* represents a significant contribution to the knowledge of oxygen-transporting proteins from invertebrates.

The results of Prof. Dolaska's research on the determination of carbohydrate structures and the identification of their influence on the structure and properties of glycoproteins, represent an indisputable scientific contribution. Glycosylation sites and carbohydrate chain structures in the hemocyanin molecule of *Rapana venosa* (RvH) are defined. On the basis of a large number of studies, 53 carbohydrate structures of high and complex type have been demonstrated in the RvH molecule (*publ. 18, 21, 30, 31*). A novel class of N-glycans in mollusk hemocyanins, including hexuronic acid and GlcNAc, linked to an internal fucose residue, is described. An effective method for identifying carbohydrate structures of hemocyanins, with an unknown or partially known primary structure, is developed (*publ. 21*). It has been found that 15 glycans are linked to the polypeptide chain of the HtH1 structural subunit of *Haliotis tuberculata* (HtH) hemocyanin,

which have complex carbohydrate structures (*publ. 39*). A new spectral method has been proposed to determine the location of glycans in mollusc hemocyanins (*publ. 43*). The specified carbohydrate structures in hemocyanins of *Mollusca* species enrich the database for carbohydrate structures of glycoproteins. The results of Prof. Dolashka's studies on glycoproteins by mass spectrometry are published in a book chapter (Tandem Mass Spectrometry and Glycoproteins. Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles) (*publ. 41*). For the first time, a hypothesis for the participation of glycans in the formation of the tertiary structure of mollusc hemocyanins is presented (*publ. 19*).

The results of *R. venosa* hemocyanin and its substructures (subunits and functional units) studies by means circular dichroism demonstrate the influence of the quaternary structure and oligosaccharides on their stability characteristics (*publ.27, 34*).

Prof. Dr. Dolashka has made a serious contribution in revealing the possibilities for medical application of isolated glycoproteins. Evidence is provided about the effect of oligosaccharide structures on the inhibitory effect of functional units against replication of viruses, tumor cell lines and bacteria (*publ. 30, 31, 42, 47*).

For the first time, the involvement of mollusc hemocyanins in the protective function of the organism has been demonstrated, providing initial protection against infectious pathogens. The  $\beta$ -HaH subunit of hemocyanin from garden snails *Helix aspersa* has been shown to be very promising for inclusion in pharmaceutical preparations for infections caused by *Staphylococcus* (*publ. 47*).

The antitumor activity of mollusc hemocyanins isolated from marine and terrestrial snails has been demonstrated on T-24 and CAL-29 cell lines from bladder cancer. The most pronounced effect is observed using a functional unit *h* of  $\beta$ -HIH. A proteomic map for the cytotoxic effects of hemocyanin from snails *H. lucorum* on the human CAL-29 cell line was first provided. It has been suggested that the oligosaccharide structures of hemocyanins have a specific role in their biological action against bladder cancer (*publ. 48, 50*).

In the second group, **contributions with a confirmatory nature**, some research results have been reported on the structure and properties of Cu / Zn-superoxide dismutases from various sources (*publ. 12, 26*). The statement, made by other authors, that the evolution of the enzyme has reached an almost constant magnitude in recent years, is confirmed.

The information on the complex structure of mollusc hemocyanins, as well as the different behavior of the native hemocyanin molecules and their isoforms, isolated from different organisms, is confirmed by means of transmission electron microscopy analysis, at different the conditions of the medium: pH, presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  (*publ. 10, 27, 33*). Interesting result is obtaining of the molecular weight of the native hemocyanin molecule RvH ( $8455 \pm 51$  kDa), measured by MALLS analysis, the determination of which due to the large size is difficult with conventional methods (*publ. 40*).

Based on the large number of studies on the structure of glycans in mollusc hemocyanins RvH and HtH, the presence of predominantly N-glycosylated complex carbohydrate structures, similar to those observed with most haemocyanins of the species *Mollusca* is confirmed (*publ. 18, 21, 30, 31, 39, 49*). In hemocyanins from *Arthropoda* species are also shown short O-glycosylated structures (*publ. 16, 45*). The involvement of carbohydrate structures in the stabilization of the quaternary structure of the hemocyanin molecule at *Mollusca* species is confirmed (*publ. 39*).

Confirmatory data on the potential for application of superoxide dismutases and hemocyanins in creating new approaches to the prevention and treatment of viral, bacterial and tumor diseases, has been obtained (*publ. 25, 36, 42, 50*).

To the third group of **contributions with a methodical nature**, refer the developed methods and conditions for the purification of the proteins, which are the subject of research in the doctoral thesis. New, effective purification schemes for Cu / Zn-superoxide dismutases from fungal strains and yeast have been developed, resulting in electrophoretically pure and high activity enzymes (*publ. 1, 26, 29*). The strains tested and the methods developed are useful for the industrial production of purified enzymes for the needs of the pharmaceutical and food industries. In the isolation of native hemocyanin molecules, as well as subunits and functional units, a liquid chromatographic apparatus (FPLC) has been used with a set of high resolution columns: Resource Q, Mono Q HR 10/10, Mono Q HR 16/10, Sepharose Fast Flow Q DEAE-Sepharcel, etc. (*publ. 9, 10, 33, 47*).

To this group of contributions are also proposed the following: a new method for analysis of glycans in mixtures; a new approach to determining complex carbohydrate structures and glycosylation sites in the glycoproteins studied. The developed fluorescence method, using titration with a complex comprising an anionic fluorescent dye and o-BBV (N,N'-bis-(benzyl-2-boronic acid)-[4,4']bipyridinium dibromide), is found suitable for detecting glycans, as well as for determining their location - "exposed" or "buried" within the protein molecule (*publ. 43*). By amidation and permethylation of glycans and MALDI-MS analysis, hexuronic acid in the structure of glycans from the subunit of *R. venosa* hemocyanin has been detected (*publ. 31*).

The group of **contributions with an applied nature** is related to the proposed laboratory techniques for the purification of Cu / Zn-superoxide dismutases and hemocyanins from various sources, as well as the possibilities of using these proteins in the treatment of viral, bacterial and tumor diseases. A major contribution is the creation of gene bank structures (DNA and RNA) and a base of glycan structures that can be useful in future research on these topics.

In conclusion, the scientific contributions presented in Prof. Dolaska's publications are novelty in science and have significant potential for practical application. In favor of the applicability of the research results of Prof. Dolashka testify the six patents and useful models.

## **8. Assessment of publications related to the dissertation**

Dr. Dolashka's dissertation includes 50 publications (with a total impact factor of 98,359), which are not included in her PhD thesis. The publications are the result of collective work, most of them with 6 to 7 co-authors. Undoubtedly, however, is the contribution and leading role of Prof. Dolashka in the publications - in 35 of them she is the first author and / or author of correspondence. Prof. Dolashka's research results have been published in prestigious international journals in the field: *Biochimica et Biophysica Acta*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *Spectrochimica Acta*, *Carbohydrate Research*, etc. From the submitted report on the fulfillment of the criteria for the scientific degree "Doctor of Sciences" of IOCCP-BAS, it is clear that 20 of the publications are of the highest (Q1) category journals, referenced and indexed in world-famous scientific information databases (WoS или Scopus), 18 are categorized in quartile Q2, and 8 and 2, respectively, are the publications categorized in quartiles Q3 and Q4.

She has 1 publication in journal included in SJR (without IF). One of the presented papers is a book chapter: "Tandem Mass Spectrometry and Glycoproteins," in Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles, with the only author Prof. Dolashka. The dissertation also includes 4 short messages published in scientific journals where quotations have been noticed. Prof. Dolashka has 83 participations in prestigious international and national scientific forums. Significant for international recognition and significance of the scientific results of the studies of Prof. Dolashka are the large number of citations of her works. In the attached document, there are 527 citations presented in WoS or Scopus.

The results achieved in Prof. Dolashka's dissertation are related to a number of national and international projects. She is the head of a total of 21 national scientific or educational projects, she is the head of the Bulgarian team in 21 other international projects and participates in 2 international projects.

The results achieved in the dissertation are the basis for patents and utility models.

### **9. Personal involvement of the author**

Professor Dolashka's thesis on the award of a Doctor of Sciences degree is a result of almost 20 years of research. It is undisputed the personal participation of the dissertant in the conducted research. The formulated contributions and the results obtained are the result of its direct participation in the experiments conducted or the work of the PhD students it manages. This is also the case for the publications that reflect the results of the dissertation – in most of them Prof. Dolashka is the first or second author and / or author of correspondence.

### **10. Doctoral thesis abstract**

The doctoral thesis abstract is well-formed, made according to the requirements of the Regulations for the conditions and order for acquiring academic degrees and occupying academic positions at IOCCP-BAS. It contains the objectives and tasks, the main results achieved in the dissertation, the conclusions and the contributions of the dissertation.

### **11. Critical remarks and recommendations**

I have no critical remarks about the presentation of the dissertation and the materials presented in the competition.

### **12. Personal impressions**

I know Prof. Dolashka from the time she joined IOCCP-BAS. My personal impressions are that she is a very capable, purposeful and dedicated to her work scientist, which has undoubtedly led to significant achievements, both scientific and practical.

### **13. Recommendations for future use of dissertation contributions and results**

The results of the research, conducted in the dissertation, have already found their practical application. Prof. Dr. Dolashka and his team are the winners of 10 national awards received for the exploitation and commercialization of scientific results. I recommend that Prof. Dolashka hand over her knowledge and rich experimental experience to young colleagues.



## CONCLUSIONS

The doctoral thesis of Prof. Dr. Dolashka **contains scientific and applied research results, which represent an original contribution to science and meet all the requirements of the Law for the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria**, the Regulations for the implementation of the Law for the Development of the Academic Staff, and the Regulations for the implementation of this law of the Bulgarian Academy of Sciences. The presented materials and the dissertation results are in full compliance with the specific requirements of the Regulation for the application of the Law for the Development of the Academic Staff, adopted of the IOCCP-BAS.

The presented doctoral thesis, shows that Prof. Dr. Pavlinka Dolashka has in-depth theoretical knowledge and professional skills in the scientific specialty "Bioorganic Chemistry, Chemistry of Natural and Physiologically Active Substances", demonstrating qualities and skills for conducting research with obtaining original and significant scientific contributions.

Due to the above, **I convincingly give my positive assessment** of the conducted research presented by the above-described dissertation, abstract of the dissertation, achieved results and contributions, and **propose to the Honorable Scientific Jury to award the degree “Doctor of Sciences” of Prof. Dr. Pavlinka Dolashka** in in a field of higher education "Natural Sciences", professional field "Chemical Sciences", scientific specialty "Bioorganic Chemistry, Chemistry of Natural and Physiologically Active Substances".

30.07.2019

Reviewer:

(Assoc. Prof. Dr. Krassimira Idakieva)