

СПЕЦИАЛИЗИРАН НАУЧЕН СЪВЕТ
ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ И ОРГАНИЧНИ ТЕХНОЛОГИИ ПРИ ВАК
БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ

Александър Константинов Долашки

СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И СВОЙСТВА НА
МЕД-СЪДЪРЖАЩИТЕ ПРОТЕИНИ:
ХЕМОЦИАНИНИ И СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗА

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИЯ
ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН
"ДОКТОР"

Научен ръководител: Проф. д-р Волфганг Фьолтер

Рецензенти: Проф. д-р Волфганг Фьолтер
Проф. Улрих Весер

Специалност: "Биорганична химия, химия на природните и физиологично активни
вещества", шифър 01.05.10

София, 2006

2. Цели и задачи на настоящия дисертационен труд

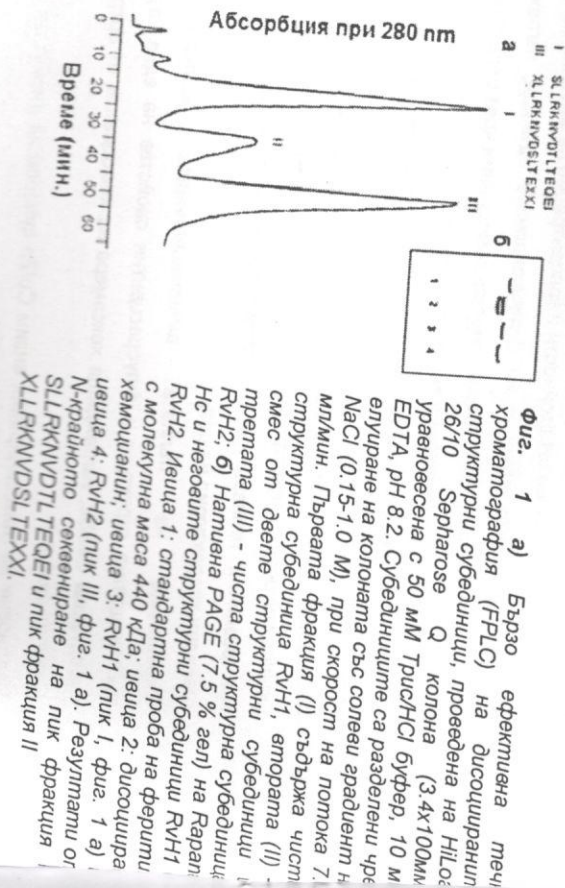
Целта на настоящия дисертационен труд е да бъдат изолирани и охарактеризирани структурите, свойствата и стабилността на мед-съдържащи протени: хемоцианини от молоски и артроподни организми и супероксид дисмутаза от гъбичен щам. Във връзка с изпълнението на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Изолиране на субединици, изграждащи молекулата на хемоцианини от молоските *Rapana venosa* и *Helix vulgatis* и хемоцианини от артроподните *Limulus polyphemus* и *Scorpius aestuarii*.
2. Изследване динамиката на олигомеризация на структурните субединици на хемоцианини от молоските *Rapana venosa* и *Helix vulgatis* и тяхната стабилност при различни рН стойности и концентрации на метални йони.
3. Изолиране и идентифициране на функционалните единици, изграждащи структурните субединици на *Rapana venosa* хемоцианин чрез определяне на N-крайната им аминокиселинна последователност.
4. Охарактеризиране на въглехидратната структура на хемоцианин от молоския *Rapana venosa*.
5. Изследване на структурата и стабилността на хемоцианин от артроподния *Limulus polyphemus* чрез флуоресцентна спектроскопия и кръгов дихроизъм при различни температури, рН стойности и различни концентрации на гуанидин хидрохлорид и уреа.
6. Определяне на пълната аминокиселинната последователност, въглехидратна структура и флуоресцентни свойства на една структурна субединица CaSS2, изграждаща хексамера на хемоцианин от артроподния *Scorpius aestuarii*.
7. Изолиране на гликозилирания ензим Cu/Zn супероксид дисмутаза (СОД) от гъбичния щам *Nitpickia lutea* 103 (NL).
8. Определяне на аминокиселинната последователност и въглехидратната структура на NL-SOD.
9. Изследвания за евентуалното приложение на NL-SOD в медицината.

3. Резултати и Дискусия

3.1. Изолриране на хемоцианин от молоския *Rapala venosa* и изграждащите го структурни субединици

Нативният хемоцианин (Hc) беше пречистен от хемолимфата на морския охлюв *Rapala venosa* чрез центрофугиране. След дисоцииране на нативната форма на този протеин след 24 часов диализа срещу 0.13 M глицин/NaOH буфер, pH 9.6, две структурни субединици бяха разделени на Ni-load 26/10 Serpatoze Q колона (3.4x100mm), уравновесена с 50 mM Tris/HCl буфер, 10 mM EDTA, pH 8.2. (Фиг. 1).

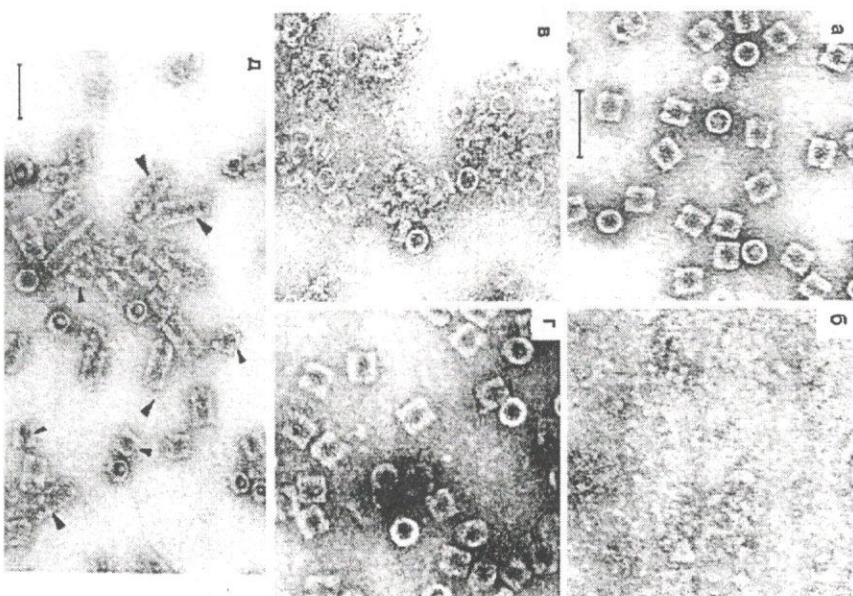


Фиг. 1 а) Бързо ефективна течна хроматография (FPLC) на дисоциирани структурни субединици, проведена на Ni-load 26/10 Serpatoze Q колона (3.4x100mm), уравновесена с 50 mM Tris/HCl буфер, 10 mM EDTA, pH 8.2. Субединиците са разделени чрез елуиране на колоната със солевия градиент чрез NaCl (0.15-1.0 M), при скорост на потока 7.1 милин. Първата фракция (I) съдържа чиста структурна субединица RvN1, втората (II) - смес от двете структурни субединици RvN1 и RvN2. Третата (III) - чиста структурна субединица Hc и неговите структурни субединици RvN1 и RvN2. Ивица 1: стандартна проба на ферити хемоцианин; ивица 2: дисоцирана ивица 4: RvN2 (пик III, фиг. 1 а). Резултати от SDS-PAGE и пик фракция II XLKLVVDSLTXXI.

Фракциите I и III (Фиг. 1) бяха идентифицирани съответно, като структурни субединици RvN1 (420 kDa) и RvN2 (400 kDa). След допълнителното им пречистване на високо ефективна течна хроматография (HPLC) на колона Nucleosil RP18 (C18, 100 мм дължина x 2.1 мм диаметър), елуирана с линеен градиент на разтвор А (0.1% TFA в вода) и разтвор В (0.05% TFA в 80% ацетонитрил/вода) в рамките на 70 мин, те бяха подложени на Едманово секвениране. N-крайната им аминокиселинна последователност потвърди структурното идентифициране на субединиците във фракции I и III.

3.1.1 Изследване на нативната, дисоциирана и реасоциирана форми на хемоцианин *Rapala venosa* и изграждащите го две субединици RvN1 и RvN2 с електронен микроскоп

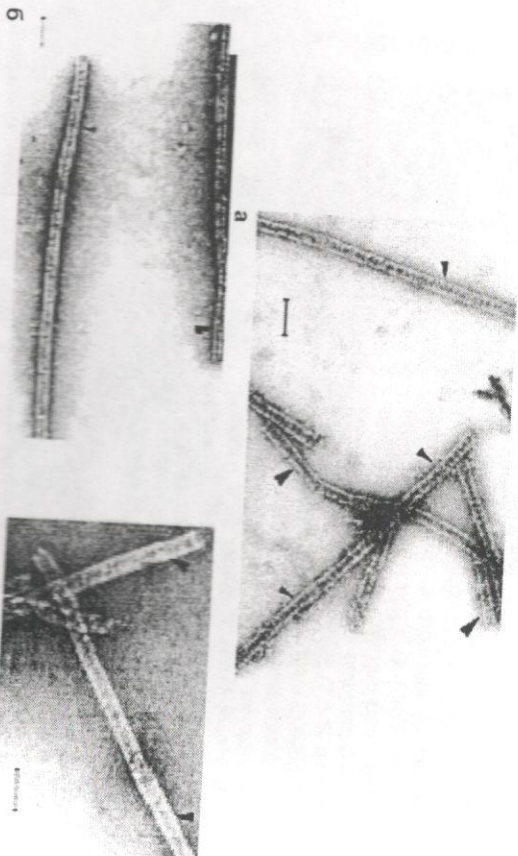
Динамиката на олигомерните състояния на RvN и изграждащите я субединици RvN1 и RvN2 беше изследвана с помоща на електронен микроскоп и сравнена с други хемоцианини от молоски.



Фиг. 2. Снимки от електронен микроскоп на *Rapala venosa* хемоцианин. а) нативен Hc (RvN) в 50 mM Tris/HCl буфер, pH 7.0, съдържащ 20 mM CaCl₂ и 5 mM MgCl₂; б) дисоцииран протеин в 0.13 M глицин/NaOH буфер при pH 9.6; в) реасоцииран RvN след диализа за 2 дни срещу стабилизационен буфер, pH 7.0, съдържащ 20 mM CaCl₂ и MgCl₂; г) реасоцииране на RvN след диализа за 2 дни срещу стабилизационен буфер, pH 7.0, съдържащ 50 mM CaCl₂ и MgCl₂; е) реасоцииране на RvN след диализа за 2 дни срещу стабилизационен буфер, pH 7.0, съдържащ 100 mM CaCl₂ и MgCl₂.

RvH, изолиран директно от хемолимфата на морския охлюв чрез центрофугиране (Фиг. 2а), беше дисоцииран до структурни субединици (Фиг. 2б) и в последствие диализиран срещу 50 mM ТрисHCl буфер, pH 7.0, съдържащ различни концентрации на CaCl_2 и MgCl_2 (Фиг. 2в, г). При увеличаване на концентрациите на двата дивалентни йони Ca^{2+} и Mg^{2+} , беше наблюдавано повишаване на реасоциацията и формиране не само на дидекамери (малките стрелки), но и мултидекамери (големите стрелки) (Фиг. 2г).

Процесът на дисоциация и реасоциация на субединиците RvH1 и RvH2 беше изследван периодично чрез добавяне на различни концентрации на калциеви и магнезиеви йони. Наблюдавана беше тенденция на по-бързо реасоцииране на RvH1 в стабилизиращ буфер, съдържащ 100 mM CaCl_2 и MgCl_2 в сравнение с буфер, съдържащ 10 mM CaCl_2 и MgCl_2 . Формиране на смес от къси сферични тръбички и мултидекамери беше наблюдавано при по-ниските концентрации на CaCl_2 и MgCl_2 , докато много дълги тръбички и мултидекамери бяха формирани при високи концентрации на CaCl_2 и MgCl_2 (Фиг. 3).



Фиг. 3 а) Формиране на смес от къси сферични тръбички (големите стрелки) и мултидекамери (малките стрелки) след тридневна диализа на RvH1 в 50 mM ТрисHCl буфер, pH 7.0, съдържащ 100 mM CaCl_2 и MgCl_2 ; б) реасоцииране на тръбички (големите стрелки) в присъствието на 100 mM CaCl_2 и MgCl_2 ; в) реасоциация на RvH1 след двуседмична диализа в 50 mM ТрисHCl буфер, pH 7.0, съдържащ 100 mM CaCl_2 и MgCl_2 .

От проведените експерименти беше установено, че поведението на RvH1 след реасоциация в присъствието на калциеви и магнезиеви йони прилича повече на поведението на субединиците KLN2 и NiH2, отколкото на поведението на субединиците KLN1 и NiH1.

Стабилността на мултидекамерните форми на RvH1 беше изследвана след диализа срещу 50 mM ТрисHCl буфер, съдържащ 100 mM CaCl_2 и MgCl_2 , но при различни pH. Установено беше, че стабилността на тези форми на RvH1 е pH зависима и след 2-3 дневна диализа срещу буфер с pH 8.6, дължината на мултидекамерите и сферичните тръбички намалява.

При втората субединица RvH2 ситуацията след реасоцииране е различна от тази при RvH1, но също така зависи от pH и концентрацията на калциевите и магнезиевите йони. При високи концентрации на тези йони също се наблюдава тенденция на формиране на мултидекамери и сферични тръбички при RvH2, но те са по-къси в сравнение с тези, формирани от RvH1. Освен това при увеличаване на pH на буфера, RvH2 мултидекамерите са по-нестабилни в сравнение с тези в RvH1.

Ограничената способност на RvH2, KLN1 и NiH1 субединици, за разлика от RvH1, KLN2 и NiH2, да реасоциират в дълги мултидекамерите и сферичните тръбички може да бъде обяснена с високата им стабилност. Предварителните изследвания показваха, че RvH2 е по-стабилна от RvH1 и температурата и на толене (59°C) е по-висока от тази на RvH1 (53°C), KLN1 (56°C) и KLN2 (49°C).

Процесът на реасоцииране на RvH субединиците беше изследван и чрез флуоресцентна спектроскопия. Резултатите потвърдиха направените изводи от електронния микроскоп, че двете субединици RvH1 и RvH2 имат различно поведението в стабилизиращ буфер с концентрации 100 mM CaCl_2 и MgCl_2 .

3.2. Олигомерна стабилност на *Helix vulgatis* хемоцианин

Две субединици, а и в. *Helix vulgatis* с молекулната маса около 400 кДа бяха изолирани след 24 часова диализа на *Helix vulgatis* Hc срещу 0.13 M глицин/NaOH буфер, pH 9.6. Като цялата молекула, така и двете субединици се показаха като по-компактни в сравнение с тези на RvH и при тях беше наблюдаван по-слаб процес на реасоциация.

Фиг. 4 а) Частично реакциране на структурните субединици на Heix vulgatis хемоцианин (HvH) в свободни субединици, мултидекимери (черните стрелки) и дидекимери (белите стрелки) след 24 - часова диализа срещу 50 mM Tris-HCl буфер, pH 7.0, съдържащ 50 mM CaCl₂ и 20 mM MgCl₂.

Фиг. 4 б) Снимки от електронен микроскоп на динамиката на олигомеризация на Heix субединици на Heix vulgatis хемоцианин (HvH). Реакциране на (HvH) в дълги мултидекимери (бялата стрелка) след 3-дневна диализа срещу 50 mM Tris-HCl буфер, pH 7.0, съдържащ 100 mM CaCl₂ и 20 mM MgCl₂.

3.3. Изолиране на функционални единици от структурните субединици RvN1 и RvN2 след деполимеризация с ZnCl₂ и третиране с протеолитични ензими.

След протокола на структурните субединици на RvN с подходящи протеолитични ензими бяха изолирани около 16 функционални единици, но няколко автори (Фиг. 5). Причината може да бъде обяснена с късането на пептидната верига на различни позиции след третиране със специфични ензими. След 15 дневна деполимеризация на структурните субединици RvN1 и RvN2 в буфер, съдържащ 0.05 M ZnCl₂, няколко функционални единици бяха изолирани, като някои с идентични аминокиселинни последователности с тези на функционалните единици, пречистени след третирането с трипсин RvN1 и RvN2 (RvN1-a, RvN1-f, RvN2-a и RvN2-e) (Фиг. 5). Докато останалите функционални единици показваха различни N-крайни аминокиселинни последователности. Тези експерименти потвърдиха нашата хипотеза за свързване на функционалните субединици (50 kDa) чрез въглехидратните вериги и оформяне на структурни връзки между въглехидратните структури и полипептидната верига.

RvN1

RvN1-a*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-b*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-c*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-d*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-e*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-f*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-g*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-h*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-i*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-j*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-k*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-l*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-m*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-n*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-o*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-p*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-q*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-r*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-s*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-t*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-u*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-v*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-w*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-x*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-y*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN1-z*	S L L R K N V D T L T E Q E I L

RvN2

RvN2-a*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-b*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-c*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-d*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-e*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-f*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-g*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-h*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-i*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-j*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-k*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-l*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-m*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-n*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-o*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-p*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-q*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-r*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-s*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-t*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-u*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-v*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-w*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-x*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-y*	S L L R K N V D T L T E Q E I L
RvN2-z*	S L L R K N V D T L T E Q E I L

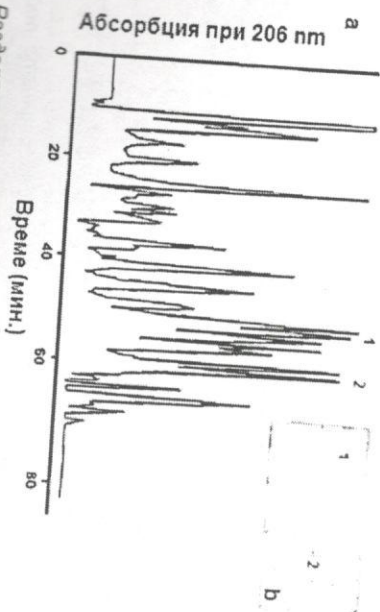
Фиг. 5. Сравняване на N-крайната аминокиселинна последователност на различни функционални единици на Раара уелоза хемоцианин, получени след протеолиза на структурните субединици RvN1 и RvN2 с подходящи протеолитични ензими (a-z) или след третиране с Zn²⁺(a).

3.4. Охарактеризиране на въглехидратното съдържание на Рарапа лепоза хемоцианин, използвайки HPLC/ESI-MS

3.4.1. Изолитране на гликопептиди от функционална единица RvH1-a

Повечето хемоцианини са гликопротеини с голяма разлика, както във въглехидратното им съдържание, така и в техния монозахариден състав. Въглехидратното съдържание на молоските хемоцианини предизвиква особен интерес заради връзката им с имуностимулиращия ефект. Рарапа лепоза хемоцианин е гликопротеин с определено общо въглехидратно съдържание 8.9% за нативната молекула и 12.4% и 4.4% съответно за структурните субединици RvH1 и RvH2.

Проверка за гликозидния характер на RvH1-a беше направена чрез орсинол/H₂SO₄ теста. Стратегията, използвана да се анализира въглехидратното съдържание на RvH1-a включва: притоване на трипсинов хидролизат на функционалната единица и разделяне на получените фрагменти първо чрез гел филтруване (Superdex 300 колона), последвано от разделяне на пептидите на HPLC (Фиг. 6). Само две фракции 1 и 2, даващи положителен резултат с орсинол/H₂SO₄ тест, бяха използвани за определяне на аминокиселинната и въглехидратната последователност чрез електроспрей-йонизационен мас-спектрометър (ESI-MS) и MALDI-MS.



Фиг. 6. а) Разделяне на фракциите на функционалната единица RvH1-a, получени след трипсинова хидролиза, чрез високо ефективна течна хроматография (HPLC) с колона Nucleosil RP18 (C18, 100 мкм дължина x 2.1 мм разтвор В (0.085% TFA в ацетонитрил) в продължение на 70 мин и скорост на потока 1 мл/мин. Пептидите фракции бяха измерени при дължина на вълната 206 nm; б) Орсинол/H₂SO₄ тест на еливаните гликопептиди, използвайки въглехидрат.

3.4.2. Секвениране на гликопептидите от функционална единица RvH1-a

Датата гликопептиди бяха автоматично секвенирани след премахване на въглехидратните вериги с помощта на PNGase-F и техните аминокиселинни последователности са показани на Фиг. 7 (G1p 1 и G1p 2). В същата фигура тези гликопептиди са сравнени, чрез програмите LALIGN и Fasta, със специфични аминокиселинни последователности на други молоски хемоцианини, свързващи въглехидратни вериги.

260	270	400	410
G1p 1 F A K A T S I D R N A	G1p 2 E M L T L N G T N D A		
Msc F G L D S V I N P R D E T T R E N	Msc K E A F N L N G S L G S V N L S O P S V		
Odc F S L T S D I N D P M T R E N	Odc E U N L K D L S G N E A G V N L E T A - I		
Ria F A Q T S A T N P N V T P R A N	Ria E L E V T A R A G T D L S P R E L L K R G S V		
Oda F G R D T - - N P I S L T K E N	Oda N A D V T E I N G T L L P R D G T P R P T V		
Odb F A E E R P L N N K N T N A N	Odb N L C I N D I N G T A L P R P T S I P R P T V		
Odd F S N T T A - N N D R M T L T N	Odd U T E V T A V N G S S I N S D I F R N P T I		
Ode F S F G A R Y N L N D L T K L	Ode K T K L V A C I N G T E L P R A S I L P R E A T V		
Odf F V W S E - - N P N L N T R A A	Odf E V E I E T V D G K V L D S S L P R A R S M		
Odg F N L D T - - N P N A V T K A N	Odg F D I K V T I K G I D N V L S N K U L S P		
Hpg F S D A D - - N V N P V I R T N	Hpg N I N I V S V N G T E L P D S N I L P R S P T V		
Hrd F Q D K K L - N P R N I T N I Y	Hrd K V E I K D L S G T L L P R N I L P R D P S I		

Фиг. 7. Сравняване на аминокиселинната последователност на регионите с предполагаеми N-свързващи центрове на функционални единици от различни хемоцианини от молоски.

Изолитираният гликопептид 1, с молекулярна маса 1177.5 Да, се състои от 12 аминокиселинни остатъка, докато 11 аминокиселинни остатъци са включени в гликопептид 2 с молекулярна маса 1175.6 Да. Два предполагаеми гликозиллирани центрове са открити в аминокиселинната последователност на RvH1-a с типичната последователност (N-X-T) за N-свързващи олигозахариди (Фиг. 7).

3.4.3. Определяне на въглехидратната структура на гликопептид 1 (G1p 1), изолитиран от функционалната единица RvH1-a

Гликопептид 1 беше анализиран с лазер десорбционен мас-спектрометър (MALDI-MS) преди и след третиране с PNGase-F (Таблица 1). В MALDI спектъра получен преди третиране с PNGase-F беше измерен само един йон с маса/заряд 2786, който представлява масата на целия гликопептид G1p 1 плюс един натриев йон [G1p 1+Na]⁺. След третиране на гликопептид G1p 1 с PNGase-F обаче бяха измерени три сигнала в MALDI спектъра с маса/заряд 1177, 1609 и 2786. Сигналят 2786 се дължи на целия G1p 1 плюс натриев йон, докато сигнала 1609 [M+Na]⁺ представлява олигозахаридната част. Първият сигнал с маса/заряд 1177

ответствата на дегликозириания пептид, както беше потвърдено и чрез изчисляване на масите от аминокиселинната последователност.

Таблица 1. Монозахаридни маси на изолираните гликопептиди от функционалните единици RvN1-а и RvN1-ф на хемоцианин от *Rapana venosa*, определени след третиране със специфичната гликозидаза PNGase-F и измерени с MALDI-MS.

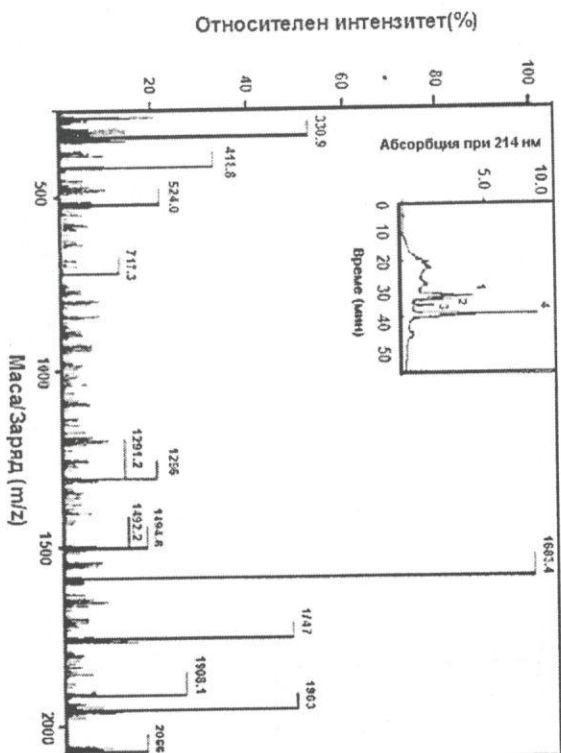
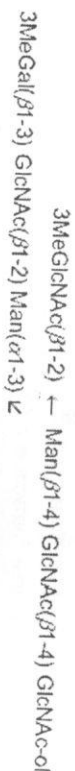
Фракции	Амино-киселинната последователност на пептида	Гликопептид Мм (Да)	Пептид Мм (Да)	Олигозахарид Мм (Да)
G1p 1	FANATSIDGRVA	2786	1177.0 ^a	1609
G1p 2	EMLTNGTDLA	2763 + Na ⁺	1177.5 ^b	[1586 + Na] ⁺
G1p 3	IHSYSGSYNASLLHGPSII	2846.2	1175.7 ^a	1653
		[2828 + H] ⁺	1175.6 ^b	[1652 + H] ⁺
		3848	2940 ^c	907
		[3847 + H] ⁺		

а) Молекулна маса измерена с MALDI

б) Молекулна маса изчислена от аминокиселинната последователност

За да се определи олигозахаридната последователност, гликопептидът 1 беше третиран с различни специфични ензими (гликозидази) и получените фракции бяха анализирани чрез капилярна електрофореза и електрооспей йонизационен мас-спектрометър (ESI-MS) (Фиг. 8). Чрез капилярната електрофореза беше установено наличието на множество фракции след третиране със специфични гликозидази, а чрез измерването на точните им маси и секвениране с помощта на ESI-MS бяха анализирани всички пикове и следната въглехидратната структура на гликопептид 1 беше определена:

Гликопептид 1

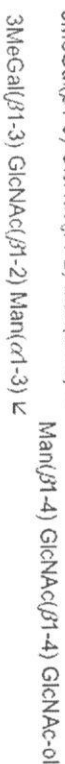


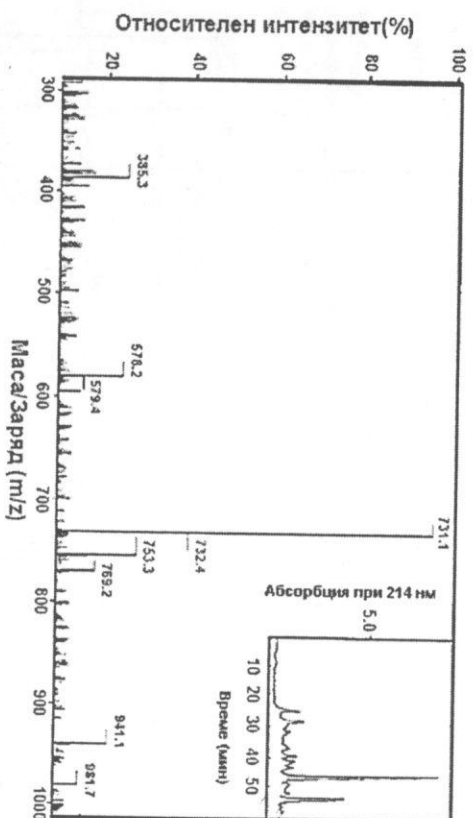
Фиг. 8 а) Електрооспей йонизационен мас-спектър (ESI-MS) след ензимно разкъсване на гликопептид G1p 1 със специфични гликозидази: $\beta1-2,3,4,6$ -GlcNAcase, $\alpha1-2,3,6$ -манозидаза и $\alpha1-2,3$ -манозидаза; б) (малката диаграма): капилярна електрофореза на G1p 1 след третиране с различни гликозидази, показващи няколко разделяния на фрагментите. Условя: G1p 1 беше разтворен в 50 μ l движещ буфер (50 mM фосфатен буфер, pH 2.5), разреден с вода (10:1, v/v) и инжектиран (5 милин).

3.4.4. Определяне на въглехидратната структура на гликопептид 2 (G1p 2), изолиран от функционална единица RvN1-а и гликопептид 3 (G1p 3), изолиран от функционална единица RvN1-ф

Използвайки същият метод, както за анализиране на гликопептид 1, беше получен мас-спектъра на гликопептид 2 след третиране с различни специфични ензими (гликозидази) (Фиг. 9). Две фракции бяха идентифицирани чрез капилярна електрофореза след разкъсване на G1p 2 с PNGase F. Едната фракция принадлежаша на пептидната част, а другата на въглехидратната верига беше секвенирана и измерена с ESI-MS. По този начин беше определена следната въглехидратната структура на гликопептид 2:

Гликопептид 2





Фиг. 9 а) Електрострей йонизационен мас-спектр (ESI-MS) на гликопептид *Slr 2* след ензимно разкъсване със специфични гликозидази: PNGase-F, β 1-2,3,4,6-GlcNAcase и α 1-2,3-манозидаза. б) (малката диаграма): Капиларна електрофореза на *Slr 2* след третиране с PNGase-F показва 2 главни разделения на фрагментите. Услови: *Slr 2* е разтворен в 50 μ l буфер (50 mM фосфатен буфер, pH 2.5), разреден с вода (10:1, v/v) и инжектиран (5 миклин.).

По същия метод беше определена въглехидратната структура на гликопептид 3 (*Slr 3*) от функционална единица RVN1-f.

Гликопептид 3

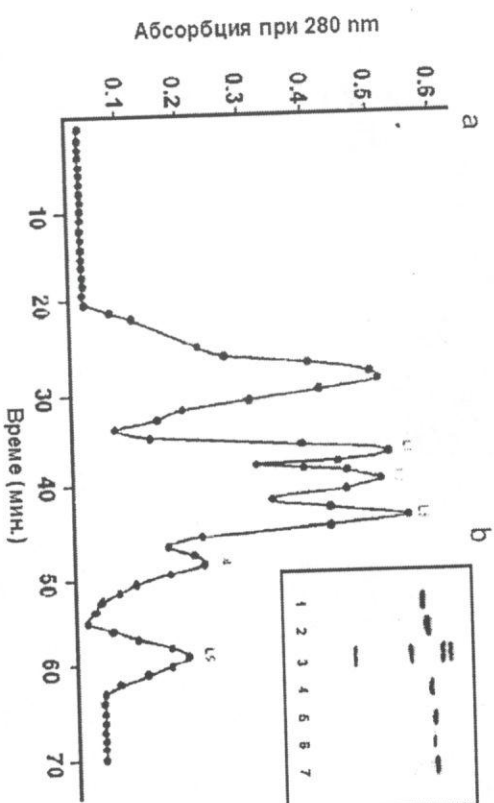


3.5. Структура и стабилност на хемоцианин от артроподния *Limulus polyphemus*

Другият вид представител на хемоцианините са артроподните хемоцианини, чието строение се различава от тази на моллюските. Нативната молекула на артроподните хемоцианини е изградена от моно-, 2-, 4- и 6- хексамери, като молекулната маса на една структурна субединица е около 75 кДа и включва в активния център два медни йона.

Хемоцианинът беше изолиран от *Limulus polyphemus*, принадлежащ към артроподните хемоцианини, клас Chelicerata. След дисоцииране на нативната молекула на хемоцианина от *Limulus polyphemus* след диализа срещу 0.1 M

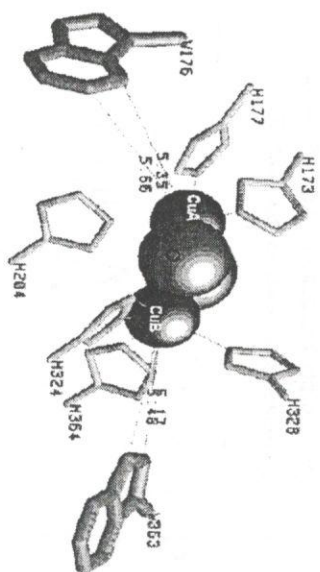
бикарбонатен буфер с pH 9.6 и в присъствие на 1 M урея, бяха изолирани 5 субединици с молекулна маса около 75 кДа (Фиг. 10).



Фиг. 10 а) Бързо ефективна течна хроматография (FPLC) на дисоциираните структурни субединици на хемоцианин от *Limulus polyphemus* на колоната Resourse 6 ml, уравновесена с 0.1 M NaHCO₃ буфер, съдържащ 10 mM EDTA и 1 M урея, pH 9.5. Субединиците бяха разделени с линейен NaCl градиент (0-1 M) при скорост на потока 2.0 миклин. Първият пик (без номер) представлява недисоцииран протеин; б) 10% напрежение додецил сулфат полиакриламиден гел електрофореза (SDS PAGE) на изолираните фракции L1-L5, представени като пикове 2, 4, 5, 6, 7; цвят 1 - биволски серумен албумин (66 кДа), цвят 2 - структурна субединица L5, цвят 3 - стандарт [смес от протеини: яден албумин (45 кДа), биволски серумен албумин (66 кДа) и фосфооридаза 6 (97.4 кДа)] и цвят 4-7 - структурни субединици L1, L2, L3, L4 съответно.

От публикуваните аминокиселинни последователности на структурни субединица от артроподни хемоцианини е установено наличието на приблизително 18 тирозини и 7 триптофанови остатъци в една структурна субединица. Четири от триптофановите остатъци в една структурна субединица на хемоцианин от *Limulus polyphemus* са разположени в близост до активния център, като Trp 176 и Trp 363 се намират на разстояние около 5 Å.

От кристалната структура на активните центрове, А и В на структурна субединица на хемоцианин от *Limulus polyphemus* бяха измерени разстоянията между медните йони и триптофановите остатъци (Фиг. 11).



3.5.1. Флуоресцентни свойства на нативната молекула и структурните субединици на хемоцианин от *Limulus polyphemus*

При сравняване на емисионните свойства на окси- и апо- формите на два артроподни хемоцианини *P. vulgaris* и *Limulus polyphemus* при еднакви експериментални условия беше показано, че квантовия добив на флуоресценция силно се повишава и при двата хемоцианини след премахване на медните йони от активния център (апо-форма) (Таблица 2). Това се обяснява с посвещения ефект на медните йони върху триптофановата емисия и по-конкретно на Трп 176 и Трп 363, които се намират на разстояние 5.36 и 5.17 Å от СуА и СуВ.

Повишаване на квантовия добив на флуоресценция, както и отстраняване на λ_{max} беше измерено и за изолираните 5 структурни субединици на хемоданин от *Limulus polyphemus*, което показва, че има изложени индолни ядра на повърхността на молекулата на структурната субединица, които частично са погребани от съседните структурни субединици, изграждащи нативната молекула на хемоданина.

Таблица 2. Сравнение на N-крайни аминокиселинни последователности на различни видове артроподни хемоцианини и техните флуоресцентни свойства.

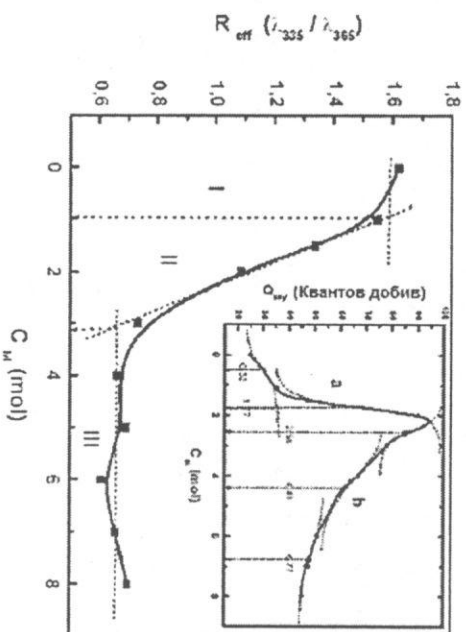
[illegible]

3.5.2. Изследване денатуриращият ефект на гуанидин хидрохлорид (Gdn.HCl) върху нативния хемоцианин от *Limulus polyphemus* чрез флуоресцентна спектроскопия.

Изследвани бяха настъпващите промените в конформацията и агрегацията на хемоглобина по време на разгъване на молекулата в присъствие на Gd³⁺. НСІ.

добавяне на различни концентрации на $GdCl_3$ (между 0 и 1.5 M) беше наблюдавано леко повишаване на флуоресцентния интензитет, докато най-висока стойност на емисията беше измерена при 2 M $GdCl_3$, където молекулата напълно се е дисоциирала на изграждащите я субединици, а също така и погасяващият ефект на медните йони е елиминиран.

За по-добро изясняване на процеса на разгъване на окси-НС бяха сравнени кривата Q/C_m (Фиг. 12 малката диаграма) с R_{eff}/C_m , кривата показана във Фиг. 12.



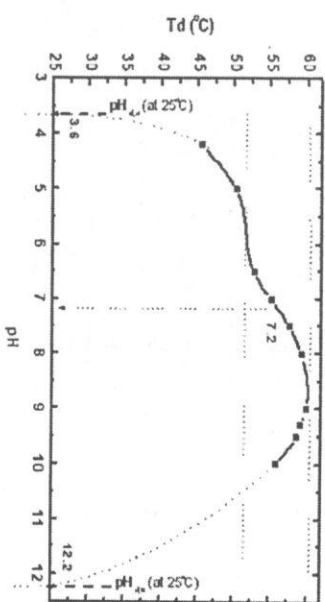
Фиг. 12. Ефективното съотношение на интензитета на флуоресцентната емисия (R_{eff}) на *Limulus polyphemus* HC при различни концентрации на гуанидин хидрохлорид ($GdHCl$). (малката фигура): Ефект на $GdCl_3$ (0-8 M) върху интензитета на флуоресцентната емисия на окси-НС *Limulus polyphemus* с концентрация 0.05 мг/мл, в 0.05 M Трис-НС буфер, рН 8.2, съдържащ 5 mM $CaCl_2$ и $MgCl_2$. Флуоресцентният квантов добив (Q) беше определен, използвайки N-Ас-Тр- NH_2 като стандарт. Флуоресцентният интензитет е избран при две произволни дължини на вълната 336 и 365 nm.

3.5.3. Температурно денатуриране на нативния хемоцианин от *Limulus polyphemus*

Термичното денатуриране на различни видове хемоцианини беше изследвано чрез кръгово дихроична спектроскопия (CD). Далечния UV CD спектър на нативния протеин *Limulus polyphemus*, разтворен в 50 mM Трис/НСl, рН 8.2, е доминиран от отрицателна елиптичност при 220 nm, дължаща се на наличието на α -хеликс структура. Наличието и промените на β -структурата също беше проследено с промяната на отрицателната елиптичност, измерена при 210 nm.

Незначителни промени в елиптичността бяха наблюдавани в далечната област при премахване на медните йони и при дисоцииране на нативната молекула.

Зависимостта на температурата на топене (T_m), изчислена от получените CD спектри при различни рН стойности в температурния интервал 20-95 °C е представена на $T_d(\Delta G)$ -рН фазовата диаграма (Фиг. 13).



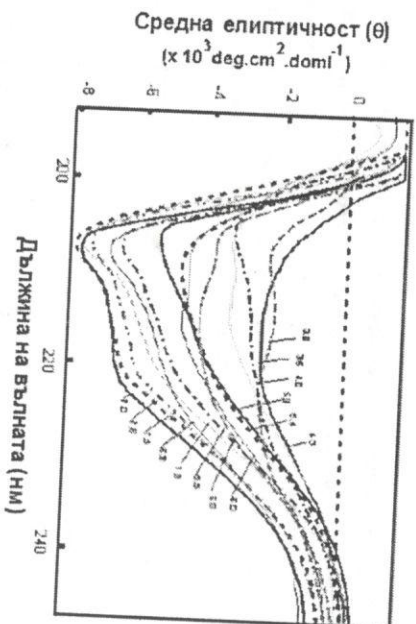
Фиг. 13. $T_d(\Delta G)$ -рН фазова диаграма на окси-НС от *Limulus polyphemus*. рН (рН 3-12) зависимост на температурата на денатурация (T_d). T_m -температура на топене.

От показаната фазова диаграма беше установено, че температурата на денатуриране намалява рязко при рН стойности по-ниски от 5.0 до 3.6 и по-високи от 10.0 до 12.2. рН зависимости на температурата на топене е доста сходна за нативната молекула и структурните субединици. Те достигат максималната температура на топене около рН 9.

Установено беше, че протеинът е стабилен в областта около рН 7.2 (рН 6.5-9.0) и е напълно денатуриран при рН 3.6 и рН 12.2, при 25°C.

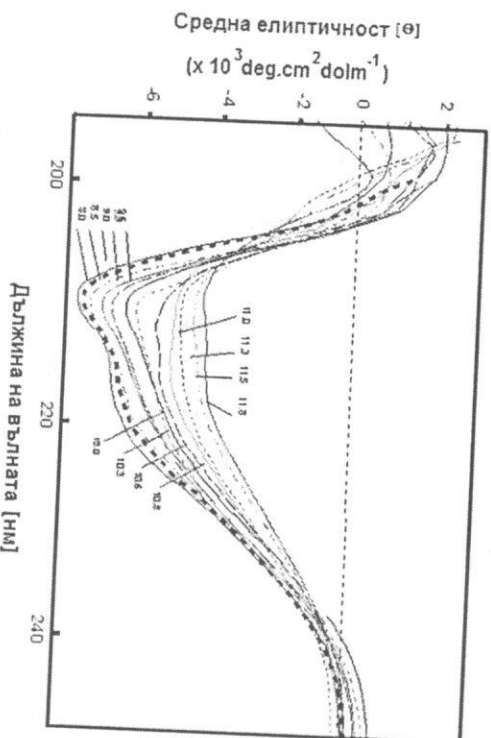
3.5.4. Ефект на рН върху стабилността на нативния хемоцианин от *Limulus polyphemus*

Процесът на разгъване на молекулата на хемоцианин от *Limulus polyphemus* в рН областта (рН 2-12) беше изследван с помощта на кръгов дихроизъм. CD спектрите на хемоцианин от *Limulus polyphemus*, измерени в далечната UV област, в Трис буфер при различни рН стойности са показани на Фиг. 14 и Фиг. 15.



Фиг. 14. Кръгово дихроични спектри (CD) на нативния хемоцианин от *Limulus polyphemus*, измерени в киселата pH област (3.0-7.8). Хемоцианинът е инкубиран в продължение на 24 часа в буфери с различни pH: 0.05 M натриев сулфат (pH 3.0-5.0) и 0.05 M натриев фосфат (pH 5.0-7.0). pH денатурирането на Hc (0.4 mg/ml) е проследено чрез записване на CD спектрите в областта 200-260 nm.

Наблюдавани бяха само незначителни промени на елиптичността в pH област 6.0-9.0, където протеина остава стабилен.



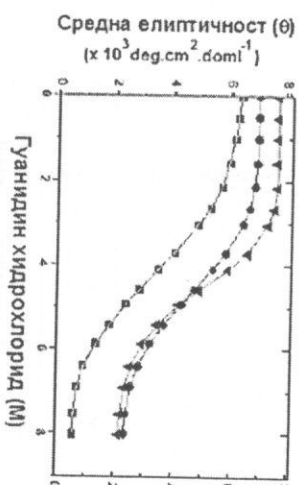
Фиг. 15. Кръгово дихроични спектри (CD) на нативния хемоцианин от *Limulus polyphemus* в алкалната pH област (8.0-11.8). Hc беше инкубиран за 24 часа в различни буфери в pH областта 7.0-8.0: 0.05 M Трис/HCl (pH 7.0-9.0), 0.05 M карбонат/бикарбонат (pH 9.0-10.5) и NaOH (pH 11.0-12.0). pH денатурирането е проследено чрез записване на CD спектри на Hc (0.4 mg/ml) в дадената ултравиолетова област 200-260 nm.

Тези резултати съответстват с данните получени от флуоресцентните изследвания и потвърждават заключението, че структурата на нативната молекула на хемоцианин от *Limulus polyphemus* и неговите структурни субединици е стабилна в pH областта от pH 6 до pH 9.

3.5.5. Изследване денатурирането на нативния хемоцианин от *Limulus polyphemus* с гуанидин хидрохлорид (Gdn.HCl) чрез кръгов дихроизъм.

Хемоцианин от *Limulus polyphemus* и една структурна субединица бяха инкубирани 24 часа в буфер с различни концентрации на Gdn.HCl (0 – 8.0 M). След проследяване на промените на елиптичността при 222 nm беше установено, че при увеличаване на концентрацията на денатуранта, CD сигналът намалява значително.

Стабилността на хемоцианина от *Limulus polyphemus* при денатуриране с гуанидин хидрохлорид беше сравнена със стабилността на други артроподни Hc, като *S. aestivae* и *P. vulgaris* (Фиг. 16). От тези данни беше направен извод, че нативния хемоцианин от *Limulus polyphemus* е по-стабилен при денатуриране с гуанидин хидрохлорид, отколкото са другите хемоцианини.



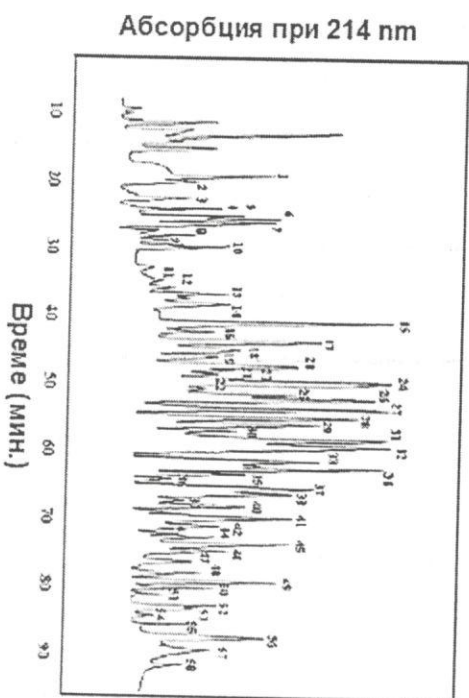
Фиг. 16. Ефекта на гуанидин хидрохлорид върху интензитета на Котон ефекта при 221 nm на нативен *Limulus polyphemus* (червен), *S. aestivae* (син) и *P. vulgaris* (черен) Hcs. Денатурирането с Gdn.HCl е проследено чрез записване на CD спектри на Hc (0.4 mg/ml) в областта 200-260 nm, 0.05 M Трис/HCl буфер, pH 7.0, съдържащ 5 mM CaCl_2 и MgCl_2 , при различни концентрации на Gdn.HCl (0-8 M), при 25°C.

Концентрация на Gdn.HCl до 2 M почти не влияе върху структурата на хемоцианините. Значително намаляване на елиптичността беше наблюдавано при всички хемоцианини в областта 2.5-6.0 M Gdn.HCl. При концентрация над 6.0 M молекулата на хемоцианина е напълно денатурирана.

3.6. Изследване структурата на една структурна субединица (CaSS2), изолирана от хемоцианин на артроподния *Garcinus aestuarii*

Хемоцианинът от *Garcinus aestuarii* съдържа три големи и две малки полипептидни вериги с различни N-крайни аминокиселинни последователности.

Аминокиселинната последователност на структурната субединица CaSS2 беше определена чрез автоматично Едманово разкъсване и MALDI-MS анализи на фрагменти от протеина, получени след разкъсване с химотрипсин и трипсин. Първо получените пептиди бяха разделени на две фракции на Superdex HR 10/30 колона, които фракции бяха фракционирани чрез RP-NPLC (Фиг. 17). След анализиране на изолираните пептиди с мас-спектрометър, в последствие беше определена аминокиселинната им последователност.



Фиг. 17. Разделяне на фракциите на структурна субединица CaSS2, изолирана от хемоцианин на *Garcinus aestuarii*, получени след трипсинова хидролиза, чрез високо ефективна течна хроматография (HPLC). Колона: Nucleosil 100 RP18 (250 x 10 mm) елуирана с линеен градиент от 5% В до 90% В в рамките на 110 мин. Разтвор А (0.1% TFA във вода) и разтвор В (0.1% TFA в 80% ацетонитрил). Скорост на потока 1 ml/min. Пептидните фракции бяха измерени при дължина на вълната 214 nm.

Измерените молекулни маси, аминокиселинна последователност и позицията на получените пептиди, след разкъсване на молекулата на структурна субединица CaSS2 с трипсин са показани на Таблица 3.

Таблица 3. Едманово разкъсване и мас-спектрометричен анализ на пептидите, получени чрез трипсинова хидролиза на структурната субединица CaSS2, изолирана от хемоцианин на *Garcinus aestuarii*. Потенциалните O-свързани и N-свързани гликозилирани центрове са отбелязани с тъмен шрифт.

Пик №	Аминокиселинна последователност	Позиция	Мм (Da)
4	DSRGASDAQK	1-11	1032.0
32	TFDVNSLMRVK	12-22	1250.5
49	YEEIRDRLK	23-32	1299.4
6	ELSLFDRPSGNHDDGVSAKR	33-54	2408.5
47	LMKELNENRLQDSHWK	55-71	2209.5
11	SLFNPR	72-77	732.8
54	TREEDLMLYNV	78-88	1382.5
42	DENSGNWDTF	89-98	1207.2
57	AGNAAFRR	99-106	852.9
56	VHNEGFFVYASYS	107-120	1618.7
16	VHNSK	121-126	681.8
34	LTONVLRPLEVTRN	127-142	1843.1
53	LFTNSEVIQAYAAK	143-157	1682.9
2	MTQTRTK	158-164	805.9
5	IFANFTGSK	165-173	1007.1
1	SNPEQR	174-179	729.7
33	VAYFGEDIGMNTNHTWN	180-197	2114.3
40	HLERFWWDANVD	197-210	2511.7
10	ANVDNHER	207-215	1177.2
51	GECSGS	217-222	568.5
38	VHNLTVRFDAER	224-236	1607.8
35	LSNYLDRVR	237-245	1076.2
22	ELHWDDV	246-252	912.9
15	IHEGFARNTSYK	253-264	1386.5
17	YGGVFRDRDNNFEDVDGVARVR	265-288	2757.9
12	VRDMLLFEER	287-296	1780.1
20	IQDADANGYLK	297-307	1256.4
18	YNGSTNIR	308-316	1037.1
27	DNHGIDVLGDVESSMYSPRDVY	317-340	2808.0
7	GALHNOANR	341-349	1003.1
9	VLGSOADPNKG	350-360	1108.2
13	FALRPGVLENETATR	361-376	1785.0
30	DPAFFRLNK	377-385	1130.3
31	YMDNIFRKHK	386-395	1351.6
19	DSLTRYTKNELK	396-407	1408.6
37	FEGVNIDSIYEK	408-419	1413.5
36	GNLETF	420-426	842.9
44	TYESFMVTGVNI	425-437	1571.7
48	MLLTNDVDDVDI	438-449	1362.5
8	ATYTDLANK	450-459	1132.3

Продължение на таблица 3

Пик №	Аминокиселинна последователност	Позиция	Мм (да)
55	ELSFQEDVTNEGDIQVETVR	460-480	2350.5
39	IFAWP	481-485	632.7
28	IDDDHVEFSFNEG	486-499	1679.7
45	WDVEMDKFWWM	500-511	1598.9
58	LENCHNSIDR	512-521	1200.3
41	SSFDSTVTPDR	522-533	1324.4
52	SFNDIEDRT	535-543	1119.1
46	SEAIRNGK	544-551	837.9
3	ELHIEEFSTGLPNR	552-567	1870.0
23	FLIPK	568-572	616.8
29	GLVKGDMDVMV	573-584	1291.6
50	AVTSGEGLA	585-593	803.9
21	AVEGLNR	594-600	780.9
14	SANFANGSREVR	601-613	1424.5
24	YRDKRNHGRPLVR	614-626	1638.8
43	RVDDER	627-632	729.7
25	ITGVTFNK	633-641	992.2
26	HIQVKKFNH	642-650	1144.3

Пълната аминокиселинна последователност на структурната субединица

CaSS2, получена чрез комбинация на Едманово секвениране и мас-спектрометрия, беше определена и сравнена с аминокиселинните последователности на други известни хемоглибини (Фиг. 18).

CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
CaSS2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59																																									



Фиг. 18. Сравнение на аминокиселинна последователност на структурната субединица CaesS2 с аминокиселинните последователности на структурната субединица, изолирани от други артроподни хемоцианини.

Получената първичната структура на CaesS2 показа висока степен на хомоложност с пептидната последователност на субединица 6, изолирана от родния хемоцианин от *Salicet marginatus*. Установено бе, че CaesS2 се състои от 650 аминокиселинни остатъци и изчислената молекулна маса от 74 870 Да съвпада с резултатите получени от SDS-PAGE. Сравнението с други хемоцианини от вида *Stuslasea* показва, че дължината на полипептидната верига на тези Hc е приблизително еднаква, около 650 аминокиселини. Първичната структура на CaesS2 показва доста високо съдържание на триптофан, тирозин и фенилаланин, което прави флуоресцентната спектроскопия подходящ метод за изследване на стабилността на този протеин.

3.6.1. Флуоресцентни свойства на структурна субединица CaesS2, изолирана от хемоцианин на артроподния *Salicet marginatus*

Наличието на 10 триптофанови и 27 тирозинови остатъци беше установено в аминокиселинната последователност на CaesS2. При възбуждане със светлина с дължина на вълната при 295 nm, нативния окси-хемоцианин и окси-структурни субединици показваха емисия с λ_{max} при 310–336 nm (Таблица 4), доказваща присъствието на "погребани" триптофанови странични вериги във вътрешността на молекулата. Наличието на тези триптофани беше потвърдено и при погасяне на триптофановата флуоресценция с йонни гасители KI и CsCl и неутралния гасител аcriлaмид. Измерените ниски стойности на константите на погасяне с йонни гасители се дължат на ограничените им достъп до индоловите ядра, разположени във вътрешността на молекулата.

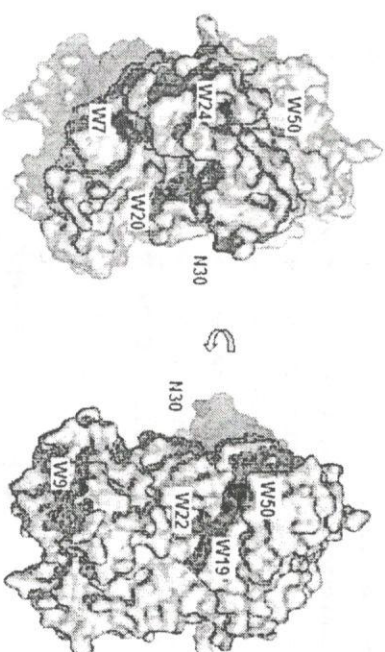
Анализирайки тези данни, триптофановите остатъци разположени в структурната субединица CaesS2 могат да бъдат класифицирани в три класа с време на живот съответно около 0.11-0.15, 0.33 и 3.1-3.5 ns.

Таблица 4. Константа на погасяване (K_{sv}) на индоловата емисия на мономерната CaesS2 и нативния хемоцианин от *Salicet marginatus* в присъствието на аcriлaмид, калиев йодид и меден комплекс ($Cu^{II}(PurPr)^{2+}$).

Проба	KI (K_{sv}) (dm ³ mol ⁻¹)	Акриламид (K_{sv}) (dm ³ mol ⁻¹)	Меден комплекс (K_{sv}) (dm ³ mol ⁻¹)	Емисия λ_{exc} (nm) Възбуждане при 295 nm
oxy-	oxy-	oxy-	oxy-	oxy-
ap-	ap-	ap-	ap-	ap-
Нативен Hc	-	-	-	-
CaesS1	1.0 ^a	2.2 ^a	4.0 ^b	310±1 ^a
CaesS2	1.0 ^b	2.4 ^a	3.5 ^b	322±1 ^a
CaesS3	1.0 ^b	0.9 ^a	10.0 ^b	331±1 ^a
				332±1 ^a
				335±1 ^a

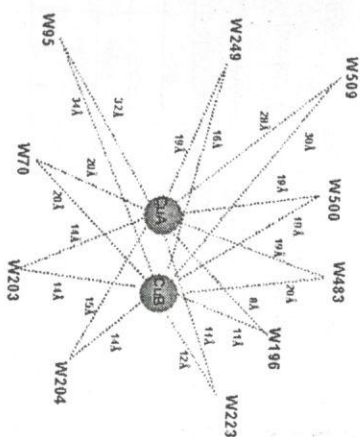
^a [Dolastika-Angelova 1999]; ^b [DI Muro 2002]

Разположението на триптофановите остатъци в молекулата на CaesS2 е показано на Фиг. 19. Тези данни дават полезна информация за обяснение на флуоресцентните свойства на протеина.



Фиг. 19. Кристалографски модел на структурната субединица CaesS2. Предполагаме места на разположението на триптофановите остатъци (отбелязани в червено) и N-свързвания гликозилиран център (отбелязан в синьо).

Погасянето на триптофановата флуоресценция от медните йони е много кратък процес, който протича, когато разстояние между индоловите ядра и погасяващите медни йони е под 14 Å. От кристалографския модел беше изчислено, че разстоянията от Trp 196, 203, 223 и 249 до медните йони са под 14 Å (Фиг. 20). Тези триптофани са флуоресцентно активни само когато медните йони бъдат отстранени от активния център.

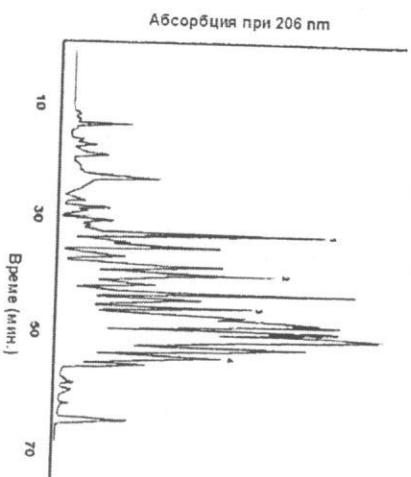


Фиг. 20. Приблизителни разстояния между триптофановите остатъци и медния център в хемоцианин от *Sarcinus aestivalis*.

3.7. Вългехидратен състав на структурна субединица 2 (CaESS2) на хемоцианин от *Sarcinus aestivalis*

Артроподният хемоцианин *Sarcinus aestivalis* е гликопротеин, както беше определено чрез орсинол/ H_2SO_4 метода. Установено беше, че вългехидратният състав на целия нативен хемоцианин е 1.6%, докато на CaESS2 е 6.3%, което е необичайно висока стойност за артроподни хемоцианини.

За да се изследва вългехидратната структура на CaESS2, пречистената субединица беше подложена на трипсинова хидролиза, последвано от фракциониране на получените пептиди на Superdex 300 колона. Фракцията, показала положителен резултат за вългехидрати с орсинол/ H_2SO_4 метод, беше допълнително разделена на HPLC (Фиг. 21).



Фиг. 21. Разделяне на гликопептидните фракции на хемоцианин от *Sarcinus aestivalis*, получени след трипсинова хидролиза чрез високо ефективна течна хроматография (HPLC). Колона: Nucleosil 7 C18 (250 x 10 mm) елуирана с плевнен градиент от 5% А до 100% В в рамките на 70 мин. Разтвор А (0.1% TFA във вода) и разтвор В (0.085% TFA в ацетонитрил). Скоростта на потока е 1 ml/min.

Установено беше, че четири фракции съдържат вългехидрати (показани на Фиг. 21). Фракциите 1, 2 и 3 съдържат в секвенцията си аминокиселините СерТре, които участват в О-гликозилираните центрове, докато фракция 4 съдържа Асп-Ххх-СерТре, типична последователност за N-гликозилирани центрове.

Различните гликопептиди в последствие бяха охарактеризирани с MALDI-MS, като бяха определени техните молекулни маси преди и след секвениране на вългехидратните вериги (Таблица 5). За целта бяха използвани специфични гликозидази, които разкъсват вългехидратните структури на различни позиции.

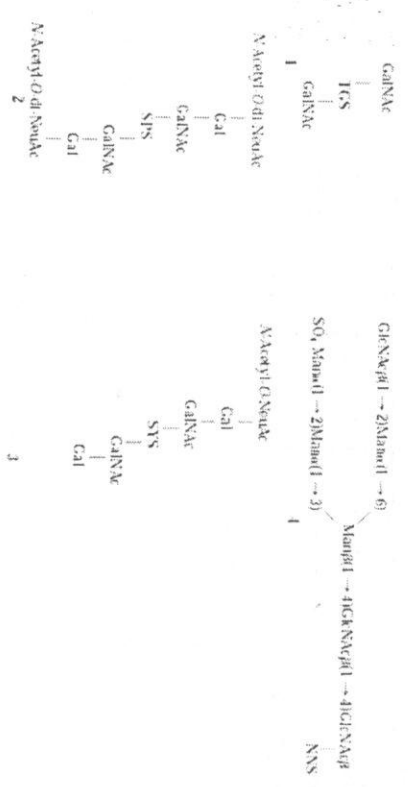
За интерпретиране на резултатите от гликопептидите, разкъсването им беше извършено на два етапа: първо разкъсване с неураминидаза, последвано от разкъсване с α -N-ацетилгалактозаминидаза или β -галактозидаза.

Таблица 5. Структура на гликопептидите, изолирани от структурна субединица CaESS2 на хемоцианин от *Sarcinus aestivalis*.

Фракция ¹	Маса на гликопептида ²	Маса на олигозахарида ³	Маса на пептида ⁴	Вългехидратен състав ⁵	Место на свързване
1	1369	1369	995	GluNAc ₂	Thr-Glu-Ser
2	2456	1762	1030	N-Acetyl-O-di-N-acetyl-Gal-GluNAc ₂	Ser-Pro-Ser
3	2855	2222	1330	N-Acetyl-O-N-acetyl-Gal-GluNAc ₂	Ser-Tyr-Ser
4	2498	2498	1150	SO ₄ Mann-GluNAc ₂	Asp-Asn-Ser

- Номериране на гликопептидите, съответстващо на пиковите от HPLC от Фиг. 21.
- Измерената маса на гликопептида с MALDI-MS
- Определена с MALDI-MS (стойностите в скобите са предсказани въз основа на пептидната секвенция).
- Маса на олигозахаридите, изчислени от разликите в масата на гликопептида и масата на пептида.
- Маса на олигозахаридите, определена на базата на разкъсване със специфични ензими и измерена с MALDI-MS.

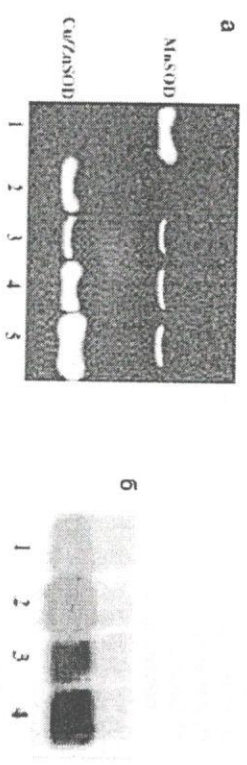
Вългехидратния състав на различните гликопептиди е предсказан, базирайки се на реактивността им към специфичните ензими и от измерените разлики на молекулните им маси. Предполагаемият състав и структура на изолираните гликопептиди са показани в Таблица 5 и Фиг. 22. Установено беше наличието на четири гликопептиди в структурната субединица CaESS2, като три от тях са О-свързани гликопептиди и един е N-свързан. Гликопептид 4 се различава от останалите три по съдържанието на аспаргинов остатък и типичната за N-гликозилиране последователност Асп-Ххх-СерТре (Фиг. 22).



Фиг. 22. Предполагам състав на гликопептидите идентифицирани в структурна субединица Cu/Zn-SOD, изолирана от хемоцитани на *Salicaps aestuarii*. TGS, SPS, SYS и NNS- са аминокиселинните последователности на гликозилираните центрове в Cu/Zn-SOD.

3.8. Изолиране, структура и биологични изследвания на ензима Cu/Zn-супероксид дисмутаза (Cu/Zn-SOD) от гъбичен щам *Nitrosella lutea* 103 (NL-SOD).

Натурално гликозилираният ензим Cu/Zn-SOD беше изолиран от гъбичния щам *Nitrosella lutea* 103, като електрофоретично по метода на Дейвис беше установено наличието на мантан и Cu/Zn-SOD-зи (Фиг. 23).

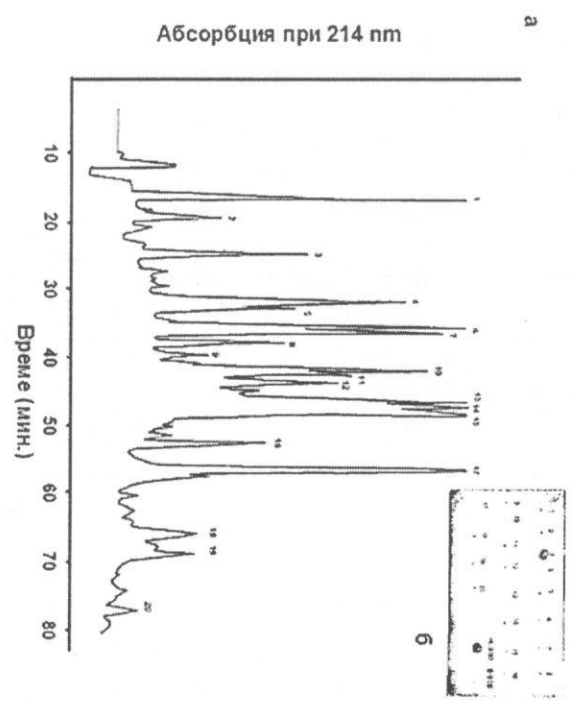


Фиг. 23. PAGE по метода на Дейвис: а) инхибиране на активността при различни концентрации на калиев цианид и б) определяне на протеин

Установено бе, че изолираната Cu/Zn-SOD представлява димер с молекулярна маса 32 kDa на цялата молекула и около 16 kDa на една субединица.

Определена беше първичната структура на Cu/Zn-SOD чрез секвениране на N-крайната аминокиселинна последователност и на получените пептиди след

третиране на протеина с трипсин и химотрипсин. HPLC профилът на фракционирание на получените след трипсинова хидролиза пептиди е показан на Фиг. 24. Изолираните фракции бяха събрани и анализирани чрез MALDI-MS и аминокиселинно секвениране.



Фиг. 24 а) Разделяне на получените пептиди след трипсинова хидролиза на ензима *Nitrosella lutea* супероксид дисмутаза (NL-SOD) с високо ефективна течна хроматография (HPLC). Колоната: Nucleosil RP-18 (C18, 100 x 2.1 mm), елуирана с линейен градиент от разтвор А и разтвор В в рамките на 70 мин. Разтвор А (0.1% TFA във вода) и разтвор В (0.085% TFA в ацетонитрил). Скорост на потока 1 ml/min. Пептидните фракции бяха измерени при дължина на вълната 206 nm. б) Орсинол/Н₂SO₄ тест на елуираните пептиди от HPLC и нанесени на силিকা гел плочи.

Експериментално определените маси на пептидите чрез MALDI-MS съответстват на теоретично изчислените маси от секвентния анализ. Пълната аминокиселинна последователност на NL-SOD беше определена чрез комбинирание на получените резултати от Емановото разграждане, MALDI-TOF анализи и сравняване на секвенцията със тези на други SOD-зи (Фиг. 25). Въз основа на първичната структура беше изчислена и точната молекулярна маса на една субединица 15716 Da. Само един триптофанов остатък беше идентифициран на позиция 32, както и при останалите SOD-зи и два цистеинови остатъци, които се предполагат, че образуват дисулфидна връзка.

<i>H. lutea</i>	1	10	20	30	40
<i>A. fumigatus</i>	VKAVALRGDSKI	TGTVTFEQADNES	APTIVS WNI	TGNDP	
<i>E. nidulans</i>	VKAVALRGDSKI	TGTVTFEQADNES	APTIVS WNI	TGNDP	
<i>C. purpurea</i>	VKAVALRGDSKI	TGTVTFEQADNES	APTIVS WNI	TGNDP	
<i>N. crassa</i>	VKAVALRGDSKI	TGTVTFEQADNES	APTIVS WNI	TGNDP	
<i>C. gloeosporioides</i>	VKAVALRGDSKI	TGTVTFEQADNES	APTIVS WNI	TGNDP	
<i>S. cerevisiae</i>	VKAVALRGDSKI	TGTVTFEQADNES	APTIVS WNI	TGNDP	
<i>Homo sapiens</i>	VKAVALRGDSKI	TGTVTFEQADNES	APTIVS WNI	TGNDP	
<i>Bovine</i>	VKAVALRGDSKI	TGTVTFEQADNES	APTIVS WNI	TGNDP	
<i>O. cuniculus</i>	VKAVALRGDSKI	TGTVTFEQADNES	APTIVS WNI	TGNDP	
<i>H. lutea</i>	41	50	60	70	80
<i>A. fumigatus</i>	AERGMNI	HOEGDNTNGSTS	AGRHNPNR	EKKTNHART	DEVRN
<i>E. nidulans</i>	AERGMNI	HOEGDNTNGSTS	AGRHNPNR	EKKTNHART	DEVRN
<i>C. purpurea</i>	AERGMNI	HOEGDNTNGSTS	AGRHNPNR	EKKTNHART	DEVRN
<i>N. crassa</i>	AERGMNI	HOEGDNTNGSTS	AGRHNPNR	EKKTNHART	DEVRN
<i>C. gloeosporioides</i>	AERGMNI	HOEGDNTNGSTS	AGRHNPNR	EKKTNHART	DEVRN
<i>S. cerevisiae</i>	AERGMNI	HOEGDNTNGSTS	AGRHNPNR	EKKTNHART	DEVRN
<i>Homo sapiens</i>	AERGMNI	HOEGDNTNGSTS	AGRHNPNR	EKKTNHART	DEVRN
<i>Bovine</i>	AERGMNI	HOEGDNTNGSTS	AGRHNPNR	EKKTNHART	DEVRN
<i>O. cuniculus</i>	AERGMNI	HOEGDNTNGSTS	AGRHNPNR	EKKTNHART	DEVRN
<i>H. lutea</i>	81	90	100	110	120
<i>A. fumigatus</i>	VGD LGNI	KTDAE GNAUGS	VQDKLI	KVI GAESIL	GRTIVN
<i>E. nidulans</i>	VGD LGNI	KTDAE GNAUGS	VQDKLI	KVI GAESIL	GRTIVN
<i>C. purpurea</i>	VGD LGNI	KTDAE GNAUGS	VQDKLI	KVI GAESIL	GRTIVN
<i>N. crassa</i>	VGD LGNI	KTDAE GNAUGS	VQDKLI	KVI GAESIL	GRTIVN
<i>C. gloeosporioides</i>	VGD LGNI	KTDAE GNAUGS	VQDKLI	KVI GAESIL	GRTIVN
<i>S. cerevisiae</i>	VGD LGNI	KTDAE GNAUGS	VQDKLI	KVI GAESIL	GRTIVN
<i>Homo sapiens</i>	VGD LGNI	KTDAE GNAUGS	VQDKLI	KVI GAESIL	GRTIVN
<i>Bovine</i>	VGD LGNI	KTDAE GNAUGS	VQDKLI	KVI GAESIL	GRTIVN
<i>O. cuniculus</i>	VGD LGNI	KTDAE GNAUGS	VQDKLI	KVI GAESIL	GRTIVN

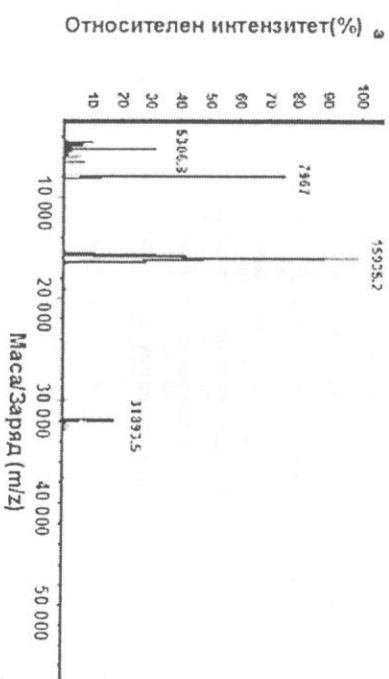
Фиг. 25. Сравнение на аминокиселинни последователности на *Humicola lutea* супероксид дисмутаза (HL-SOD) със секвенциите на други SOD.

Използвайки получената информация за пълната аминокиселинна последователност на ензима, както и известни кристалографски структури на подобни SOD-зи, чрез специални програми беше направен модел на кристалната структура на HL-SOD (Фиг. 26). Този модел дава визуална представа за разположението на различни остатъци, като на Trp32 и други и спомата за изясняване на свойствата на ензима.

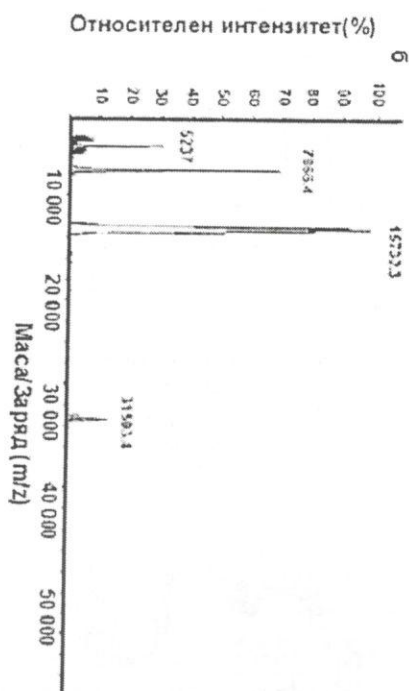


Фиг. 25. Модел на кристална структура на *Humicola lutea* супероксид дисмутаза (HL-SOD). Фигурата е построена с програми MOLSCRIPT и Rasler3D.

Молекулната маса на една субединица на Cu/Zn-SOD беше определен и чрез MALDI-MS анализ. От получения мас-спектр, показан на Фиг. 26, беше измерена молекулна маса 15935.2 Да за една субединица и 31893.5 Да за цялата молекула.



Фиг. 26. а) MALDI-спектър на субединицата на Cu/Zn-SOD. Пробата (10 пикомола) е разтворена в 0.1% (v/v) TFA и нанесена за измерване. Разтвори от яден овалбумин ($M=44400$ Da) и биволюски серен албумин ($M=66430$ Da) са използвани за калибриране.



Фиг. 26 б) MALDI-спектр на субединица на Cu/Zn-SOD след третиране с PNGase-F.

Наблюдаваният най-висок пик при 15935 съответства на масата на една субединица на Cu/Zn-SOD. Изчислена обща молекулярна маса от пълната аминокиселинна последователност е 15716. Това води до разлика от 219 Да между измерената маса и изчислената, което се дължи на наличието на една олигосахаридна странична верига (16+203) и окисления Met44 остатък.

3.8.1. Ефект на NL-SOD върху A/Aichi/2/68 вирус

Известна е защитната функция на SOD при редица заболявания. Ефектът на изолирания ензим NL-SOD беше изследван срещу грипния вирус и сравнен с този на биволска SOD и използваното лекарствено средство рибавирин. Установено беше, че NL-SOD предпазва мишки от смърт след инжектиране с експериментален A/Aichi/2/68 вирус, като удължава времето на живот. Използвайки гликозилираната NL-SOD, степента на оцеляване се повиши с 66% и времето на оцеляване бе удължено с 5 дни, докато негликозилираната биволска NL-SOD показва по-слаб ефект.

4. Заключение

Целта на настоящата дисертация бе да се изследва структурата и свойствата на метал-съдържащите протеини: хемоцианини и супероксид дисмутаза. Два вида протеини съдържат медни йони в активния център и намират приложение при имунотерапията на различни болести. От проведените научни изследвания могат да се направят следните заключения:

1. Охарактеризирана е олигомерната стабилност на хемоцианини от молоските *Rapana venosa* (RvN) и *Helix vulgatis* (HvN), както и техните структурни субединици RvN1 и RvN2 при различни условия. При проследяване на процеса на реасоциация на тези две субединици и на нативната молекула в буфери с различни pH стойности и концентрации на CaCl_2 и MgCl_2 е установено, че те реасоциират в дидекамери и мултидекамери.

RvN1 и RvN2 са биохимично и имунологично различни и проявяват различни свойства на дисоцииране и реасоциране. Реасоциацията, проведена срещу стабилизирал буфер с pH 9.6, в присъствие на 2 mM CaCl_2 и MgCl_2 , в продължение на няколко седмици, води до формирането на декамери, докато в стабилизирал буфер с pH 7.0 се наблюдават предимно дидекамери. Високата концентрация на Ca^{2+} и Mg^{2+} йони способства за по-бързо реасоцииране на RvN1, изразено в дълги стабилни мултидекамери и сферични тръбички. Реасоциацията на структурна субединица RvN2 при същите условия протича бавно, с формиране на дидекамери, къси тръбички и дълги мултидекамери, които са по-нестабилни при повишаване на pH на разтвора.

2. Изолирани са няколко функционални единици на хемоцианин от молоския *Rapana venosa* (RvN), без формирането на протеолитични странични продукти, чрез прилагане на нов метод: деполимеризация в присъствие на Zn^{2+} йони. Чрез новия метод се избягва недостатъкът на разкъсване на полипептидните вериги на различни позиции при третиране с трипсин или други протеолитични ензими. Определени са N-крайните аминокиселинни последователности на тези единици, като е установена много висока степен на структурна хомоложност при сравняване с функционални единици от други гастроподни хемоцианини.

3. Изолирани са две структурни субединици α -Hc и β -Hc с молекулярна маса около 400 kDa от хемоцианина, разтворен в хемолимфата на градинския охлюв *Helix vulgatis*. Установено е, че реасоциацията в стабилизирал буфер с 50 mM CaCl_2 и MgCl_2 , pH 7.0 на двете субединици е непълна и се формират само декамери, дидекамери и мултидекамери.

4. Определени са въглехидратните структури на две функционални единици RvN1-а и RvN1-f от първата структурна субединица на хемоцианин от *Naraja venosa*, както и на хемоцианин от артроподния *Sarsipus aestuarii* чрез прилагане на редица методи и техники: капиларна електрофореза, MALDI- мас-спектрометрия и електроспрей йонизационна мас-спектрометрия, в комбинация с гликозидазно разкъсване.

5. Установено е, че нативната структурна субединица SaeSS2 на хемоцианин от артроподния *Sarsipus aestuarii* се състои от 650 аминокиселини остатъци и е изчислена точната молекулна маса 75036 Да. Първичната структура на SaeSS2 показва висока степен на хомоложност (73%) със субединица 6 на хемоцианин от *Capser madister*, представител на вида *Crustacea*. Идентифицирани са 10 триптофани и 28 тирозинови остатъци в SaeSS2, които са класифицирани в три класа, в зависимост от продължителността на време на хивот. Показан е потискащ ефект на медните йони от активния център върху флуоресцентната емисия на протеина.

6. Изследването на конформационната стабилност на хемоцианин от артроподния *Limulus polyphemus* срещу различни денатуранти (гуанидин хидрохлорид и уреа), чрез кръгов дихроизъм и флуоресцентна спектроскопия, показва, че структурата на нативните дидекамерни агрегати и на изолираните 5 структурни субединици е стабилизирана от хидрофилни и полярни връзки и в двете форми на протеините (апо- и окси-). Денатурирането на изследваните форми на хемоцианина с гуанидин хидрохлорид води до бързи им конформационен преход в разгънато състояние.

7. Изолиран е нов, гликозилиран ензим Cu/Zn супероксид дисмутаза (SOD) от гъбичния шам *Hymenochaete* 103. Определена е аминокиселинната му последователност чрез Еманово разграждане и е съпоставена с тези на други видове Cu/Zn SOD-и. Аминокиселинната последователност на ензима, състояща се от 152 аминокиселинни остатъци, показва висока степен на хомоложност (74–85%) с тези на други видове Cu/Zn SOD-и.

Охарактеризирана е въглехидратната структура на Cu/Zn SOD, като е доказано, че разликата в молекулната маса на *H. lutea* Cu/Zn SOD измерена с MALDI-MS (15,935 Да) и тази изчислена от аминокиселинната последователност (15,716 Да) се дължи на въглехидратната верига от N-ацетилглюкозамин, свързан към гликозилирания център Asp23-Glu-Ser.

8. Установен е защитният ефект на HL-SOD върху мишки, инжектирани с експериментален грипен A/ichi/2/68 вирус. Използвайки гликозилирана HL-SOD,

степенна на оцеляване се повиши с 66% и продължителността на живот бе удължено с 5 дни в сравнение с негликозилираната HL-SOD.

Резултатите от този дисертационен труд допринасят за по-пълното изясняване на структурата, функциите и свойствата на двата мед-съдържащи протеини: хемоцианин и супероксид дисмутаза.

Списък на публикациите отразени в настоящата дисертация

1. Dolashka-Angelova, P., Beltramini, M., Dolashki, A., Salvato, B., Hristova, R., Voelter, W. (2001). Carbohydrate composition of *Carcinus aestuarii* hemocyanin. Arch. Biochem. Biophys. 389, 153-158.
2. Dolashka-Angelova, P., Beck, A., Dolashki, A., Beltramini, M., Stevanovic, S., Salvato, B., Voelter, W. (2003). Characterization of the carbohydrate moieties of the functional unit RvH1-a of *Rapana venosa* haemocyanin using HPLC/electrospray ionization MS and glycosidase digestion. Biochem. J. 374, 185-192.
3. Dolashka-Angelova, P., Schwarz, H., Dolashki, A., Beltramini, M., Salvato, B., Schick, M., Saeed, M., Voelter, W. (2003). Characterization of the reassociation and oligomeric stability of *Rapana venosa* hemocyanin (RvH) and its structural subunits. Biochim. Biophys. Acta 1646, 77-85.
4. Dolashka-Angelova, P., Beck, A., Dolashki, A., Beltramini, M., Stevanovic, S., Salvato, B., Hristova, R., Velkova, L., Voelter, W. (2004). Carbohydrate moieties of molluscan *Rapana venosa* hemocyanin. Micron 35, 101-104.
5. Dolashka-Angelova, P., Stevanovic, S., Dolashki, A., Angelova, M., Serkedjieva, J., Krumova, E., Pashova, S., Zacharieva, S., Voelter, W. (2004). Structural and functional analysis of glycosylated Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103. Biochem. Biophys. Res. Commun. 317, 1006-1016.
6. Dolashka-Angelova, P., Dolashki, A., Stevanovic, S., Hristova, R., Atanasov, B., Nicolov, P., Voelter, W. (2005). Structure and stability of arthropodan hemocyanin *Limulus polyphemus*. Spectrochim. Acta Part A 61, 1207-1217.
7. Dolashka-Angelova, P., Dolashki, A., Savvides, S. N., Hristova, R., Beunten, van J., Voelter, W., Devreese, B., Weser, U., Di Muro, P., Salvato, B., Stevanovic, S. (2005). Structure of hemocyanin subunit CaSS2 of the crustacean Mediterranean crab *Carcinus aestuarii*. J. Biochemistry 138 (3) 303-312.
8. Dolashki, A., Schütz J., Hristova R., Voelter W., Dolashka-Angelova P. (2005) Spectroscopic properties of non-glycosylated functional unit KLH1- c of keyhole limpet hemocyanin. World Journal of Agricultural Sciences 1 (2)129-136.
9. Dolashka-Angelova P., Dolashki A., Stevanovic S., Hristova R., Atanasov B., Nicolov P., Voelter W. (2005). Structure and stability of arthropodan hemocyanin *Limulus polyphemus*. Spectrochim. Acta 61 (6) 1207-1217.
10. Velkova, L., Dolashki, A., Schwarz, H., Stevanovic, S., Hristova, R., Voelter, W. and Dolashka-Angelova, P. Structure and oligomeric stability of hemocyanin isolated from the garden snail *Helix vulgaris*. In preparation