

# РЕЦЕНЗИЯ

от

**акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн**

(Член на НЖ в изпълнение на Заповед № РД 09-150/24.06.2019 г.)

на дисертационен труд за присъждане на научна степен „Доктор на науките” в област на висше образование: 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление: 4.2. „Химически науки“, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“

**Автор: проф. д-р инж. Павлинка Александрова Долашка – ИОХЦФ, БАН**

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

## 1. Предмет на рецензиране

Представеният ми за рецензиране комплект документи на хартиен и електронен носител съдържа: автобиография на докторанта (европейски стандарт), протокол от разширения колоквиум „Функционални материали, компютърно моделиране и технологии” от 28.05.2019 г. за предварително обсъждане на дисертационния труд, дисертационен труд, автореферат на дисертационния труд, справка за критериите за научна степен „доктор на науките“, копие от документ за придобита образователна и научна степен „доктор”, списък и 1 копие на публикациите и патентите, включени в дисертацията, списък на конференциите, на които са представени резултати от дисертацията, придружен от доказателствен материал, списък на цитатите, които не повтарят представените по конкурса за придобиване на образователна и научна степен „доктор”, информация за участие в изследователски проекти, грамоти и награди. Материалите са изготвени в съответствие със ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и вътрешния Правилник на ИОХЦФ-БАН за придобиване на научната степен „Доктор на науките“.

От публикациите свързани с дисертацията са представени 50 научни статии, 89 резюмета от конференции и 6 патента.

## 2. Кратки биографични данни

Проф. П. Долашка е възпитаник на ВХТИ „Асен Златарев“, гр. Бургас (днес Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ – Бургас), който завършва през 1980 г. със специалност „Органична химия“. Впоследствие продължава обучението си в ИОХЦФ при БАН, където през 1993 г. защитава кандидатска (сега докторска) дисертация по научната специалност „Биоорганична химия и химия на природните и физиологично активни вещества“ (шифър 01.05.10). Почти цялото професионално развитие на инж. Долашка протича в ИОХЦФ, където последователно заема длъжности от химик до професор. След защитата на докторската си дисертация тя ръководи научен екип по научно-приложни разработки в областта на биохимията, хранително-вкусовата и фармацевтична промишлености.

Проф. Долашка е автор на 137 научни статии, от които 105 са в реномирани международни списания със сумарен ИФ 178,042. Трудовете ѝ са цитирани досега 750 пъти. Тя е съавтор и на 3 университетски учебни пособия, от които 1 е издадено в чужбина. Съавтор е и на 6 патента и полезни модела в областта на фармацевтичната биотехнология. Участвала в разработването на 21 научни проекти с национално финансиране и 23 научни проекти с международно финансиране, както и на 3 договорни теми с биотехнологични фирми. Ръководител е на 6 успешно защитили докторанти и 10 дипломанти. Член е на СУБ и на Европейското пептидно дружество.

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

Дисертационният труд на проф. П. Долашка е посветен на изследването на структурата, функциите и биологичното действие на два класа мед-съдържащи гликопротеини – супероксиддисмутази (СОД) от плесени и хемоцианини от молюски и артроподи. Техните молекули са изградени от високомолекулни гликозилирани полипептидни субединици и изучаването на структурата им стана възможно през последните 1-2 десетилетия, когато мас-спектралната техника беше усъвършенствана и адаптирана към анализ на сложни биополимери. Към този период се отнасят и изследванията на П. Долашка, които допринесоха много за изясняване на молекулната структура на мед-съдържащите СОД и хемоцианини. Освен че са фундаментално значими, изследванията на проф. Долашка са актуални и заради тяхната приложна значимост. Появиха се сведения през последните години, че медните гликопротеини могат да намерят приложение за лечение на някои социално значими заболявания. Така например Cu/Zn-СОД-азите имат положителен ефект върху подобряване на антиоксидантния статус на пациенти болни от СПИН, както и при възстановяването на пациенти претърпели мозъчни инциденти, а хемоцианините са с добър ефект при лечение на бактериални и вирусни инфекции. Както СОД, така и хемоцианините имат благоприятен ефект при терапията на тумори на пикочния мехур, гърдата, хранопровода и др. Може да се каже, че изследванията на П. Долашка върху медицинското приложение на СОД и хемоцианините са сред тези с пионерен характер.

В своята дисертация д-р Долашка си поставя конкретна цел – да изследва структурата на гликаните и влиянието им върху биологичните свойства на нови мед-съдържащи гликопротеини свързващи различни кислородни форми. Адекватно на поставената цел тя формулира 5 конкретни задачи обхващащи изучаването както на структурата и физикохимичните свойства на новите гликопротеини, така и на техния терапевтичният потенциал.

### **4. Познание на проблема**

Съдейки по компетентно написания литературен обзор, авторката е отлично запозната с научната литература в своята област. Обзорът обхваща 45 страници и включва повече от 400 литературни източници. Въпреки сложната терминология, той е лек за четене. Състои се от три основни раздели и заключение. Първият представлява въведение в класификацията и структурната организация на мед-съдържащите кислород-свързващи гликопротеини от класовете *Arthropoda* и *Mollusca*, вторият е посветен на структура на въглехидратна компонента на Cu/Zn-супероксид дисмутазите и хемоцианините от артроподи и молюски, а третият акцентира върху влиянието на въглехидратните структури върху биологичните функции на гликопротеините. Въпреки че както СОД-азите, така и хемоцианините са мед-съдържащи със способност да свързват кислород, техните биологични функции са различни. СОД-азите представляват пърния ешалон за защита на клетките от вредното действие на супероксидните радикали, а хемоцианините са аналог на желязо-съдържащите хемоглобини при молюските и алтроподите. Въпреки, че пренасянето на кислород е тяхна основна функция, молекулният строеж на хемоцианините от артроподи и молюски е различен. Тези разлики, както и влиянието на въглехидратната компонента върху техния афинитет към кислорода и други биологични функции са описани с голяма вещина.

Заключението към литературния обзор представлява обобщение и творчески анализ на обемистата литература. От него става ясно, че много въпроси свързани с влиянието на въглехидратната структура върху физикохимичните и биологични свойства на мед-съдържащите кислородсвързващи гликопротеини са все още без отговор. В случая това улеснява докторантката в намирането на подходяща изследователска ниша и адекватно формулиране на целите и задачите на нейната дисертация.

## **5. Методика на изследването**

Амбициозната изследователска програма на проф. Долашка е реализирана с помощта на разнообразни и високо чувствителни методи и модерна експериментална техника. Използваните методи са: хроматографски (за изолиране и пречистване на гликопротеини от животински източници), физикохимични, спектрални, масспектрометрични, биохимични, молекулярно-биологични, клетъчно-биологични, микробиологични, статистически и др.

Като основни бих отбелязал масспектралните методи (MALDI-TOF-TOF, LC/ESI-MS, LC-Q-trap-MS/MS, нано-ESI-MS и др.) приложени за определяне на аминокиселинната последователност и структурата на нови протеини, ензими и гликопротеини. Пречистените гликани и гликопептиди са изследвани с Q-trap система Absciex 4000 на Q-trap масспектрометър снабден с наноспрей йонен източник, както и с тандемен масспектрометър (Q-TOF) снабден с нано-ESI и хибриден квадраполен анализатор.

Първичната структура на новите Cu/Zn-COD-ази и хемоцианини е изучавана чрез хидролиза с химотрипсин и трипсин, и анализ на получените фрагменти чрез Едманово разграждане и MALDI-MS/MS, а четвъртичната структура на холопротеините - чрез ПАГЕ, ТЕМА с микроскоп Philips CM10, тандемен масспектрометричен анализ и др. За определяне на първичната структура на някои високомолекулни хемоцианинови субединици е приложено ДНК-секвениране на техните гени изолирани от кДНК-библиотеки.

Структурата на гликаните е изучавана чрез оригинален нов подход за определяне на централните гликозилиране след белязане с  $^{18}\text{O}$  и генно фрагментиране, както и чрез титруване на N,N'-бис-(бензил-2-боронова киселина)-[4,4']бипиридин дибромид (o-BBV) комплекс (нов метод разработен от докторантката).

Влиянието на структурата на гликана върху конформационната стабилност на протеините е изследвано чрез кръгов дихроизъм проследявайки рН-зависимата топлинна денатурация оценявана по изменението на елиптичността  $[\Theta]_{222}$  като функция на температурата при различни стойности на рН и/или по изменението ѝ като функция на рН, при различни температури.

Биологичните ефекти на Cu/Zn-COD-азите и хемоцианините са оценявани по техния антивирусния ефект върху репликацията на различни вируси (полио вирус тип 1, CV-B1, RSV и HSV-тип 1), антибактериалният им ефект е изследван срещу различни Грам-положителни и Грам-отрицателни бактериални щамове, а антитуморният им ефект - срещу тумор на Graffi в хамстери и асцитен тумор на Guerin в плъхове, както и при тумори на пикочния мехур.

## **6. Характеристика и оценка на дисертационния труд**

Дисертационният труд на П. Долашка обхваща 319 страници и съдържа 156 черно-бели и цветни фигури, 28 таблици и повече от 450 литературни източници. Той е написан на ясен и точен научен език и е оформен в класически стил - Увод, Литературен обзор, Цели и задачи, Материали и методи, Резултати и дискусия, Изводи, Приноси, Библиография на публикуваните трудове и Списък на техните цитирания.

Най-същественят раздел на дисертацията е Резултати и дискусия (РД), който обхваща 145 страници. Той е добре онагледен с графики, таблици и схеми построени въз основа на собствени експериментални данни. Разделът съдържа 6 тематични глави, от която първата е посветена на изолирането, пречистването и молекулното охарактеризиране на Cu/Zn-супероксид дисмутази от гъбичните шамове *Humicola lutea* 110, *Humicola lutea* 103, *Aspergillus niger* 26 и дрождеви щам *Kluyveromyces marxianus* NBIMCC 1984. След като се убеждава в чистотата и хомогенността на изолираните СОД-ази по данни на проведения N-краен анализ, докторантката определя техните първични структури така, както бе споменато по-горе. Получените секвенции са сравнени с други налични в базите данни с цел да се определят функционалните им домени, а също така да се хвърли светлина върху тяхната филогенеза. Изследването на пространствената структура на гликопротеините показва, че въглехидратните вериги на СОД-азите са разположени на повърхността на молекулата и не влияят съществено върху тяхната ензимна активност. Трябва да отбележа, че публикациите на проф. Долашка представят за първи път въглехидратни структури на природно гликозилирани СОД-ази.

В глави 2 и 3 от Раздел РД са представени резултатите от изолирането и молекулното характеризирание на хемоцианини от различни представители на *Arthropoda* и *Mollusca*. Тъй като хемоцианините имат значително по-голяма молекулна маса и по-сложно устроена молекула от СОД-азите, за тяхното изучаване е приложена друга методология. Вместо с мас-спектрални методи, тяхната първична структура може да изследва много по-бързо и евтино чрез секвениране на съответните гени. За тази цел Долашка прилага геномен подход. Тя провежда частично N-крайно секвениране на пречистени хемоцианинови субединици с цел да създаде дегенерирани ДНК-праймери комплементарни на 5'-края на гените. Самите гени са изолирани чрез PCR от тъканно специфична кДНК-библиотека. По този начин са определени нуклеотидните последователности на гените на три субединици на хемоцианина от *H. lucorum*. Те показват висока степен на хомоложност с тези на други хемоцианини от подклас *Mollusca*. Данните както от N-крайно, така и от ДНК секвенирането са използвани за провеждане на филогенетични проучвания, които внасят допълнителна яснота относно еволюцията на хемоцианините при молюски и артроподи.

В отделна глава (IV.4.) са представени резултатите от изследването на структурата на въглехидратните компоненти на СОД-азите и хемоцианините. Те включват както определяне на типа и мястото на гликозилиране, така и начина на свързване на мономерните въглехидратни остатъци в молекулата на гликана. Освен известните методични подходи, тук е приложен и нов оригинален метод разработен от докторантката (виж т. 5 от рецензията). Долашка установява, че центровете за N-гликозилиране при хемоцианините са разположени предимно на повърхността на молекулата, като за хемоцианина от *H. lucorum* те са съответно 13 за  $\beta$ -NH, 14 за  $\alpha$ D-NH и 7 за  $\alpha$ N-NH изоформите. Тя успява да определи 25 въглехидратни структури за RvH1 и 28 за RvH2, които са от манозен и комплексен тип. Открива и нов тип въглехидратни структури, съставени от хексуронова киселина и GlcNAc свързани към вътрешен фукозен остатък, които не са намерени досега при други хемоцианини.

Последните две глави от раздел РД са посветени на физиологичните функции (Глава IV.5.) и биологичните ефекти (Глава IV.6.) на въглехидратните компоненти на мед-съдържащите гликопротеини.

С цел да оцени влиянието на въглехидратните остатъци върху стабилността на висшите структури на СОД-азите и хемоцианините, докторантката изследва динамиката на тяхното поведение в разтвори с различно рН и температура, прилагайки високочувствителен ESI-MS и CD анализ. Тя намира, че въглехидратните структури участват в изграждането на третичната структура на хемоцианина, като изказва и хипотеза за възможните интрамолекулни взаимодействия. Въглехидратните структури имат отношение и към четвъртичната структура на гликопротеините. Установено е, че гликаните от ФЕ-h възпрепятстват образуването на дълги мултидекамери от субединиците RvH2,  $\beta$ -HN, KLN1 и HtH1 (открити при RvH1, KLN2 и HtH2), както и че денатурацията на хемоцианините протича в два етапа: дисоциация на холопротеина до изграждащите го субединици, след което настъпва денатурация на самите субединици. Тъй като рН-Т интервалите на обратимост (определени чрез CD) варират в много тесни граници за цялата RvH молекула и съставлящите я субединици, докторантката прави извод, че въглехидратните структури влияят върху стабилността на четвъртичната структура на протеина чрез силни заряд-диполни взаимодействия, а по-широкият интервал на обратимост при ФЕ RvH2-е е указание за липсата на влияние на въглехидратната структура, която се намира на повърхността на молекулата.

Последната глава (IV.6.) от Раздел РД илюстрира приложните аспекти на дисертацията. Тук д-р Долашка изследва изолираната от нея Cu/Zn-СОД от *H. lutea* 103 за антивирусен и антитуморен ефект и намира, че тя потиска развитието на грипния вирус А/Aichi (H3N2) и на миелоидния тумор на Graffi в хамстери, което се обяснява с неутрализация на супероксидните радикали. За антивирусен, антибактериален и антитуморни ефекти са изследвани и хемоцианини от молюски. Така за първи път е показан инхибиращ ефект на RvH2-е върху репликацията на вируса HSV тип 1, което се обяснява с образуване на Ван-дер-Ваалсови и водородни връзки между въглехидратната верига на RvH2-е и вируса. За първи път е показана и инхибираща активност на HN и RvH спрямо развитието на някои патогенни Грам-положителни (*S. aureus* и *S. epidermidis*) и Грам-отрицателни бактериални щамове (*E. coli*). Наблюдаван е и антитуморен ефект на хемоцианини от молюски спрямо асцитния тумор на Guerin (но не и при солиден миелоиден тумор на Graffi), което се обяснява с тяхното имуностимулиращо действие. Доказан е и инхибиращ ефект на HN,  $\beta$ -HN-h и RvH2-с спрямо човешки клетъчни линии от рак на пикочния мехур.

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

Както беше отбелязано в началото на рецензията, изследванията на проф. П. Долашка са научно-приложни. Те са мотивирани от стремежа ѝ да обогати нашите познания за структурата, еволюцията и функцията на мед-съдържащите кислород-свързващи гликопротеини, каквито са СОД-азите и хемоцианините, и в частност на техните въглехидратни компоненти. Но тъй като тя има прагматично мислене и афинитет към разработването на нови биофармацевтици, не е пропуснала възможността да потърси и приложение на своите резултати в практиката.

Въпреки че научните постижения бяха разгледани в т. 7 от рецензията, все пак като по-съществени бих отбелязал представянето на богата информация за комплексните въглехидратни структури и влиянието им върху физико-химичните свойства на хемоцианините. Високо оценявам и определените нуклеотидни и аминокиселинни последователности на хемоцианини от молюски, както и определянето на центровете на гликозилиране на три от тях, което значително обогатява световната ДНК и протеинова бази данни. За първи път се съобщава за ролята на гликаните при формиране и поддържане на висшите структури на хемоцианини.

Като методичен принос ще отбележа разработването на високо ефективна методика за определяне и идентифициране на въглехидратни структури на хемоцианини с неизвестна или частично известна първична структура (виж т. 6 от рецензията).

От приносите с потенциално значение за практиката (медицина и фармация) бих посочил разкриването на антивирусна, антибактериална и противодуморна активност на СОД-ази от гъби и хемоцианини от молюски, както и модулиращото значение на въглехидратните им компоненти върху техните биологични активности.

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

Във връзка с него са публикувани 50 научни статии – всички на английски език и публикувани в реферирани и индексирани по Thomson Reuters периодични издания с общ импакт фактор 98,359, както и 4 кратки съобщения в тематични сборници на престижни научни списания с висок ИФ. В 33 от публикациите и в 4 от патентите Долашка е водещ (първи или последен) автор. Тя има 1 самостоятелна публикация, 1 с един съавтор и 1 с 12 съавтори. Броят на авторите в останалите статии варира от 3 до 12. Трудовете свързани с дисертацията са цитирани досега 527 пъти. По темата на дисертацията е издаден 1 български патента за изобретение. Резултатите са докладвани и на 83 научни форуми, от които 23 в чужбина. Изследванията са финансирани от 30 национални и чуждестранни научни проекти.

## **9. Лично участие на автора**

Въпреки че много от трудовете на проф. Долашка са публикувани в съавторство с чуждестранни колеги, нейната водеща роля е очевидна – независимо от лабораториите в които е работила, тя е отивала със своя тематика и свои обекти за изследване.

## **10. Автореферат**

Авторефератът отразява точно съдържанието и постиженията на дисертацията. Той е написан педантично и е илюстриран с достатъчно информативни фигури, таблици и формули. За разлика от много други автореферати, той съдържа резюме и на литературния обзор.

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

В дисертацията на проф. Долашка откривам френолно използвани таксономични термини. Така например навсякъде в нея и автореферата се говори за „**вид**“ *Arthropoda*, и „**вид**“ *Mollusca*, а те всъщност са **тип** *Arthropoda* (Членестоноги) и **тип** *Mollusca* (Мекотели). *Crustacea* (Ракообразни) и *Chelicerata* (паяци, акари, скорпиони) пък са представени като „**класове**“, а те са **подтипове**. **Видове** са само индивидуалните представители на артроподите и молюските. Но тъй като съм убеден, че организмите използвани в изследванията на Долашка са идентифицирани от компетентни специалисти, съм склонен да приема допуснатите грешки като терминологични, които не засягат същността на дисертацията.

## **12. Лични впечатления**

Многократно съм рецензирал проекти и статии на проф. Долашка, както и дипломни и докторски тези на нейни дипломанти и докторанти. Това ми даде възможност да се

запознай отблизо с нейната научна проблематика и да се възхищавам на ентузиазма с който тя и ръководения от нея екип работят.

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

Препоръчвам на проф. Долашка да развие приложните аспекти на своите научни изследвания свързани с антитуморните ефекти на мед-съдържащите гликопротеини.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертацията проф. П. Долашка е пример за модерен интердисциплинарен изследователски труд в областта на биоорганичната химия, биохимията и молекулярната биология. Изследванията са проведени с модерна методология и високо резолютивни технически средства, в резултат на което са получени огромен обем резултати с подчертан приносен характер за фундаменталната наука и практиката. Изолирани са нови супероксид-дисмутази от плесени и хемоцианини от молюски и артроподи. На някои от тях са определени първичните структури, както и структурата на въглеродните им компоненти. Изследвана е ролята на гликаните върху формирането и поддържането на висшите структури на гликопротеините както и върху техните биологични ефекти. Получените резултати са публикувани в едни от най-авторитетните научни списания в областта на химията, биохимията и молекулярната биология и са цитирани стотици пъти в световната литература. Във връзка с изследванията по дисертацията са издадени 6 патента. Със своята ерудиция и научни постижения проф. Долашка се представя като водещ български изследовател, високо ценен и уважаван от световната научна общност, който напълно удовлетворява изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и вътрешните правилници на ИОХЦФ за придобиване на научната степен „Доктор на науките”.

Поради гореизложеното, убедено давам своята *положителна оценка* за проведените изследвания, дисертационния труд, автореферата, постигнатите резултати и приносите, и *предлагам на почитаемото Научно жури да присъди научната степен „Доктор на науките“* на проф. д-р инж. Павлинка Александрова Долашка в област 4. „Природни науки, математика и информатика“, професионално направление: 4.2. „Химически науки“, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“.

08.07.2019 г.

гр. София

**Рецензент:**

(Акад. проф. Иван Г. Иванов, дбн)

## REFEREE REPORT

By **Prof. Ivan Georgiev Ivanov, D.Sc.**

of Doctoral Thesis in the field of higher education: 4. "Natural Sciences, Mathematics and Informatics"; professional area: 4.2. "Chemical Sciences"; scientific specialty "Organic Chemistry, Chemistry of Natural and Physiologically Active Products"

Author: **Prof. Pavlinka Aleksandrova Dolashka, Ph.D.**

Topic: *"Structure and Function of Copper Containing Oxygen Species Binding Glycoproteins"*

### 1. Subject of review

The pack of documents presented for review in paper and electronic form contains: CV (European standard), protocol from the Colloquium "Functional materials, computer modeling and technologies" (28.05.2019), DSc thesis, thesis abstract, reference for compliance with the criteria for the scientific degree "Doctor of Sciences", copies of diplomas for PhD and Professor degrees, a copy of 50 publications and 6 patents related with the presented thesis, a list of 89 conferences where the results have been reported, a list of citations, information about participation in research projects, awards, etc. The materials have been prepared in accordance with the Law for Scientific Development in Bulgaria, the Rules of its Application as well as of the Internal Rules and Regulations of the Institute Organic Chemistry with Center for Phytochemistry (IOCCP) for acquiring the scientific degree "Doctor of Sciences".

### 2. Brief biographical data

Prof. P. Dolashka graduated from the Bourgas University "Asen Zlatarev" in 1980 with MS in "Organic chemistry". She continued her education at the IOCCP, Bulgarian Academy of Sciences, where she acquired a PhD degree (1993) in the scientific specialty "Bioorganic chemistry and chemistry of natural and physiologically active substances". In the same institute she consecutively occupies all academic positions from chemist to professor. After acquiring her PhD degree, she heads a scientific team on applied research in the field of biochemistry, food and pharmacy.

Prof. Dolashka has 137 scientific papers, of which 105 are in peer reviewed scientific journals with a total IF 178,042. Her papers have been quoted so far 750 times. She is a co-author of 3 university books, 1 of which is published abroad. She also co-authors 6 patents and useful models in the field of pharmaceutical biotechnology. She participated in the development of 21 scientific projects with national funding and 23 projects with international financing as well as in 3 contractual projects funded by biotechnology companies. Dr. Dolashka has supervised 6 PhD and 10 MS students. She is a member of the Union of Bulgarian Scientists and the European Peptide Society.

### 3. Actuality of the thesis topic

Prof. P. Dolashka's thesis is dedicated to the study of the structure, functions and biological activity of two classes of copper-containing glycoproteins - superoxide dismutases (SODs) from molds and hemocyanins from mollusks and arthropods. Their molecules are composed of high molecular weight glycosylated polypeptide subunits, and the study of their structure has become possible over the last 1-2 decades when the mass spectral techniques have been refined and adapted to the analysis of complex biopolymers. Dr Dolashka's research contributed a lot to clarifying the molecular structure of SODs and hemocyanins. Besides being fundamentally important, her research is also relevant because of its applicative significance. It has been reported in recent years that copper glycoproteins can be used for treatment of some socially significant diseases. Cu/Zn-SODs, for example, have a positive



effect on improving the antioxidant status of AIDS patients as well as on the recovery of patients after brain injuries. Hemocyanins have a good effect in the treatment of bacterial and viral infections. Both SODs and hemocyanins have a beneficial effect in the treatment of bladder, breast, and other tumors. It can be said that Dr Dolashka's research on the medical application of SOD and hemocyanins has a pioneering character.

The goal of Dr Dolashka's thesis is to study the structure of glycans and their influence on the structure and biological properties of new copper-containing glycoproteins binding different oxygen species. The goal includes also the study of both structure and physicochemical properties of the new glycoproteins as well as of their therapeutic potential.

#### **4. Familiarity with the scientific problem**

Judging by the very competently written literature review, the author is well acquainted with the scientific literature in the field copper glycoproteins. The review covers 45 pages and includes more than 400 references. Despite the specific terminology, it is easy to read. It consists of three main sections and a conclusion section. The first section introduces the reader to the classification and structural organization of the copper-containing oxygen-binding glycoproteins of *Arthropoda* and *Mollusca*. The second one is dedicated to the structure of the carbohydrate moieties of Cu/Zn-SODs and hemocyanins, and the third focuses on the influence of the carbohydrate structures on their biological activities. Although both SODs and hemocyanins contain copper and bind oxygen species, their biological functions are different. SODs are the first to protect cells from the harmful effects of superoxide radicals and hemocyanins are analogous to the iron-containing hemoglobins in binding and transferring O<sub>2</sub>. Although the oxygen-conferring is their basic function, the molecular structure of hemocyanins from arthropods and molluscs is different. This difference, as well as the influence of the carbohydrate component on their affinity to oxygen and other biological functions, are described in the literature review with great skill and knowledge.

The conclusion section in the review represents a summary and a creative analysis of the voluminous literature. It is clear from this section that many points related to the influence of carbohydrate structure on the physicochemical and biological properties of copper-containing oxygen-binding glycoproteins are still unanswered, which facilitates the author in finding her fruitful research niche.

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

Prof. Dolashka's ambitious research program is realized through a variety of high-resolution methods and modern experimental techniques. The basic methods used in her studies are: chromatography (for isolation and purification of glycoproteins from animal sources), UV- and CD spectroscopy, mass-spectroscopy (MS) as well as biochemical, molecular biological, cell-biological, microbiological, statistical methods, etc. The basic methods applied to determine the amino acid sequence and structure of the new proteins are the MS-methods MALDI-TOF-TOF, LC/ESI-MS, LC-Q-trap-MS/MS, nano-ESI-MS, etc. The glycan and glycopeptide structures have been examined by Q-trap Q-trap mass spectrometer (Q-trap system equipped with a nanoparticle ion source) and by a tandem mass spectrometer (Q-TOF) equipped with nano-ESI and a hybrid quad-column analyzer.

The structures of the new Cu/Zn-SODs and haemosanins are studied by hydrolysis with chymotrypsin and trypsin followed by Edman degradation and MALDI-MS/MS of the obtained fragments, whereas the quaternary structures of the holoproteins are studied by PGEE, THEMA (Philips microscope CM10), tandem mass-spectrometry, etc. To determine the primary structure of some high-molecular hemocyanin subunits, Dr. Dolashka has applied DNA sequencing of the corresponding genes isolated from a cDNA library.

The glycan structure is studied by an original novel method for determination of glycosylation sites following  $^{18}\text{O}$ -labeling and gene fragmentation, as well as by titration of N, N'-bis- (benzyl-2-boronic acid) - [4,4' bipyridine dibromide (o-BBV) complexes.

The influence of glycan structures on the conformational stability of glycoproteins is investigated by circular dichroism (CD) following the pH-dependent thermal denaturation assessed by the change in ellipticity  $[\Theta]_{222}$  as a function of the temperature at different pH values and /or its change as a function of pH at different temperatures.

The Cu/Zn-SODs and hemocyanins are evaluated for their antiviral effect on the replication of various viruses (Polio Virus Type 1, CV-B1, RSV and HSV Type 1). Their antibacterial effects are studied against various Gram-positive and Gram-negative bacterial strains, and their antitumor activity - against Graffi tumor in hamsters and Guerin ascites tumor in rats.

## 6. Characterization and evaluation of the thesis

P. Dolashka's thesis covers 319 pages and contains 156 figures, 28 tables and more than 450 references. It is written in clear and accurate scientific language and is structured in a classic style - Introduction, Literary Review, Objectives and Tasks, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Contributions, Bibliography and List of citations.

The most important part of the thesis is the Results and Discussion (RD) section, which covers 145 pages. It is well illustrated with graphs, tables, and schemes built on own experimental data. This section contains 6 thematic chapters, the first of which is dedicated to the isolation, purification and molecular characterization of Cu/Zn-superoxide dismutases from the fungal strains *Humicola lutea* 110, *Humicola lutea* 103, *Aspergillus niger* 26 and the yeast *Kluyveromyces marxianus* NBIMCC 1984.

After proving the purity and molecular homogeneity by the N-terminal analysis of the isolated SODs, the author has determined their primary structures as mentioned above. The obtained sequences have been compared to other sequences available in the databases in order to determine their functional domains, and also to shed light on their phylogeny. Investigations on the spatial structures indicate that the carbohydrate chains are located on the SODs surface, so they do not significantly affect their enzymatic activity. It must be pointed out that Prof. Dolashka reports for the first time carbohydrate structures of naturally glycosylated SODs.

Chapters 2 and 3 present the results of the isolation and molecular characterization of hemocyanins from different species of *Arthropoda* and *Mollusca*. Because of their high molecular mass and a complex structure, Dr. Dolashka has used another approach for their investigation. Instead of MS, their primary structure is studied by direct sequencing of their genes. To this end the purified hemocyanin subunits have been N-terminally sequenced in order to obtain data for designing degenerated DNA primers complementary to the 5'-ends of the corresponding genes. The genes themselves are isolated by PCR from a tissue specific cDNA library. In this way three *H. lucorum* hemocyanin subunits were determined. They all show a high degree of homology with other *Mollusca* subclasses. The DNA sequencing have been also used for phylogenetic studies that give additional information about the evolution of the hemocyanins in mollusks and arthropods.

A separate chapter (IV.4) presents the results of the study of the structure of the carbohydrate components of SODs and hemocyanins. These include both determination of the type and sites of glycosylation and the type of linking of the monomeric carbohydrate monomers in the glycan molecule. In addition to the routine methodological approaches, a new original method is developed to study the glycans structures (see above). Dr. Dolashka found that the N-glycosylation sites in hemocyanins are located predominantly at the surface of the molecule. In the *H. lucorum* hemocyanin they are 13 for  $\beta$ s-H1H, 14 for  $\alpha$ D-H1H and 7

for the  $\alpha$ N-H1H isoforms. She has also managed to identify 25 carbohydrate structures for RvH1 and 28 for RvH2 of mannose and complex type. She also revealed a new type of carbohydrate structure composed of hexuronic acid and GlcNAc linked to an internal fucose residue (not found yet in other hemocyanins).

The last two chapters of the Results section are devoted to the physiological functions (Chapter IV.5) and biological effects (Chapter IV.6) of the carbohydrate components of copper-containing glycoproteins.

In order to evaluate the effect of carbohydrate residues on the stability of SOD and hemocyanin structures, the author has examined the dynamics of their behavior in solutions at different pH and temperature using high-sensitivity ESI-MS and CD. She found that the carbohydrate moieties were involved in the formation and maintenance of the tertiary structures of the hemocyanins. They are also related to the quaternary structure of the glycoproteins. It was found that the FE-h glycans prevented the formation of long multidecamers of the RvH2,  $\beta$ -H1H, KLH1 and HtH1 subunits and that the denaturation of hemocyanins takes place in two stages: dissociation of the holoprotein to subunits, followed by denaturation of the subunits themselves. Since the pH-T intervals of reversibility (defined by CD) vary within very narrow limits for the whole RvH molecule and its subunits, it is concluded that the carbohydrate structures influence the stability of the quaternary structure through strong charge-dipolar interactions. The wider reversibility interval at FE RvH2-e is an indication for the lack of influence of the carbohydrate structure (located on the surface of that molecule).

The last chapter (IV.6) illustrates the applied aspects of Dr. Dolashka's thesis. She has investigated the Cu/Zn-SOD from *H. lutea* 103 for anti-viral and anti-tumor activity and found a suppressive effect on the propagation of influenza A/Aichi (H3N2) virus. This SOD also suppresses the progression of Graffi myelogenous tumor in hamsters. Both effects are explained by the neutralization of superoxide radicals. The molluscan hemocyanins are also examined for antiviral, antibacterial and anti-tumor activity. Thus the author reports for the first time an inhibitory effect of RvH2-e on HSV type 1 virus replication, which is explained by the formation of Van-der-Vaals and hydrogen bonds between the RvH2 carbohydrate chain and the virus surface. Inhibitory effect of HaH and RvH against the replication of some pathogenic Gram-positive (*S. aureus* and *S. epidermidis*) and Gram-negative (*E. coli*) bacteria is also shown for the first time. Antitumor effect of molluscan hemocyanins on Guerin ascites tumor (but not Graffi's solid myeloid tumor) and on human bladder cancer cell lines has been observed as well and this is explained by their immunostimulatory activity.

## **7. Contributions and importance of the results to science and practice**

Prof. P. Dolashka's research is motivated by its quest to enrich the knowledge on the structure, evolution and function of copper-containing oxygen-binding glycoproteins, such as SODs and hemocyanins. However, because of her pragmatic mindset and affinity for the development of new biopharmaceuticals, she has not missed the opportunity to apply her results in the practice.

Although the scientific achievements of Dr. Dolashka's thesis were dealt within paragraph 7 of the review, here I would note again the rich information obtained on the complex carbohydrate structures and their influence on the physicochemical and biological properties of SODs and hemocyanins. I am highly evaluating the newly determined nucleotide and amino acid sequences of molluscan hemocyanins as well as the determined sites of glycosylation, which significantly enriches the world's DNA and protein databases. For the first time, the role of glycans in formation and maintenance of the hemocyanin higher structures is reported.

As one of the most significant methodical contribution I would note the development of the new highly efficient method for studding carbohydrate structures of hemocyanins with unknown or partially known primary structure (see section 5 of this review).

Among the contributions of potential importance to practice (medicine and pharmacy), I would point out the disclosure of antiviral, antibacterial and antitumor activity of SODs from fungi and molluscan hemocyanins, as well as the modulating role of their carbohydrate components on the biological activity.

#### **8. Assessment of the papers related with the thesis**

The 50 scientific papers related to the reviewed theses are published in peer reviewed journals indexed by Thomson Reuters (total IF 98,359). In 33 of them and in 4 of the patents Dr. Dolashka is the leading (first or last) author. She is a single author in one of the papers only. The number of co-authors in the rest of the papers vary between 2 and 12. Her papers are cited so far 527 times. The results are also reported on 83 scientific fora, of which 23 were held abroad. The research of Dr. Dolashka has been funded by 30 national and international research projects.

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

Although most of Prof. Dolashka's papers are published in co-authorship with foreign scientists, her leading role is obvious. Despite of the laboratories she worked in, she has always worked on her research subject and on her research objects.

#### **10. Thesis abstract**

The abstract of the reviewed thesis reflects exactly the content and achievements of the dissertation. It is written in a meticulous way and is illustrated with high quality figures, tables and formulas. The abstract contains also a summary of the literary review.

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

I found in Prof. Dolashka's thesis many frivolously used taxonomic terms. For example, the big taxa *Arthropoda* and *Mollusca* are named "species", whereas they are "types". The *Crustacea* and *Chelicerata* (spiders, mites, scorpions) are denoted "classes", whereas they are "subtypes". Bearing in mind that the organisms used in her investigations are identified by competent specialists, I consider the above mentioned mistakes as terminological disparity that do not affect the essence of the dissertation.

#### **12. Personal impressions**

I have repeatedly reviewed Prof. Dolashka's projects and papers as well as MS and PhD theses of her students. This gave me the opportunity to get acquainted with her scientific ideas and achievements long time ago.

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

I am highly recommending Prof. Dolashka to continue her studies on the biological effects of her copper glycoproteins and particularly on the antitumor effects of SODs and hemocyanins.

### **CONCLUSION**

Professor P. Dolashka's thesis is a good example of modern interdisciplinary research project in the field of bio-organic chemistry, biochemistry and molecular biology. The research has been carried out using a modern methodology and instrumentation. The obtained voluminous results contribute a lot to basic science and practice. New species of SODs from

molds and hemocyanins from mollusks and arthropods have been isolated and the molecular structure of some of them is determined. The role of glycans in the formation and maintenance of the higher structures of the copper glycoproteins as well as on their biological activity is clarified. The obtained results are published in high ranked peer reviewed journals in the fields of chemistry, biochemistry and molecular biology. The papers related with the thesis are cited hundreds of times in the world literature. Six patents are also issued. Due to her high quality research Prof. Dolashka is highly valued and respected by the national and world scientific community. She fully satisfies the requirements of the Law for Scientific Development in the Republic of Bulgaria, the Rules of its Application as well as of the Internal Rules and Regulations of the Institute Organic Chemistry with Center for Phytochemistry for acquiring the scientific degree "Doctor of Sciences". Because of that I am giving my positive assessment of her research, thesis, thesis abstract, obtained results and scientific contributions and I propose to the Honorable Scientific Jury to award the scientific degree "Doctor of Science" of Prof. Pavlinka Aleksandrova Dolashka in the field of higher education: 4. "Natural Sciences, Mathematics and Informatics"; professional field: 4.2. "Chemical Sciences"; scientific specialty "Organic Chemistry, Chemistry of Natural and Physiologically Active Products".

10 July 2019  
Sofia

Reviewer:

(Prof. Ivan G. Ivanov, DSc)