

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**

---

**ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР  
ПО ФИТОХИМИЯ**

**Людмила Георгиева Велкова**

**Структура и функции на въглехидратните вериги  
на хемоцианин, изолиран от морски охлюв**  
*Rapana venosa*

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

на дисертационен труд, представен за присъждане  
на научна и образователна степен „Доктор”

Научна специалност:  
„Биоорганична химия, химия на природните и  
физиологично активни вещества”  
шифър: 01.05.10

Научен ръководител:  
Доц. д-р Павлина Долашка

София, 2013 г.

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Hc ≡ Хц	хемоцианин
RvH	хемоцианин <i>Rapana venosa</i>
KLH	Keyhole limpet хемоцианин
HLH	хемоцианин <i>Helix lucorum</i>
HpH	хемоцианин <i>Helix pomatia</i>
HtH	хемоцианин <i>Haliotis tuberculata</i>
OdH	хемоцианин <i>Octopus dofleini</i>
NpH	хемоцианин <i>Nautilus pompilius</i>
Da ≡ Да	далтон
kDa	килодалтон
AK	аминокиселина
AKPI	аминокиселинна последователност
ФЕ	функционална единица
Man	маноза
Gal	галактоза
GlcNAc	N-ацетил-D-глюкозамин
GalNAc	N-ацетил-D-галактозамин
Fuc	фукоза
Xyl	ксилоза
Hex	хексоза
HexA	хексуронова киселина
HPLC	високоэффективна течна хроматография
LC	течна хроматография
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – лазерно-десорбционна йонизация с помощта на матрица
MS	масспектрометрия
ESI	електроспрей-йонизация
MS/MS	тандем масспектрометрия
TEM	Трансмисионна електронна микроскопия
СБ	стабилизиращ буфер
CD	кръгов дихроизъм
FPLC	бързо разделителна течна хроматография
HPLC	високоэффективна течна хроматография
HSV	Herpes simplex virus - Херпес симплекс вирус
RSV	Respiratory Syncytial Virus - Респираторен синцитиален вирус

## УВОД

През последните години изследванията на гликопротеините предизвикват голям научен интерес, което се дължи на широкото им разпространение в живата природа и различните функции, които те изпълняват във всички организми.

Представители на гликопротеините са кислород–пренасящи протеини “хемоцианини”, които са свободно разтворени в хемолимфата на артроподи и молюски. Те притежават различни аминокиселинни последователности и въглехидратни структури и имат главно О- и N-свързани гликани.

Установено е, че въглехидратното съдържание при хемоцианини от молюски е между 2-9%, като освен специфичният монозахариден състав от Man, Gal, GlcNAc и GalNAc, се наблюдават Fuc, Xyl и О-метил-Gal или 3-О-метил-Man. Наличието на Xyl във въглехидратните структури на хемоцианини от молюски, се свързва с високо-имуногенните им свойства.

Изследванията върху въглехидратната структура на хемоцианин *Megatura crenulata* (KLH) са доказали наличие на два нови вида N-свързани гликани. Предполага се, че клиничният успех на KLH като ефикасно средство за имунотерапия на рак на пикочния мехур се дължи главно на особености във въглехидратната му структура. Освен като терепевтична ваксина в клиничната практика с името *Immunokothel*, KLH се използва и като имуностимулатор и носител на хаптени.

Установено е, че въглехидратните структури играят и друга важна роля, а именно за изграждане на структурата и конформационната стабилност на хемоцианините.

До сега само частично е изследвана въглехидратната структура на хемоцианин от *Rapana venosa* (RvH), като са анализирани някои въглехидратни структури и центрове на свързване на въглехидратните вериги към полипептидната верига. Ето защо, предмет на изследване на настоящия дисертационен труд е чрез прилагане на различни съвременни методи и техники да се анализира пълната въглехидратна структура на хемоцианин от *R. venosa* и да се установят някои нейни функции, свързани с конформационната стабилност и антивирусния ефект.

Изследванията върху антивирусния ефект на хемоцианина от *R. venosa* дават допълнителна информация, относно възможностите за приложението на хемоцианините. Сравнителното изследване на гликозилирана и негликозилирана форма на различните изоформи, изграждащи този протеин хвърлят светлина върху функцията на въглехидратните му структури.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е чрез прилагане на различни методи и техники да се определи въглехидратната структура на хемоцианин, изолиран от морски охлюв *Rapana venosa* (RvH), както и някои нейни функции.

За изпълнение на тази цел са поставени следните задачи:

1. Изолиране и охарактеризиране на двете структурни субединици RvH1 и RvH2, както и изграждащите ги функционални единици.
2. Изолиране и охарактеризиране на гликопептиди от функционалните единици и структурните субединици RvH1 и RvH2. Определяне на центровете на гликозилиране чрез електроспрей-йонизационен масспектрометър (LC/ESI-MS), нано-електроспрей-йонизационна мас-спектрометрия (nano-ESI-MS) и Q-trap-LC/MS/MS система.
3. Изолиране на гликани от структурните субединици RvH1 и RvH2 и определяне на въглехидратните им структури с MALDI-TOF и Q-trap системи.
4. Установяване на някои функции на въглехидратната структура в хемоцианин *R. venosa*, като:
  - 4.1. Влияние върху реасоцииращото поведение на RvH и изоформите му с електронна микроскопия;
  - 4.2. Влияние върху стабилността на нативната молекула, структурните субединици и една ФЕ чрез прилагане на термодинамичния подход и използване на кръгов дихроизъм.
5. Изследване на антивирусните свойства на нативната молекула, структурните субединици и някои функционални единици на хемоцианин от *R. venosa* срещу различни вируси.

## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

### I. Охарактеризиране на въглехидратната структура на хемоцианин от морски охлюв *Rapana venosa*

Повечето гликопротеини съществуват като хетерогенни гликоформи, свързани към един или няколко гликозилатни центрове от «протеинен гръбнак». Наличието на разклонени дву- и три-антенни въглехидратни структури, прави анализите на гликани много по-комплицирани, отколкото на протеини. Ето защо, за разделяне и изследване на структурата на всеки отделен гликан са нужни няколко различни стратегии.

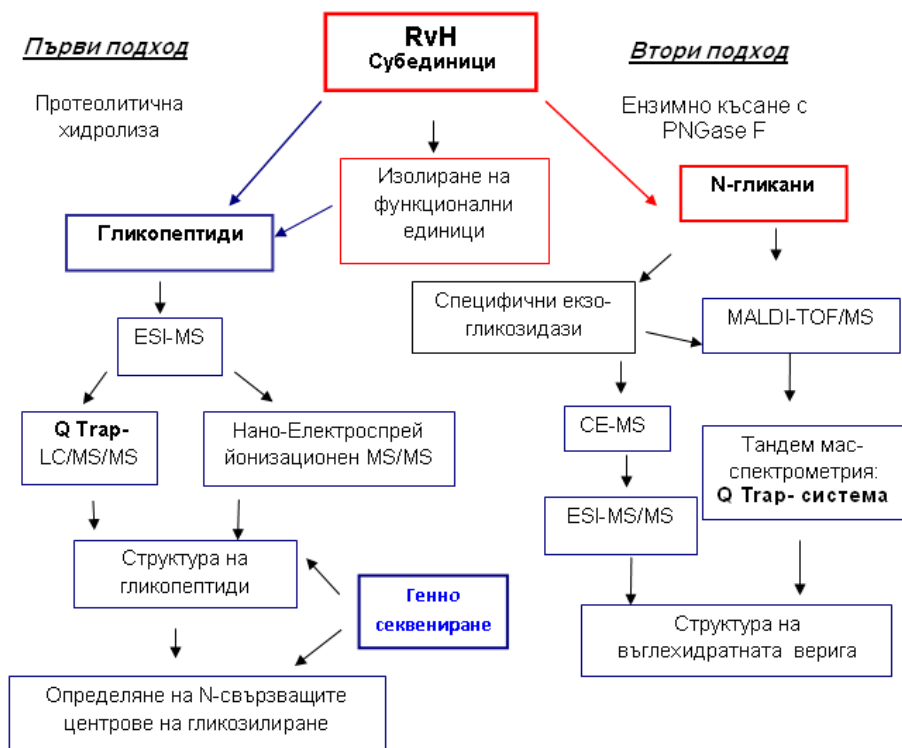
Съществуват големи различия, както във въглехидратното съдържание и монозахаридната композиция на хемоцианините от артроподи и молюски, така и в начина на свързване на гликаните към полипептидните вериги. Хемоцианините от молюски, за разлика от хемоцианините от артроподи, са гликопротеини с високо въглехидратно съдържание между 2-9%, сложни олигозахаридни структури и специфичен монозахариден състав, което играе съществена роля за голямата им антигенна активност. Анализите на въглехидратните структури на редица изследвани хемоцианини от молюски показват, че те се характеризират предимно с *N*-свързани гликани и повечето от потенциалните центрове от полипептидните им вериги са гликозилирани. Определяне центровете на гликозилиране на протеините, както и идентифициране на свързаните към тях олигозахаридни вериги е от голямо значение, но съществуват редица проблеми, като:

1. Определянето на потенциалните центрове на гликозилиране в хемоцианините е възможно само, ако е известна първичната структура на протеина. Тъй като първичната структура на RvH все още не е определена, за идентифициране на центровете на гликозилиране, бяха използвани различни методи и техники като Едманово разграждане, анализиране на пептиди след дегликозилиране или афинитетна хроматография, MS/MS анализи на гликопептиди.

2. В маспектрите на гликопептиди от хемоцианини от молюски, получените въглехидратни фрагменти често доминират над пептидните, което се дължи на по-голямата лабилност на връзките между монозахаридните остатъци и това затруднява интерпретирането на спектрите.

3. Друг проблем при изучаване на въглехидратната структура на хемоцианин от *R. venosa* бе наличието на голямо разнообразие от разклонени дву- и три- антенни гликанови вериги от високо манозен и комплексен тип.

Ето защо за определяне на въглехидратната структура на хемоцианин от *R. venosa*, бе разработена стратегия, включваща използването на два основни подхода (Фиг.1).



**Фиг. 1.** Методика, използвана за охарактеризиране на въглехидратната структура на RvH.

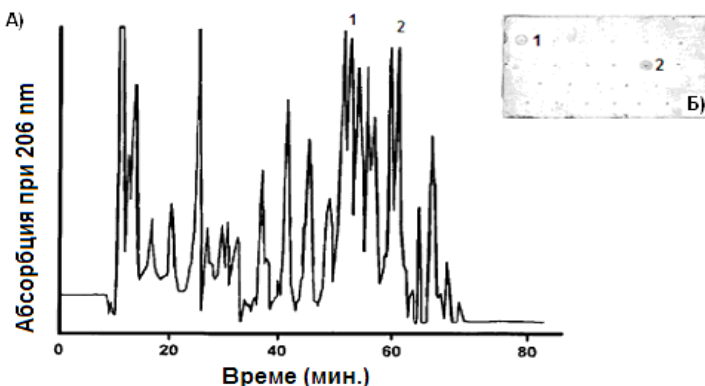
### **I.1. Първи подход за анализиране на въглехидратната структура на хемоцианин от *R. venosa***

Първият подход от стратегията за анализиране на въглехидратната структура, включва охарактеризиране на гликопептиди, изолирани от функционалните единици и структурните субединици RvH1 и RvH2 след ензимна хидролиза с трипсин и анализирането им с LC/ESI-MS, Q-Trap-LC/MS/MS или Електроспрей-йонизационна маспектрометрия. Този подход, дава възможност да се опрдят центровете на гликозилиране в пептидната верига и въглехидратната структура.

### I.1.1. Определяне на центровете на гликозилиране и олигозахаридните структури на гликопептиди, изолирани от функционални единици

Информация за центровете на гликозилиране и олигозахаридните структури беше получена след изледване на гликопептиди, изолирани от функционалните единици RvH1-a и RvH1-f.

За тази цел ФЕ-ци RvH1-a и RvH1-f, бяха подложени на протеолитична хидролиза с трипсин. Получените фрагменти бяха разделени чрез гел-филтрация на колона Superdex 300. Пептидите показали положителен резултат на теста с орцинол/ $H_2SO_4$ , бяха разделени чрез обратнофазова хроматография, на колона RP-Nucleosil C18 на HPLC-система (Фиг. 2А). С цел идентифициране на гликопептидите, всяка фракция беше тествана с орцинол/ $H_2SO_4$  (Фиг. 2Б). Две фракции от RvH1-a (Фиг. 2Б) и една от RvH1-f, бяха потвърдени като гликопептиди и бяха анализирани чрез Едманово деградиране, с цел определяне на аминокиселинната им последователност и потенциалните центровете на гликозилиране.



**Фиг. 2.** А) Разделяне на фракциите, получени след хидролиза с трипсин на функционалната единица RvH1-a, чрез HPLC с колона Nucleosil RP 18 (C18, 100x2.1 mm), елуирана с линеен градиент от разтвор А (0.1% TFA в вода) и разтвор Б (0.085% TFA в ацетонитрил); Б) Орцинол/ $H_2SO_4$  тест за определяне на гликопептиди, на плочка силикагел. Фракциите 1 и 2, изолирани от RvH1-a, показали положителна реакция, бяха определени като гликопептиди.

След отстраняване на въглехидратните вериги с помощта на PNGase-F, двата гликопептиди бяха подложени на Едманово деградиране, при което бяха получени следните аминокиселинни последователности:

**Glp1: FANATSIDGPNA**

**Glp2: EMLTLNGTNL**

Определените, потенциални N-свързващи центрове на гликозилиране във ФЕ RvH1-a, с типичната последователност (N-X-T), са строго консервирани за хемоцианини от моллюски.

Комбинирайки различни методи като MALDI-MS, CE, ESI-MS и хидролиза със специфични гликозидази беше определена и въглехидратната структура на ФЕ-ци RvH1-a и RvH1-f.

Гликопептидите изолирани от RvH1-a и RvH1-f, бяха анализирани с лазер десорбционен масспектрометър (MALDI-MS) преди и след третиране с PNGase-F (Табл. 1), с цел определяне на масите на всеки един от изследваните гликопептиди, както и масите на въглехидратните и пептидните вериги. В MALDI-MS спектъра на Гликопептид 1 (Glp1), получен преди ензимната хидролиза с PNGase-F бе наблюдаван само един молекулен йон при  $m/z$  2786, съответстващ на масата на целия гликопептид плюс един натриев йон  $[Glp1+Na]^+$ . Обаче, след третиране с PNGase-F, в MALDI-MS спектъра бяха наблюдавани три сигнала: сигналът при  $m/z$  2786 - съответства на целия гликопептид Glp1, вторият сигнал при  $m/z$  1609 - отговаря на масата на гликана  $[M+Na]^+$ , а третият сигнал при  $m/z$  1177 съответства на пептида получен след дегликозилиране, което бе потвърдено и от масата на пептида, изчислена от аминокиселинната му последователност. Получените резултати са представени в Таблица 1.

**Таблица 1.** Представени са масите на гликопептидите изолирани от ФЕ-ци RvH1-a и RvH1-f на хемоцианин от *R. venosa*, измерени с MALDI-MS преди и след третиране със специфичната гликозидаза PNGase-F.

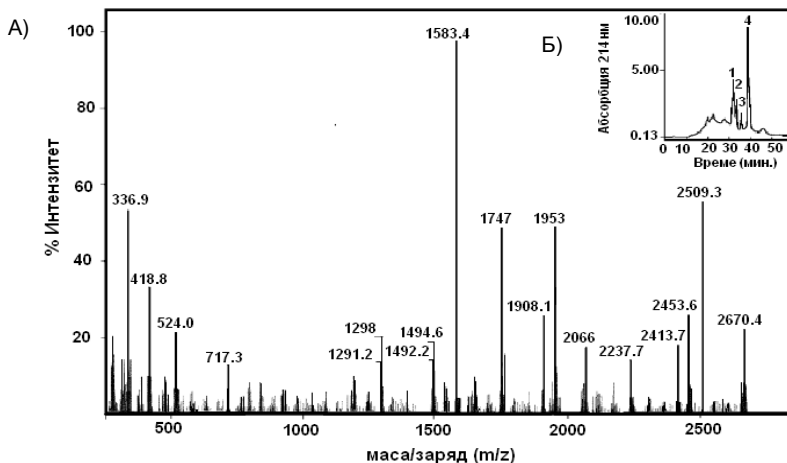
Фракции	Аминокиселинна последователност	Гликопептид Mw (Da)	Пептид Mw (Da)	Олигозахарид Mw (Da)
Glp 1 <i>RvH1-a</i>	FANATSIDGPNA	2786 $[2763 + Na]^+$	1177.0 <sup>b</sup> 1177.5 <sup>c</sup>	1609 $[1586 + Na]^+$
Glp 2 <i>RvH1-a</i>	EMLTLNGTNLA	2846.2 $[2828 + H]^+$	1175.7 <sup>a</sup> 1175.6 <sup>c</sup>	1653 $[1652 + H]^+$
Glp 3 <i>RvH1-f</i>	HSYSGSYINASLLHGPSII	3848 $[3847 + H]^+$	2940 <sup>a</sup>	907 $[906 + H]^+$

а) Молекулна маса, измерена с MALDI-MS.

б) Молекулна маса, изчислена от АКП, получена чрез Едманово деградиране.

За определяне на въглехидратната структура на гликопептид Glp1, (изолиран от RvH1-a), бяха използвани различни специфични екзогликозидази, като  $\beta$ 1-2,3,4,6-GlcNAc-зидаза,  $\alpha$ 1-2,3-манозидаза,  $\alpha$ 1-2,3,6-манозидаза,  $\beta$ 1-3,4,6-галактозидаза с цел идентифициране начина на свързване на монозахаридите във въглехидратната верига. Получените фракции бяха анализирани чрез капилярна електрофореза и йонизационен масспектрометър (ESI-MS) (Фиг.3).






**Фиг. 3. А)** ESI-MS след ензимна хидролиза на гликопептид *Glp1* със специфични гликозидази:  $\beta$ 1-2,3,4,6-GlcNA-аза,  $\alpha$ 1-2,3,6-манозидаза и  $\alpha$ 1-2,3-манозидаза; **Б)** (малката диаграма): Капилярна електрофорограма на *Glp1* след третиране с различни гликозидази. Условия: *Glp1* беше разтворен в 50  $\mu$ л буфер фосфатен буфер, рН 2.5.

Капилярната електрофорограма показва няколко различни фракции (съответстващи на 4 пика), които бяха получени в резултат на ензимната хидролиза на въглехидратната верига на *Glp1* при 37°C, за 24 часа. След последователното им анализиране чрез ESI-MS и интерпретиране на получените данни, бе определена въглехидратната структурата на този гликан (Табл. 2).

**Таблица 2.** Анализ на структура на въглехидратната верига, определена на базата на наблюдаваните фрагментни йони  $[M+H]^+$  в ESI-MS. Гликанът е свързан към пептид с АК последователност FANATSIDGPNA (1177 Da).

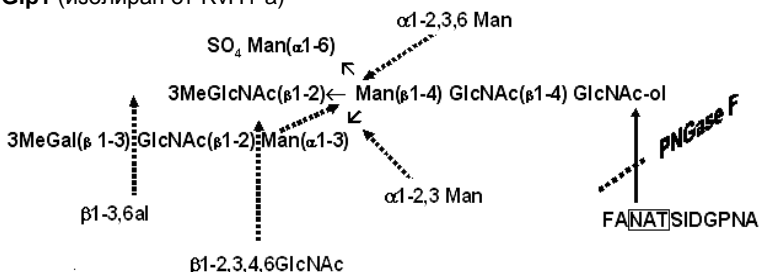
№	Използвани ензими	$[M+H]^+$ (m/z)	Структура на гликопептид 1
А	$\alpha$ 1-2,3- и $\alpha$ 1-2,3-6-манозидаза и $\beta$ 1-2,3,4,6-N-GlcNAc-аза	1747	$\leftarrow$ Man( $\beta$ 1-4) GlcNAc( $\beta$ 1-4) GlcNAc -P
Б	$\alpha$ 1-2,3- манозидаза и $\beta$ 1-2,3,4,6-N-GlcNAc-аза	1908	Man( $\alpha$ 1-6)  Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc -P
В	$\alpha$ 1-2,3-6-манозидаза и $\alpha$ 1-2,3- манозидаза	1953	3MeGlcNAc( $\beta$ 1-2) $\leftarrow$ Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc-P
Г	$\beta$ 1-2,3,4,6-N-GlcNAc-аза	1583	$\leftarrow$ GlcNAc( $\beta$ 1-4) GlcNAc -P

Сигналят получен при m/z 1747.0, отговаря на фрагмент А (Табл. 2), съдържащ пептид с АК последователност FANATSIDGPNA (1177.5

Da), свързан с два GlcNAc- и един ( $\alpha$ 1-4) Man- остатъци (568 Da). Този фрагмент бе получен в резултат на действието на специфичните  $\alpha$ 1-2,3-манозидази и  $\beta$ 1-2,3,4,6-GlcNAc-аза, които отстраняват въглехидратните остатъци ( $\alpha$ 1-6)Man и ( $\alpha$ 1-3)Man, свързани към ( $\beta$ 1-4)Man от пентазахаридната сърцевина (Фиг. 4). Сигналят при  $m/z$  1908.1 съответства на фрагмент Б (Табл. 2), който включва: пептида свързан с два GlcNAc-, един ( $\beta$ 1-4)Man- и един ( $\alpha$ 1-6)Man- остатък (730 Da). Този фрагмент бе получен след прилагането на специфичните  $\alpha$ 1-2,3-манозидаза, отделяща само ( $\alpha$ 1-3)Man и  $\beta$ 1-2,3,4,6-GlcNAc-аза, отстраняваща 3MeGal-GlcNAc( $\beta$ 1-2) от ( $\alpha$ 1-3)Man (Фиг. 4). Наблюдаваната разлика от 865 Da в сравнение с масата на целия гликопептид подсказва, че последователно са били отстранени монозахаридните остатъци: MeGal, GlcNAc, Man, и MeGlcNAc. Пикът при  $m/z$  1953 (Табл. 2, № B) съответства на пептида свързан с два GlcNAc-, един Man( $\beta$ 1-4)- и един 3MeGlcNAc( $\beta$ 1-2)- остатъци. Този фрагмент (№ B) бе получен в резултат на активността на  $\alpha$ 1-2,3,6- и  $\alpha$ 1-2,3-манозидазите, които отстраняват въглехидратните остатъци ( $\alpha$ 1-6)Man и ( $\alpha$ 1-3)Man свързани към ( $\beta$ 1-4)Man (Фиг. 4).

В резултат на проведения анализ бе определена следната въглехидратната структура за гликопептид Glp1 (Фиг. 4):

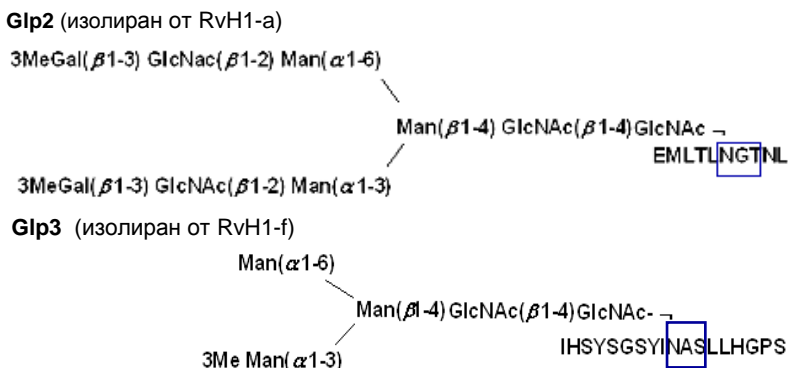
**Glp1** (изолиран от RvH1-a)



**Фиг. 4.** Олигозахаридна структура на Glp1.

Същият метод (капилярна електрофореза в комбинация с MALDI-MS, ESI-MS и Q-Trap-MS/MS) бе приложен за изследване на въглехидратната структура и на другите гликопептиди, изолирани от функционалните единици RvH1-a (Glp2) и RvH1-f (Glp3) (Фиг. 5).

Посредством прилагане на комбинация от различни аналитични техники бяха анализирани гликопептидите от ФЕ-ци RvH1-a и RvH1-f на хемоцианин *R. venosa* и бяха определени олигозахаридните им структури, АК последователности и центровете на гликозилиране.



**Фиг. 5.** Олигозахаридна структура на гликопептиди *Glp2* и *Glp3*.

Въз основа на получените резултати за ФЕ RvH1-a бе установено, че тя притежава два N-свързващи центъра на гликозилиране при Asn 262 и Asn 401. Получените резултати потвърдиха наличието на O-метирирани хексози във въглехидратните структури, каквито са определени и за някои други хемоцианини от моллюски.

Приложената методика е високо информативна, но има няколко съществени недостатъци, а именно изисква голямо количество гликопротеин, отнема много време и е твърде скъпа. Поради това, за понататъшните анализи бяха използвани други по-съвременни методи и техники.

## **I.1.2. Охарактеризиране на гликопептиди, изолирани от структурните субединици**

Гликопептидите бяха получени от структурните субединици RvH1 и RvH2 след протеолитична хидролиза с трипсин в продължение на една нощ (в съотношение: трипсин/хемоцианин 1:50). Получените фракции бяха изолирани чрез обратnofазова хроматография на колона Nucleosil 7 C18 на HPLC–система и тествани с орцинол/сярна киселина за определяне на фракциите, съдържащи гликопептиди.

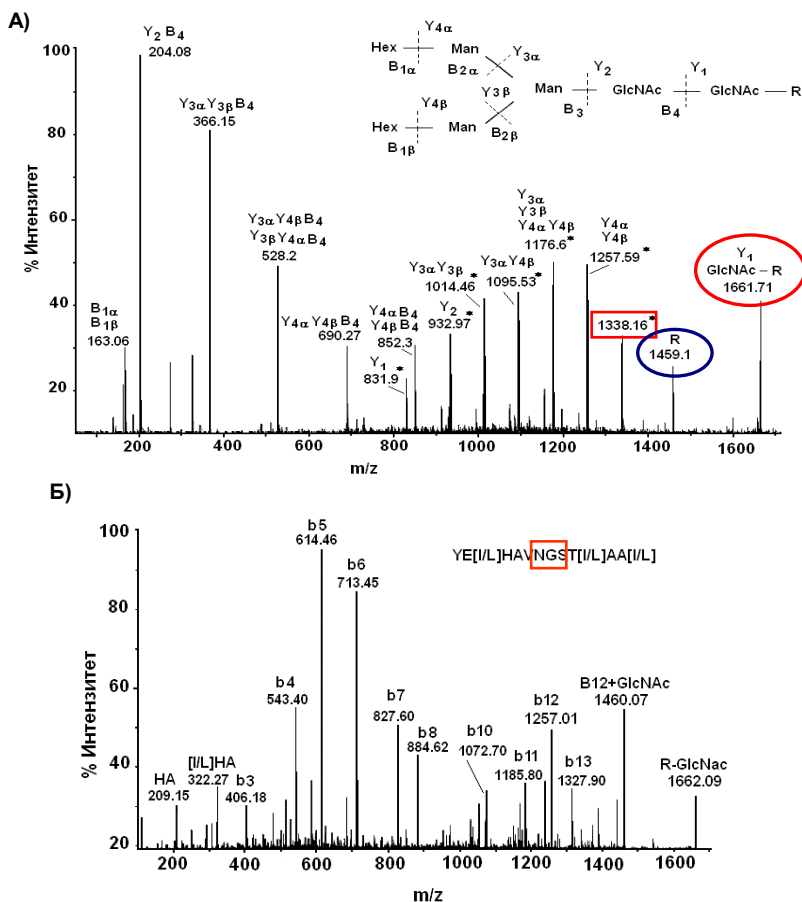
### **I.1.2.1 Охарактеризиране на гликопептиди чрез ESI-MS/MS-анализи**

Няколко гликопептиди изолирани на HPLC след трипсинолиза на RvH1 и RvH2, бяха анализирани чрез нано-поточен електроспрей-йонизационен масспектрометър (ESI-MS), с цел идентифициране на мястото на свързване на гликана към пептидната верига.

Олигозахаридните структури на гликопептидите бяха анализирани чрез интерпретиране на различно заредени йони  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^{2+}$ ,  $[M+3H]^{3+}$  от MS/MS спектрите. В MS/MS спектъра бяха наблюдавани

поредици от два типа Y и B заредени йони, в зависимост от посоката на фрагментиране на въглехидратната верига или комбинация от тях.

От MS/MS спектъра (Фиг. 6А), беше определена масата на изолираният на HPLC-система гликопептид - 2676.32 Da, представен като двойно зареден молекулен йон при  $m/z$  1338.16  $[M+2H]^{2+}$ . Полученият фрагментен йон при  $m/z$  1661.71, съответства на пептида (обозначен с R-,  $m/z$  1459.1), свързан с един GlcNAc остатък, което дава възможност точно да се определи мястото на свързване на въглехидратната верига към пептидната.



**Фиг. 6.** Фрагментиране на гликопептид, определен като  $[M+2H]^{2+}$  при  $m/z$  1338.16. А) Нано-Електроспрей йонизационен MS/MS анализ на въглехидратния остатък, посредством енергия на сблъсъка 37 eV. Показана е пълната въглехидратна

структура. **Б)** Псевдо-MS/MS/MS експеримент на пептидия остатък, свързан с един HexNAc ( $m/z$  1662.09,  $[M+H]^+$ ), при волтаж 95 V и енергия на сблъсък от 80 eV. Зареденият йон при  $m/z$  1661.71, съответства на N-гликозилирания пептид, свързан с един GlcNAc остатък при Asn.

В MS/MS спектъра на Фиг. 6А се наблюдават характерните за фрагментиране на гликани единично заредени йони с висок интензитет при  $m/z$  204.08 (HexNAc) и 366.15 (HexHexNAc), които са последвани от други единично заредени йони  $[M+H]^+$  при  $m/z$  528.2 (Hex<sub>2</sub>HexNAc), 690.27 (Hex<sub>3</sub>HexNAc), 852.3 (Hex<sub>4</sub>HexNAc) и 1014.46 (Hex<sub>5</sub>HexNAc). Поредицата от двойно заредените йони  $[M+2H]^{2+}$  при  $m/z$  1257.59 ( $Y_{4\alpha}/Y_{4\beta}$ ),  $m/z$  1176.6 ( $Y_{4\alpha}Y_{4\beta}/Y_{3\alpha}/Y_{3\beta}$ ) и при  $m/z$  1095.53 ( $Y_{3\alpha}Y_{4\beta}$ ), отразява последователното фрагментиране само на крайно свързаните монозахаридни остатъци на олигозахаридната верига, която остава свързана с пептидната по време на експеримента (Фиг. 6А). От интерпретацията на посочените йони бе определена въглехидратна структура от класически високоманозен тип, състояща се от два N-ацетилхексоаминови монозахаридни остатъка (HexNAc) и пет хексозни остатъци (Hex).

Прилагането на този метод дава възможност за фрагментиране както на олигозахаридната, така и на пептидната верига. При повишаване на напрежението в йонизиращия източник на фрагментация от 60V до 100V (псевдо-MS<sup>3</sup> експеримент) въглехидратната верига може да бъде отделена от пептидната. Така освободеният пептид, който остава свързан само с един HexNAc монозахариден остатък, може да бъде фрагментиран в хексаполната клетка на сблъсък.

От MS/MS спектърът на Фиг. 6А бе определено, че на фрагментният йон (R-GlcNAc) при  $m/z$  1661.71, съответства на пептида R- при  $m/z$  1459.1, гликозилиран с един GlcNAc остатък. Точно този йон бе подложен на следващо фрагментиране след повишаване на напрежението в източника на йонизация и енергията на сблъсък.

След проследяване на стойностите на b-йоните в масспектъра (Фиг. 6Б) бе определена АК-та последователност на пептидната верига YEXHAVNGSTXAAX и бе установен един N-свърващ център на гликозилиране (-NGS-). Определеният център на гликозилиране е част от типичния мотив за N-гликани с аминокиселинна последователност N-aa-S/T, където -aa- може да бъде всяка аминокиселина, освен пролин. В предложената АК последователност, остатъка X би могъл да бъде левцин или изолевцин, тъй като двата АК остатъка трудно могат да бъдат различени чрез приложения MS метод. По същия начин бяха охарактеризирани още пет гликопептида, изолирани от хемоцианин RvH (представени в Табл. 3, пептиди № 1-6).

**Таблица 3.** Охарактеризиране на гликопептиди, изолирани от RvH чрез прилагане на Първия подход от разработената методика и използване на различни техники, като ESI-MS, Q- Трап-LC/MS/MS, капилярна електрофореза. Подреждането на АК остатъци оградени от скоби не може да се установи със точност. Неизвестният АК остатък е отбелязан с X.

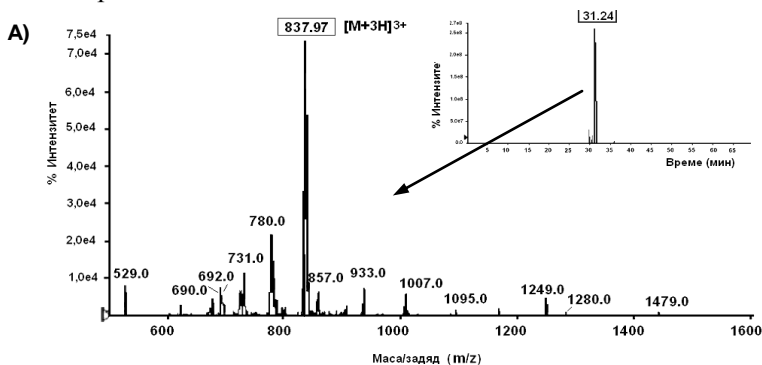
	Гликопептиди	Гликани	Йони (m/z)
	<b>ESI-MS</b>		
1	[QK]AENLTTR	FucMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1036 [M+2H] <sup>2+</sup>
2	AENLTTR	Fuc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	972 [M+2H] <sup>2+</sup>
3	HHGHV[...K...N...]R	Fuc Man <sub>6</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1396 [M+2H] <sup>2+</sup>
4	<b>FSWVDGH/TSR</b>	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1099 [M+2H] <sup>2+</sup>
5	YE[IL]HAVNGST[IL]AA[IL]	Hex <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1339 [M+2H] <sup>2+</sup>
6	YE[IL]HAVNGST[IL]AA[IL]	Hex <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1419 [M+2H] <sup>2+</sup>
	<b>Q Трап-LC/MS/MS</b>		
7	MGQYGDLSTNTR	Hex Man <sub>3</sub> HexNAc <sub>2</sub>	837.97[M+2H] <sup>3+</sup>
8	SVNGTLLGSQILGPY SVNGTLLGSQILGK	Fuc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	896 [M+3H] <sup>3+</sup>
9	<b>FSWVDGH/TSR</b>	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1099 [M+2H] <sup>2+</sup>
10	AENITTR	Fuc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	972 [M+2H] <sup>2+</sup>
11	FANATSIDGPNA	SO <sub>4</sub> MeHexAMeHexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2786 [M+H] <sup>+</sup>
12	EMLTLNGTNLA	MeHex <sub>2</sub> AHexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2846 [M+H] <sup>+</sup>
13	IHSYSGSYINASLLHGSPSII	MeManMan <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2848 [M+H] <sup>+</sup>
	<b>CE-MS/MS</b>		
14	XVYSVNGTLLGAHVLGSR	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> HexA HexNAc <sub>2</sub> Fuc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	941 [M+3H] <sup>3+</sup> 1233 [M+3H] <sup>3+</sup>
15	X—XFSWVDGH/TSR	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> GlcNAcMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1100 [M+3H] <sup>3+</sup> 1168 [M+3H] <sup>3+</sup>
16	FQNDTSLDGYQAVAEFHGLPAK	FucMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1149[M+3H] <sup>3+</sup>
17	FQNDTSLDGFQAVAEFHGLPPK	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> FucMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1104[M+3H] <sup>3+</sup> 1153[M+3H] <sup>3+</sup>
18	LHSYSGSYLNASLLHX—X	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> GlcNAcMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	959[M+4H] <sup>4+</sup> 1010[M+4H] <sup>4+</sup>
19	XNGTELSR XVASELSR	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub> Hex <sub>5</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	968 [M+2H] <sup>2+</sup> 1373 [M+2H] <sup>2+</sup>

### 1.1.2.2. Охарактеризиране на гликопептиди чрез Q-Trap LC/MS/MS

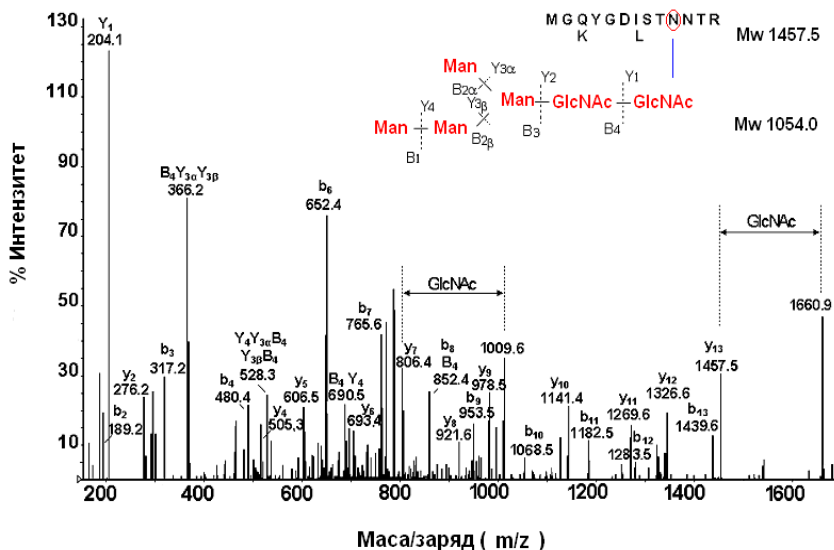
Най-точна характеристика при изследването на гликопептиди се получава чрез прилагането на комбинация на високо ефективната течна хроматография с tandem маспектрометрия и електроспрей йонизация (HPLC-ESI-MS/MS). Tandem-маспектрометрията е съвременен метод, с който се определят както центровете на гликозилиране, така също и свързаните към тях въглехидратни вериги. Комбинацията на две системи: течен хроматограф с маспектрометър (LC/MS) и/или Q-Trap системата, с наноспрей-йонизационен източник, дава възможност за тройно квадруполно сканиране. Сканирането на изследвания гликопептид се извършва в MS- и MS/MS-режим, при повишена резолюция и в маса-обхват до  $m/z$  1700. Използването на този метод дава възможност да се идентифицират гликопептиди, присъстващи в много ниски концентрации в изследваната проба. Гликопептидите могат да бъдат анализирани селективно в протеолитичната смес, чрез извършване на предварително йонно сканиране за наличие на маркерни йони  $m/z$  163 ( $[\text{Hex}+\text{H}]^+$ ),  $m/z$  204 ( $[\text{HexNAc}+\text{H}]^+$ ) или  $m/z$  366 ( $[\text{Hex-HexNAc}+\text{H}]^+$ ), произлизащи от фрагментирането на олигозахаридните вериги.

Този метод бе приложен за изследване на изолираните фракции на HPLC-система от структурните субединици RvH1 и RvH2, след ензимна хидролиза с трипсин, които бяха идентифицирани като гликопептиди съгласно проведения тест с орцинол/сярна киселина. На Фиг. 7A) е представен LC/MS/MS анализа на елуираната фракция на 31.24 мин. от хроматограмата (представена като допълнителната фигура към Фиг. 7A).

Предварителното йонно сканиране на тази фракция при  $m/z$  204  $[\text{HexNAc}+\text{H}]^+$  и при  $m/z$  366  $[\text{Hex-HexNAc}+\text{H}]^+$ , дава възможност селективно да бъде анализиран само чистия гликопептид. От MS-спектъра бе установен само един доминиращ тройно зареден йон  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$  при  $m/z$  837.97 (Фиг. 7A), от който бе определена маса от 2493.6 Да за сканирания гликопептид.



Б)



**Фиг. 7. А)** Прекурсорно йонно сканиране на фракцията, елуирана при 31.24 мин. от хроматографското разделяне (вмъкнатата малка фигура) и **Б)** MS/MS спектър на тойно зареден йон  $[M+3H]^{3+}$  при  $m/z$  837.97, сканиран (EPI) при повишена резолюция.

Въглехидратната структура на гликопептида, бе определена (от MS/MS спектър на Фиг. 7Б) чрез проследяване на типичните йони, получени от фрагментирането на въглехидратната верига (представени като Y и B йони, съответстващи на номенклатурата на Domon/Costello) при  $m/z$  204.1 (GlcNAc),  $m/z$  366.2 (HexGlcNAc),  $m/z$  528.3 (Hex<sub>2</sub>GlcNAc), 690.5 (Hex<sub>3</sub>GlcNAc), и 852.4 (Hex<sub>4</sub>GlcNAc). Така бе идентифицирана въглехидратна структура от високоманозен тип (Hex<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), изградена от 5 Hex и 2 GlcNAc с маса 1054.0 Da.

След проследяване на у- и б-йоните в MS/MS-спектър на тройно заредения йон  $[M+3H]^{3+}$  при  $m/z$  837.97, бе определена АК последователност на пептида - MGQYGD(I/L)STNNTTR (Фиг. 7Б). Йонът у<sub>7</sub> при  $m/z$  806.4 съответства на пептидният фрагмент -(I/L)STNNTTR- от С-края на пептидната верига. Наблюдаваният интензивен йон при  $m/z$  1009.6 представлява същият този фрагмент, но свързан с един монозахариден GlcNAc остатък. От друга страна йонът при  $m/z$  1660.9 съответства на пептидия йон у<sub>13</sub> ( $m/z$  1457.5), гликозилиран с един GlcNAc остатък. Това доказва, че определеният свързващ център -NNT- е действително гликозилиран с олигозахаридната верига, чиято структура бе определена по-горе.



След интерпретирането на получените резултати от LC/MS/MS анализа, бе определена структурата на гликана ( $\text{Hex}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ) с маса 1054.0 Da и центъра на гликозилиране, включен АК последователност MGQYGD(I/L)STNNTR.

По този начин бяха анализирани още 6 гликопептиди (Таблица 3, № 7-13), като бяха определени както въглехидратните им структури, така и N-свързващите центрове в пептидната верига.

#### **I.1.4. Използване на генната секвенция за определяне на потенциалните центрове на гликозилиране и построяване на 3-D модел**

Определянето на потенциалните центрове на гликозилиране може да се постигне лесно, ако се знае първината структура на гликопротеина. Но установяването на действително гликозолираните центрове е възможно след маспектрометричен анализ на гликопептиди, изолирани от изследвания гликопротеин.

При секвениране на два фрагмента от генома на морския охлюв *R. venosa* бе установена частично първичната структура на две функционални единици „b” и „c” (RvH-b и RvH-c).

В частично определената първична структура на RvH-b не бе идентифициран N-гликозилиран център. Това бе потвърдено и от негативния резултат, получен от теста с орцинол/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

В определеният от генната секвенция фрагмент на ФЕ RvH-c бе установен един потенциален N-свързващ център (-NTS-) на 143 позиция. Полученият положителен резултат от теста с орцинол/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  за ФЕ RvH-c бе потвърждение, че определеният център е действително гликозилиран.

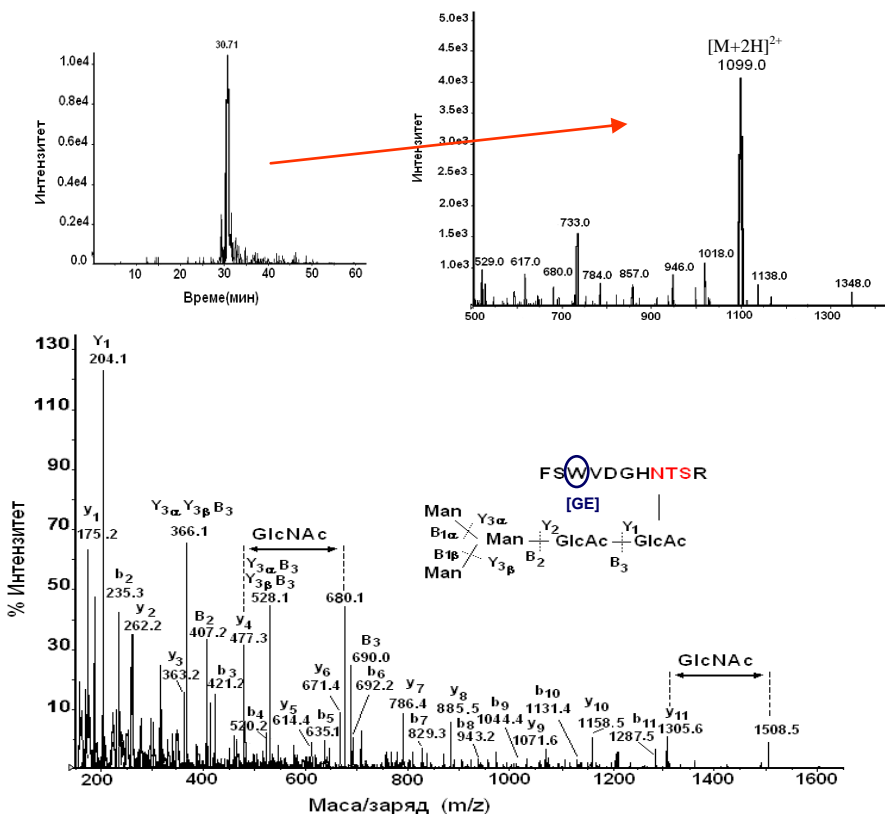
Установено бе, че определеният от първичната структура на RvH-c център -NTS- съответства на N-свързващия център в гликопептидите представени на Табл. 3, № 4, 9 и 15.

На Фиг. 8 са показани резултатите получени от Q-Trap-LC/MS/MS анализа на гликопептид, представен като  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  йон при  $m/z$  1099.0 (Табл. 3, № 9).

Въглехидратната структура на гликопептида бе определена, чрез проследяване на типичните Y и B йони:  $\text{Y}_1$  при  $m/z$  204.1 (GlcNAc),  $\text{Y}_{3\alpha}\text{Y}_{3\beta}\text{B}_3$  при  $m/z$  366.1 ( $\text{HexGlcNAc}$ ),  $\text{Y}_{3\alpha}\text{B}_3/\text{Y}_{3\beta}\text{B}_3$  при  $m/z$  528.1 ( $\text{Hex}_2\text{GlcNAc}$ ) и  $\text{B}_3$  при  $m/z$  690.0 ( $\text{Hex}_3\text{GlcNAc}$ ). Така бе идентифицирана въглехидратна структура от високоманозен тип -  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ .

Наблюдаваният йон  $\text{y}_4$  при  $m/z$  447.3 съответства на тетрапептидният фрагмент -NTSR от C-края на пептидната верига, а интензивният йон наблюдаван при  $m/z$  680.1 представлява същия пептиден фрагмент, но свързан с един монозахариден GlcNAc остатък.

Освен това бе установено, че и йонът при  $m/z$  1508.5, съответства на йона  $y_{11}$  (целия пептид), свързан с един GlcNAc остатък. От интерпретацията посочените йони, недвусмислено бе установено мястото на свързване на гликановата верига. Тези данни потвърждават, че определеният от генната секвенция на RvH-с един N-свързващ център действително е гликозилиран с олигозахаридна верига -  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ .



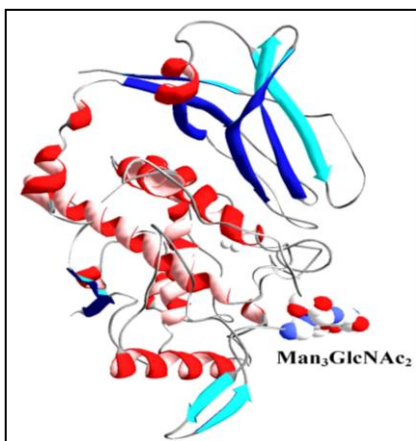
**Фиг. 8.** Прекурсорно йонно сканиране с тандем маспектрометрия на гликопептид, елуиран при 30,71 мин., изразен като двойно зареден йон  $[M+H]^{2+}$  при  $m/z$  1099.0 Сканиране (EPI) при повишена резолюция в MS/MS-режим на двойно заредения йон.

Установено бе, че йонът  $y_{11}$  при  $m/z$  1305.6 съответства на пептида, включващ 11 АК остатъка. Но при сравняването на получената АКП от Q-Trap-LC/MS/MS анализа (Фиг. 8) с резултата от генната секвенция, бе забелязана разлика в една позиция, при която триптофановият остатък (-W) е заместен от дипептиден остатък, съдържащ глицин-глутамат (-GE-). Този резултат може да бъде обяснен с един недостатък на

масспектроничното фрагментиране около глициновия остатък, при който често като резултат се получават много малки пикове с нисък интензитет, а също така и с това, че дипептидът глицин-глутамин е изобарен на единичен триптофанов остатък.

Следователно, можем да обобщим, че съчетавайки данните от генната секвенция и Q-Trap-LC/MS/MS анализа бяха определени: точната аминокиселинна последователност за този гликопептид FSGEVDGHNTSR, олигозахаридната верига ( $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ) и N-свързващия център –NTS- на 143 позиция във ФЕ RvH-с.

Въз основа на установената голяма хомоложност между RvH-с и ФЕ OdH-g, изолирана от хемоцианин от *O. dofleini* и след използването на Swiss PDB-viewer, бе построен 3- дименсионален модел (3-D модел), който е представен на Фиг. 9.



**Фиг. 9.** 3-D модел на функционална единица RvH-с, изчислен на базата на голямата хомоложност в структурата на OdH-g от *Ostropus dofleini* и създаден посредством използване на Swiss PDB-viewer. Гликанът  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (представен като сфери) е свързан към консервиран N-гликозилатен център, N-aa-S/T на 143 позиция.

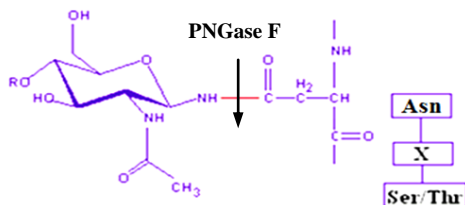
Полученият 3-D модел на RvH-с (Фиг. 9) бе изчислен в съответствие с известната кристална структура на OdH-g и показва, че най-вероятното разположение на въглехидратната верига е на повърхността на функционалната единица. Това заключение съответства на известните резултати за място на олигозахаридните вериги на ФЕ от хемоцианини от молюски, като RvH-e, OdH-g и др., при които въглехидратните вериги също са изложени по подобен начин на повърхността на молекулата. Дали това предсказано положение на въглехидратната верига е необходимо за установяване и поддържане на контакт с другите функционални единици от структурната субединица, остава да бъде определено в по-нататъшни експерименти. Но е сигурно, че то оказва влияние върху общата стабилност на олигомерния хемоцианин.

Използването на първия подход от разработената методика за анализиране на въглехидратната структура на хемоцианин от *R. venosa* има някои недостатъци. Така например получените гликопептиди при трипсинолиза на гликопротеина, са особено трудни за идентифициране, тъй като присъстват в протеолитичната смес в малки количества (обикновено 0,2% до 5%), в сравнение с негликозилираните пептиди. Освен това интерпретирането на сложни олигозахаридни структури от комплексен тип е затруднено от фрагментирането на пептидните вериги. Това налага и използване на втори подход.

## I.2. Втори подход за охарактеризиране на въглехидратната структура на хемоцианин от *R. venosa*

Вторият подход включва охарактеризиране на гликани, получени след ензимна хидролиза на структурните субединици RvH1 и RvH2 със специфична гликозидаза PNGase F (Фиг. 56) и прилагане на различни масспектрометрични техники. Този подход ни дава възможност да фрагментираме само въглехидратната верига и да определим нейната структура. По този начин избягваме затруднението, което възниква при анализиране на гликопептиди чрез масспектрометричен анализ, където получените фрагменти от въглехидратните вериги често доминират над пептидните фрагменти и това понякога затруднява определянето на сложните въглехидратни структури.

За изследване на въглехидратните структури на хемоцианин, изолиран от морски охлюв *R. venosa*, обитаващ Черно море, бяха използвани различни методи и техники, като MALDI-TOF-MS и Q-Trap–масспектрометър, след ензимно освобождаване на N-гликаните от полипептидните вериги на структурните субединици RvH1 и RvH2.



**Фиг. 10.** Получаване на N-гликани след хидролиза със специфична гликозидаза PNGase F.

Дегликозилирането на RvH1 и RvH2 бе проведено в денатуриращ разтвор (1% SDS, 0.5 M меркаптоетанол, 0.1 M EDTA), като N-гликани бяха отделени от протеина след 20 часово инкубиране със специфичния ензим PNGase F (Фиг. 10). Освободените гликани бяха пречистени от реакционната смес чрез елуирани с 25% ацетонитрил /0.05% трифлуороцетна киселина на колона Carbohydrate.

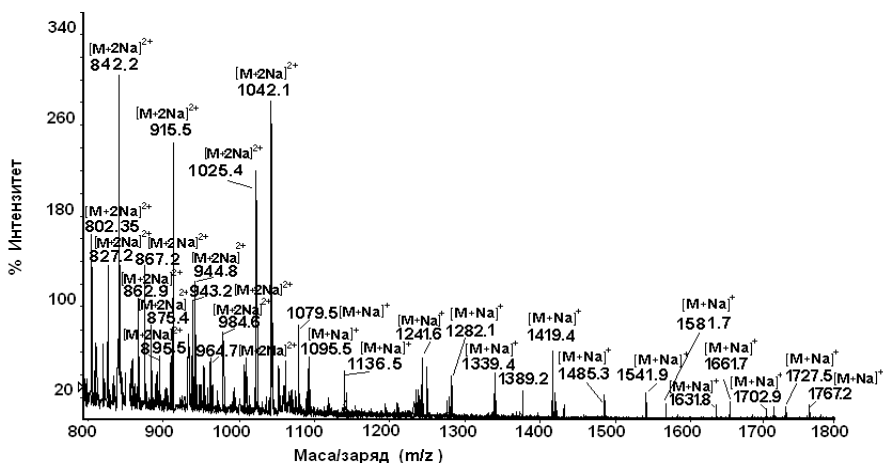
### I.2.1. Анализиране на гликани изолирани от структурните субединици RvH1 и RvH2 чрез MALDI-TOF/MS

Масите на освободените гликани от структурните субединици RvH1 и RvH2 след третиране с PNGase F бяха определени чрез MALDI-MS анализи. MS-спектрите бяха регистрирани в диапазона от  $m/z$  900 до  $m/z$  3000.

Частична информация за въглехидратния състав и начина на свързване на монозахаридните остатъци в гликаните, (използвана по-късно при тяхното интерпретиране) беше получена чрез анализирането им с MALDI-TOF-MS преди и след третиране със специфични гликозидази, като:  $\alpha$ -1,2-манозидаза и  $\alpha$ -1,2,3,4,6-N-ацетилглюкозаминидаза.

### I.2.2. Анализиране на гликани изолирани от структурните субединици RvH1 и RvH2 чрез Q-Trap системата

Точеният анализ на монозахаридите остатъци и определяне на въглехидратните структури на гликаните бе постигнат чрез тандем-маспектрометрия на Q-Trap системата. Прилагайки този метод, бяха определени структурите на 25 гликана, изолирани от RvH1 и на 28 гликана от RvH2.

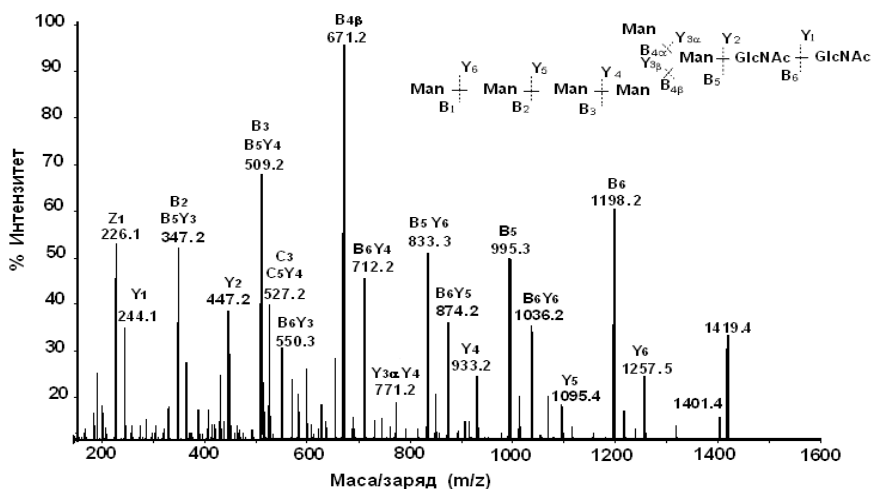


Фиг. 11. Q-Trap-MS спектър на гликани от RvH2 след третиране с PNGase F.

На фигура 11 е представен Q-Trap-MS спектър на изолираните гликани от RvH2, изразени като Na-адукти, чрез единични  $[M+Na]^+$  и двойно  $[M+2Na]^{2+}$  заредени йони. При този метод бе използвана Q-Trap тандем маспектрометрия (хибриден квадруполно-линеен мас-

спектрометър с йонен капан), като структурата на гликаните бе определена чрез фрагментиране в MS/MS – режим на положителна йонизация. В MS/MS спектрите на фрагментираните гликани доминирани са Y и B йоните, които предоставят информация за последователността на свързване и разклоненията в структурите. Позициите на монозахаридните остатъци в олигозахаридните вериги са потвърдени от C, Z, X и A йоните.

В структурната субединица RvH2 бяха идентифицирани няколко гликана от високоманозен тип. Структурата на гликана представен като  $[M+Na]^+$  при  $m/z$  1419.4 бе определена от MS/MS-спектъра чрез проследяване на разликите между B и Y йоните (Фиг.12).



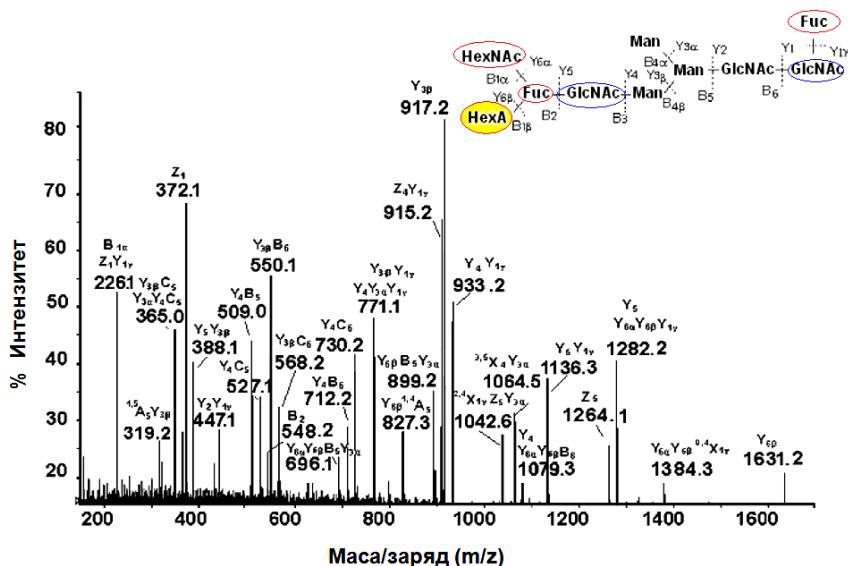
**Фиг. 12.** MS/MS-спектр и структура на гликан изолиран от RvH2, представен като  $[M+Na]^+$  йон при  $m/z$  1419.4.

От интерпретацията на Y-йоните при  $m/z$  244.1 ( $Y_1$ ), 447.2 ( $Y_2$ ), 933.2 ( $Y_4$ ), 1095.4 ( $Y_5$ ), 1257.5 ( $Y_6$ ), на B-йоните при  $m/z$  347.2 ( $B_2$ ), 509.2 ( $B_3$ ), 671.2 ( $B_{4B}$ ), 995.3 ( $B_5$ ), 1198.2 ( $B_6$ ), както и на йоните  $B_6Y_3$  ( $m/z$  550.3),  $B_5Y_6$  ( $m/z$  883.3) и  $B_6Y_6$  ( $m/z$  1036.2) бе установена последователността на свързване на монозахаридните остатъци. На Фиг. 12 е представена определената структура от високоманозен тип, изградена от два GlcNAc и осем Hex остатъка.

От проведените изследвания чрез тандем-масспектрометрия на недериватизирани гликани бе установено, че някои от освободените N-гликани от RvH2, представени като  $[M+2Na]^{2+}$  при  $m/z$  842.2 (1661.6) и при  $m/z$  915.6 (1807.6) (Табл. 4Б), притежават нов тип въглехидратна структура, включваща един HexNAc-остатък и един остатък от

хексуринова киселина HexA (глюкуронова или идуринова), свързани към вътрешен фукозен остатък, който от своя страна е свързан към вътрешен GlcNAc-остатък. Подобна структура е била установена и от Sandra K. и сътрудници, но при анализиране на предварително маркирани гликани от RvH1 с 8-аминопирен-1,3,6-трисулфонат (APTS) и 3-аминопирозол (3-AP) с капиларна електрофореза и MS/MS.

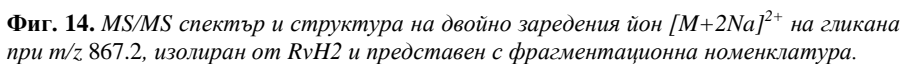
MS/MS спектърът на гликана от RvH2, представен като двойно зареден йон  $[M+2Na]^{2+}$  при  $m/z$  915.2, е показан на Фиг. 13. Доминиращи в представения MS/MS спектър са Y йоните, които могат да бъдат разграничени от B йоните, поради асиметричната природа на молекулата. Интерпретацията на йоните  $Z_1$  (372.1) и  $Y_{3\beta}$  (917.2), както и  $Y_4$  (1079.3),  $Z_5$  (1264.1) и  $Y_5$  (1282.2) бе убедително доказателство за наличие на крайно свързан Fuc остатък към GlcNAc от пентазахаридната сърцевина.



Фиг. 13. MS/MS спектър и структура на двойно заредения йон  $[M+2Na]^{2+}$  на гликана при  $m/z$  915.2 от RvH2, обозначен с фрагментационна номенклатура.

От проведенят MS/MS анализ, бе установено, че наличието на йоните  $Z_1$  при  $m/z$  372.1 и  $Y_{6\beta}$  при  $m/z$  1631.2, както и фрагментационните йони  $^{2,4}X_{1\gamma}Z_5Y_{3\alpha}$  при  $m/z$  1042.6 и  $Y_{6\alpha}Y_{6\beta}^{0,4}X_{1\gamma}$  при  $m/z$  1384.3 получени в резултат на кръстосано разкъсване на пиранозния цикъл, също са доказателство за наличие на два Fuc остатъка – единият от които е вътрешен, локализиран почти в средата на въглеродната верига, а другият е  $\alpha(1-6)$  свързан към шестия въглероден атом (C 6) на GlcNAc

При анализиране на MS/MS спектъра на гликан  $[M+2Na]^{2+}$  при  $m/z$  867.2 (Фиг. 14) бе получена друга интересна структура (Табл. 4Б), при която бе установено модифициране на пентазахаридната сърцевина с по един Fuc и Xyl остатък. Наличието на фукозен остатък,  $\alpha$ -1-6 свързан към въглерод C6 от крайния GlcNAc остатък от пентазахаридната сърцевина  $Man_3GlcNAc_2$  (Фиг. 13), бе потвърдено от йонните фрагменти  $Y_1$  ( $m/z$  390.1),  $Y_2$  ( $m/z$  593.2) и  $Y_4Y_{3Y}$  ( $m/z$  1079.3), както и от наблюдаваната разлика от 146 единици между йоните  $Y_4Y_{3Y}$  ( $m/z$  1079.3) и  $Y_4Y_{1Y}Y_{3Y}$  ( $m/z$  933.2), която отчита загубата на точно този фукозен остатък. От друга страна, анализираният гликан съдържа и един ксилозен остатък  $\alpha$ (1-2), свързан към  $Man(\beta$ 1-4) от пентазахаридната сърцевина ( $Man_3GlcNAc_2$ ), което бе подкрепено от интензивните йони  $Y_{3\beta}B_4$  ( $m/z$  497.2) и  $Y_4B_4$  ( $m/z$  659.3).



Присъствието на Hyl е твърде необичайно за въглехидратните структури на гликопротеини от животински произход, тъй като този



остатък е характерен за гликопротеини от растителен произход. Наличието на  $\text{Hex}$  във въглехидратните структури на хемоцианини от моллюски, се свързва с високо-имуногенните им свойства проявени при бозайници. Но подобни N-гликанови структури съдържащи  $\text{Hex}$ , са открити в хемоцианини и от други гастроподи, като *Helix pomatia*, *H. lucorum*, *H. tuberculata*.

Структурата, която съответства на  $\text{B}_2$  йона ( $m/z$  541.2), съдържа три хексозни остатъка, единият от които е O-метилян и крайно свързан в структурния мотив  $\text{MeHex}(\text{Hex})\text{Hex}$ . Въз основа на проведен анализ бе определена олигозахаридната структура, представена на Фиг.14.

При анализа на MS/MS спектрите на гликани изолирани от RvH1 и RvH2 бяха установени няколко метилирани структури (Табл. 4А: гликани № 16 и 18; Табл. 4Б: гликани № 15, 16 и 22). Известно е, че въглехидратни структури, съдържащи 3-O-метил-D-маноза или 3-O-метил-D-галактоза са били установени и при други хемоцианини от моллюски, като *Helix pomatia*, *Lymnaea stagnalis* и *Arion lusitanicus*. Предполага се, че тези метилирани N-гликани играят важна регулираща роля в организма на тези гастроподи.

### **I.2.3. Амидиране на гликани изолирани от структурните субединици и анализ чрез MALDI-TOF/MS**

Тъй като разликата между молекулните маси на метилиран хексозен остатък и хексуронова киселина е много малка - само 0.036 Da, те не биха могли да бъдат разграничени чрез горепосочените методи и техники. За доказване на наличието на хексуронова киселина ( $\text{HexA}$ ) във въглехидратните структури на N-гликани, използвахме друго независимо изследване, а именно анализ на гликани чрез MALDI-MS преди и след амидиране. Този метод за пръв път е използван от Нобеловия лауреат Танака за интерпретиране на сialовата киселина в MALDI-MS. Методът включва модифициране на карбоксилната група и превръщането ѝ в амид. Тази идея бе използвана от нас за доказване наличието на хексуронова киселина в N-гликаните, изолирани от структурните субединици RvH1 и RvH2. Модифицирането на карбоксилната група и превръщането ѝ в амид, води до понижаване на масата на гликана с 1.0 Da. Така модифицираните гликани бяха анализирани с MALDI-TOF/MS. От получените маспектрите преди и след амидиране на гликановата смес от RvH2, бе установено промяната на масите на два гликана при  $m/z$  1661.6 и 1807.6 с 1 Da.

Получените резултати от тези независими изследвания, са доказателство за наличие на нова гликанова структура в хемоцианина от *R. venosa*, при която хексуроновата киселина е свързана с вътрешна

фукоза от въглехидратната верига. Присъствието на остатък от хексууронова киселина в структурите на N-гликани се среща твърде рядко в гликопротеини, тъй като тя е хатактерена за структурите на протеогликаните. Въпреки това, подобна структура на N-гликани от комплексен вид, съдържаща остатък хексууронова киселина е открита при хората, като част от въглехидратния епитоп (SO<sub>4</sub>-3GlcAβ1-3Galβ1-4GlcNAc) в HNK-1, (познат още като антиген CD57, принадлежащ към семейството на глюкуронил трансферазите).

От проведените изследвания бяха определени въглехидратните структури на 25 гликани, от RvH1 и 28 гликани от RvH2, представени на Таблица 4 А и Б. Също така беше установено, че при N-гликаните от RvH преобладават структури от високоманозен и комплексен тип, както при повечето хемоцианини от молюски.

**Таблица 4 А). N-гликани, изолирани от RvH1**

№	Композиция	MALDI	LCMS-Q Trap
1	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	933.3	933.3
2	Xyl Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1065.6	1065.6
3	Fuc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1079.5	1079.5
4	Man <sub>4</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1095.5	1095.5
5	HexNAc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1136.5	1136.5
6	Man <sub>5</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1257.6	1257.6
7	Fuc HexNAc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1282.6	1282.6
8	HexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1339.6	1339.6
9	Man <sub>6</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1419.6	1419.4
10	Fuc HexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1485.7	1485.7
11	Hex <sub>3</sub> Xyl Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1550.9	1550.9
12	Man <sub>7</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1581.7	802.4
13	Fuc <sub>2</sub> HexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1631.8	827.6
14	HexA Fuc <sub>1</sub> HexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1661.7	842.1
15	HexNAc <sub>3</sub> Fuc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1688.4	855.5
16	MeHex Hex <sub>2</sub> Fuc Xyl Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1711.6	867.3
17	Hex <sub>3</sub> Fuc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1747.8	885.2
18	MeHexHexNAc <sub>2</sub> Fuc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1807.8	915.6
19	Fuc <sub>2</sub> HexNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1834.8	928.6
20	Hex HexNAc <sub>3</sub> Fuc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1850.4	936.25
21	Hex <sub>3</sub> HexNAc Xyl <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1887.9	955.5
22	Fuc <sub>2</sub> HexNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2037.8	1030.2
23	Fuc Hex <sub>3</sub> HexNAc Xyl <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2049.9	1035.98
24	HexNAc <sub>5</sub> Fuc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2094.0	1058.5
25	Hex HexNAc <sub>3</sub> Fuc Xyl <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2115.6	1069.3

**Таблица 4 Б).** N-гликани изолирани от RvH2

№	Композиция	MALDI	LCMS-Q Trap
1	Fuc <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1079.3	1079.5
2	Hex <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1095.2	1095.5
3	HexNAc <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1136.4	1136.5
4	Fuc <sub>1</sub> Hex <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1241.6	1241.4
5	Hex <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1257.7	1257.4
6	Fuc <sub>1</sub> HexNAc <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1282.2	1282.1
7	HexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1339.6	1339.4
8	Hex <sub>2</sub> Xyl <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1389.4	1389.2
9	Hex <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1419.6	1419.4
10	Fuc <sub>1</sub> HexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1485.7	1485.3
11	HexNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1541.7	1541.95
12	Hex <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1581.7	802.35
13	Fuc <sub>2</sub> HexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1631.8	827.2
14	HexA <sub>1</sub> HexNAc <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1661.7	842.2
15	MeHexNAc <sub>1</sub> HexNAc <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1702.9	862.9
16	MeHex <sub>1</sub> Hex <sub>2</sub> Fuc <sub>1</sub> Xyl <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1711.6	867.2
17	Hex <sub>4</sub> Fuc <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1727.1	875. 4
18	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>1</sub> Fuc <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1767.9	895.5
19	HexA <sub>1</sub> HexNAc <sub>2</sub> Fuc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1807.8	915.5
20	Hex HexNAc <sub>3</sub> Fuc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1850.4	936.25
21	Hex <sub>4</sub> Xyl <sub>1</sub> Fuc <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1859.2	941.4
22	MeHex <sub>1</sub> HexNAc <sub>1</sub> Fuc <sub>1</sub> HexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1864.8	943.6
23	Hex <sub>2</sub> HexNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1866.6	944.8
24	Hex <sub>5</sub> Fuc <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1890.6	956.6
25	Hex <sub>6</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1906.6	964.7
26	Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>1</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1946.2	984.6
27	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2027.8	1025.4
28	Hex <sub>3</sub> HexNAc <sub>1</sub> Fuc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2061.0	1042.1

В заключение можем да обобщим, че в структурните субединици бяха идентифицирани нов важен клас N-гликани за хемоцианините, с въглехидратни структури, включващи вътрешен фукозен остатък, свързан към GlcNAc и заместен на две позиции с един  $\beta(1-2)$ -N-ацетилхексозаминов остатък и една хексуринова киселина HexA. Този нов вид структура не е открита досега във въглехидратните вериги на други хемоцианини от молюски. Освен това, бяха определени и няколко олигозахаридни структури, включващи O-метирирана хексоза (Табл. 4 А, Б), каквито са били открити и в някои други хемоцианини от молюски.

Следвайки разработената методика и използвайки различни маспектрометрични анализи, бе анализирана въглехидратна структура на хемоцианин от *R. venosa*, като в структурните субединици RvH1 и RvH2 бе установено наличието на високо хетерогенни смеси от гликани с различен състав - Hex<sub>0-9</sub> HexNAc<sub>2-4</sub> Hex<sub>0-3</sub> Pent<sub>0-3</sub> Fuc<sub>0-3</sub>.

Тези изследвания са важна стъпка в разработването на ефективна методика за определяне и идентифициране на въглехидратната структура и на други хемоцианини от молюски. Представените от нас резултати убедително доказват, че хемоцианите представляват интересни за изследване молекули, поради наличието на сложни въглехидратни вериги с разклонената антенна структура, съдържащи разнообразни монозахаридни остатъци. Охарактеризираната въглехидратна структура на хемоглицин от *R. venosa* има фундаментално значение, тъй като разширява познанията относно многообразието на N-гликанови структури на хемоцианини от молюски.

## **II. Функции на въглехидратната структура в хемоцианин изолиран от морски охлюв *R. venosa***

Известно е, че въглехидратните вериги играят много важна роля в природата, като участват в почти всички биологични процеси и изпълняват различни функции: влияят върху нагъването, стабилността и разтворимостта на протеините, а също така намират приложение при диагностика и лечение на различни болести.

Информацията за стабилността на биомолекулите е особено важна и е свързана с тяхното практическо приложение. В литературата има ограничен брой статии, в които се дискутират подобни биофизични и структурни изследвания за стабилността и функцията на хемоцианините. Изследване на стабилността на хемоцианините представлява интерес, тъй като хемоцианините от гастроподи имат сложна комплексна структура, съставена от мултиплетни субединици, всяка съставена от 7 или 8 подобни, но неидентични функционални единици. Така например хемоцианинът от *R. venosa* притежава сложна четвъртична структура, с молекуларна маса около 9 000 kDa, като цялата молекула може да бъде представена като олигомерна структура изградена от кухи цилиндри, съставени от декамери или дидекамери (оформени след свързване на два декамера „лице с лице”). Нативната молекула RvH е изградена от две имунологично различни и структурно независими изоформи - структурни субединици RvH1 и RvH2 (с молекуларна маса съответно 400 и 420 kDa), всяка представляваща хомоолигомер. В хемолимфата, значителна част от двете изоформи RvH1 и RvH2, присъстват като дидекамерни структури.

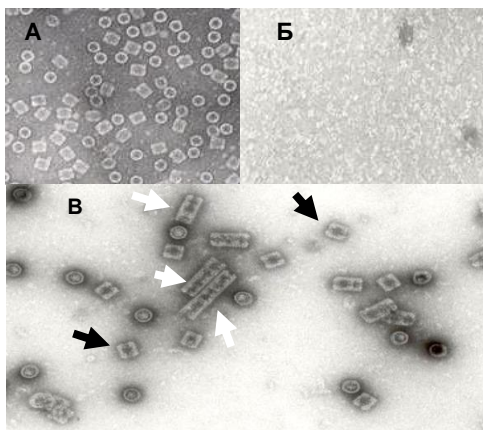
Всеки декамер съдържа 10, а дидекамер - съответно 20 структурни субединици.

## II.1. Анализ на стабилността и поведението на реасоциация на хемоцианин от *R. venosa* чрез трансмисионна електронна микроскопия

Поведението на нативната молекула на хемоцианин от *R. venosa* и на изолираните структурни субединици бяха анализирани с помощта на трансмисионна електронна микроскопия при различни концентрации на  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  йони и различни рН-стойности. Наблюдаваните различия бяха обяснени с влиянието на въглехидратните вериги върху стабилността на протеина.

### II.1.1. Стабилност и реасоциативно поведение на нативния RvH

На електронната микрография на Фиг. 15 А е показан изглед „от горе” и „от страни” на нативната молекула RvH в разтвор на 50 mM Tris/HCl буфер, рН 7.0, съдържащ стабилизиращи йони от 20 mM  $\text{CaCl}_2$  и 5 mM  $\text{MgCl}_2$ . Установено бе, че в разтвора освен няколко декамери, преобладават дидекамерните форми (кухи цилиндрични структури, формирани след свързване на два декамера „лице с лице”), което е типично състояние за нативната молекула на хемоцианини при всички гастроподи (Фиг. 15А). След диализа за едно денонощие срещу 0.13 M глицинов буфер, рН 9.6, бе констатирано, че нативния хемоцианин RvH е почти напълно дисоцииран на структурните субединици RvH1 и RvH2 (Фиг. 15Б).



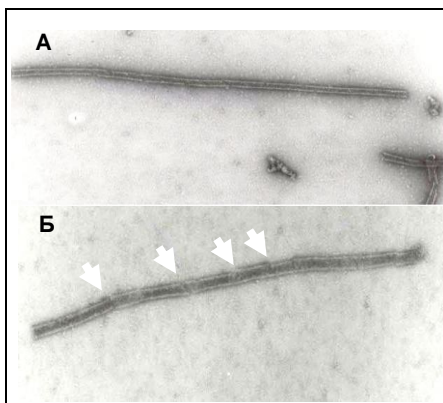
**Фиг. 15.** Трансмисионен електронно-микроскопски анализ на хемоцианин от *R. venosa*. Изглед на нативната молекула на RvH от страни (правоъгълничета) и отгоре (кръгчета). А) Нативен RvH в 50 mM Tris/HCl буфер, рН 7.0, съдържащ 20

*mM CaCl<sub>2</sub> и 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Б) Дисоцииран нативен хемоцианин RvH в 0.13 M Gly/NaOH буфер, pH 9.6; В) Реасоцииран нативен хемоцианин RvH след 2 дни в стабилизиращ буфер (СБ) с pH 7.0, съдържащ 50 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub> (реасоциацията е почти пълна). С увеличаване на концентрацията на Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> йони, на 100 mM, реасоциацията протича по бързо, при което се образуват не само цилиндрични дидекамери (черните стрелки), но и мултимери (белите стрелки).*

След промяна на условията - диализа на дисоциираните субединици за 3 дни срещу стабилизиращ буфер (СБ), pH 7.0, съдържащ 20 mM CaCl<sub>2</sub> (Фиг. 15В, черни стрелки) или 50 mM CaCl<sub>2</sub> (Фиг. 15В, бели стрелки), бе установено, че структурно пробата е много по-хетерогенна в сравнение с изходната на (Фиг. 16А). Както показва Фиг. 16В, след реасоциацията в СБ с pH 7.0, съдържащ 20 mM или 50 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub> респективно, някои от субединици присъстват като дидекамери (посочени с черни стрелки), както и мултидекамери (белите стрелки). Пълната реасоциация беше наблюдавана след третия ден от диализата, проведена срещу СБ буфер съдържащ 100 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub> (Таб. 5 ).

### **П.1.2. Стабилност и реасоциативно поведение на структурните субединици RvH1 и RvH2 в сравнение със KLN1 и KLN2**

Получените анализирани с електронен микроскоп, отразяващи поведението на пречистените изоформи на хемоцианина от *R. venosa* в стабилизиращ буфер, показват наличието на различни олигомерни структури – мултидекамети и тубули. Дисоциираната RvH1 в 50 mM Tris/HCl буфер (pH 9.6) се реасоциира след 3 дневна диализа срещу 50 mM Tris/HCl буфер, (pH 7.0), съдържащ 50 mM или 100 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub>, като образува дълги спираловидни тубули (Фиг. 16 А, Б). С повишаване на концентрацията на CaCl<sub>2</sub> на 100 mM в стабилизиращия буфер, декамерите асоциират в тубули с по-голяма дължина (Фиг. 16 Б).



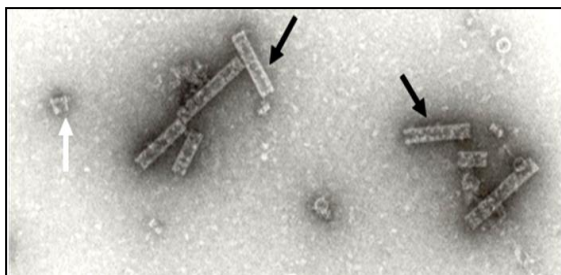
**Фиг. 16.** Електронна микроскопия на реасоциация на структурна единица RvH1. След 12 часа диализа в 50 mM Tris/HCl буфер, с pH 9.6, реасоциацията бе проведена в:

А) 50 mM Tris/HCl буфер, pH 7.0, съдържащ 50 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub> за 3 дни. Все още не са образувани дълги спирални тубули;

Б) 100 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub> след 3 дни диализа, се образуват спирален тубул, както и мултидекамер.

След промяна на условията - диализа на дисоциираните субединици за 3 дни срещу стабилизиращ буфер (СБ), рН 7.0, съдържащ 20 mM CaCl<sub>2</sub> (Фиг. 16В, черни стрелки) или 50 mM CaCl<sub>2</sub> (Фиг. 16В, бели стрелки), бе установено, че структурно пробата е много по-хетерогенна в сравнение с изходната на (Фиг. 16А). Както показва Фиг. 16В, след реасоцията в СБ с рН 7.0, съдържащ 20 mM или 50 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub> респективно, някои от субединици присъстват като дидекамери (посочени с черни стрелки), както и мултидекамери (белите стрелки). Пълната реасоциация беше наблюдавана след третия ден от диализата, проведена срещу СБ буфер съдържащ 100 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub> (Таб. 5 ).

При аналогичен експеримент, проведен при същите условия, бе установено, че структурна субединица RvH2 има различно поведение от RvH1 и се реасоциира в няколко къси мултимери и дидекамери (Фиг. 17). Пълната реасоциация на RvH2 не бе наблюдавана при тези условия.



**Фиг. 17.** Електронна микрография на реасоциираната RvH2. След дисоциация за една нощ при рН 9.6, реасоциацията на структурна субединица RvH2 бе осъществена след 3 дневна диализа в стабилизиращ буфер (СБ) с рН 7.0, съдържащ 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, при което RvH2 продуцира дидекамери (белите стрелки) и къси мултимери (черните стрелки). Пълна реасоциация на RvH2 в СБ не бе наблюдавана при тези условия.

От проведените изследвания, с трансмисионна електронна микроскопия бе установено, че стабилността и реасоцията на нативната молекула на хемоцианин от *R. venosa* и на пречистените структурни субединици RvH1 и RvH2 се различават, но зависят от рН на разтвора и концентрацията на Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> йони. Високата концентрация на Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> йони води до бързо реасоцииране на RvH1, което бе изразено в образуване на спирални тубули и дълги мултидекамери. Реасоциацията на структурна субединица RvH2 при същите условия протича бавно, като изобщо не се стига до формиране на тубули, а се образуват предимно къси мултидекамери. Спиралните тубули и дълги мултимери на RvH1 показват по-голяма стабилност при по-високи стойности на рН, в

сравнение с късите мултидекамери и дидекамери на RvH2, които са и в по-голяма степен рН-зависими.

В Таблица 5, са представени резултатите от наблюдаваните промени, които бяха установени след дисоцииране/реасоцииране на RvH и структурните субединици RvH1 и RvH2. Резултатите бяха сравнени с наблюдаваните промени при аналогичен експеримент със структурните субединици KLN1 и KLN2 в период от 1-3 дни, или 1 седмица при 4°C.

**Таблица 5.** Реасоциативно поведение на структурните субединици RvH1 и RvH2 в сравнение със структурните субединици KLN1 и KLN2.

Условия	RvH	KLN1	RvH1	KLN2	RvH2
<b>рН 7.0, реасоциация след 1-3 дни</b>					
20 mM CaCl <sub>2</sub> и MgCl <sub>2</sub>	Субединици Дидекамери	Дидекамери, къси спирални тубули	Субединици Дидекамери	Дидекамери, къси мултимери, спирални тубули	Субединици Дидекамери
50 mM CaCl <sub>2</sub> и MgCl <sub>2</sub>	Субединици-дидекамери и къси мултимери		Спирални тубули мултидекамери		Дидекамери и къси мултимери
100 mM CaCl <sub>2</sub> и MgCl <sub>2</sub>	Дидекамери и къси мултимери		Къси тубули мултидекамери		Къси мултидекамери и тубули, дидекамери
<b>рН 7.0, реасоциация след 1 седмица</b>					
100 mM CaCl <sub>2</sub> и MgCl <sub>2</sub>	Дидекамери мултидекамери	Спирални тубули мултидекамери	Дълги спирални тубули и мултидекамери	Дълги спирални тубули и мултидекамери	Дълги и къси мултидекамери
<b>Стабилност на реасоциираните форми в буфер с различни стойности на рН, 100 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub></b>					
рН 8.6 1-3 дни			Къси мултидекамери, тубули		Къси мултидекамери, дидекамери
рН 8.6 1 седмица			Къси мултидекамери, декамери		
рН 9.6, 1 седмица			Мултидидекамери, декамери, дидекамери и субединици		Дидекамери и субединици

Получените резултати показват, че при идентични условия, структурните единици RvH1 и KLN2 имат аналогично поведение на реасоциация, при което много по-лесно формират мултидекамери и спираловидни тубули, в сравнение със структурните субединици RvH2 и KLN1. От друга страна, от експериментите беше установено, че скоростта на реасоциация за RvH1 и KLN2 е много по-голяма, в СБ с високи концентрации (100 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub>), отколкото при по-ниски концентрации (20 mM и 50 mM). Констатирано бе, че поведението на структурната субединица RvH1, след реасоциация в присъствие на паралелно въведени калциеви йони, е много по-близко до поведението на KLN2, отколкото до RvH2 и KLN1.



Разликата в реасоциативното поведение на двете субединици RvH1 и RvH2, (съответно на KLN2 и KLN1), бихме могли да обясним със специфичното разположение на въглехидратните вериги на повърхността на декамерите, което вероятно е причината за невъзможността на декамерите да взаимодействат помежду си и да образуват по-дълги мултидекамери. Построеният 3-D модел на субединицата KLN1 от Gatsogiannis C. и J. Markl, показва разположението на центровете на гликозилиране и пространственото разположението на въглехидратните вериги на повърхността на дидекамера. Вероятно поради това разположение субединицата KLN1 има различно поведение при реасоциация, в сравнение с KLN2, като не образува дълги спирални тубули и мултидекамери.

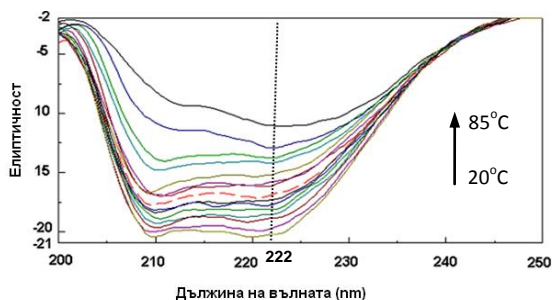
Поради установената аналогия в поведението на реасоциация на RvH1 и KLN2 и съответно на RvH2 и KLN1, при идентични експерименти, бе направено предположение, че разликата в реасоциативното поведение на двете субединици RvH1 и RvH2, също може да бъде обяснена със специфичното разположение на въглехидратните вериги на повърхността на декамера на изоформа RvH2, което не позволява формирането на дълги мултидекамери, тъй като възпрепятства взаимодействието между декамерите и образуването тубули, каквито бяха наблюдавани при RvH1 и KLN2.

## **II.2. Определяне на стабилността на хемоцианин от *R. venosa* с помощта на кръгов дихроизъм**

Изследванията върху биофизичните свойства и стабилността на хемоцианините от молюски показват, че конформационната стабилност на нативните молекули RvH и изолираните RvH1 и RvH2 зависи от различни денатуранти (като, pH и гуанидхидрохлорид Gdn.HCl). Подобни проучвания се усложняват от факта, че трудно могат да се разграничат настъпилите промени на четвъртичната структурата на олигомерния гликопротеин и тези на третичната и вторична структури. Доказателство за това е и представеното по-горе различно поведение на реасоцииране на изолираните структурни субединици RvH1 и RvH2, в сравнение с дисоциираната форма на нативната молекула RvH.

Бяха използвани експерименталните данни от CD-спектрите и термодинамичния подход за оценка на стабилността на нативната молекула на RvH, структурните субединици RvH1 и RvH2 и една функционална единица RvH2-е. Тази ФЕ бе избрана, тъй като са известни както първичната, така и кристалната ѝ структура, което дава възможност за обяснение на свойствата ѝ.

От сканираните многобройни CD-спектри (Фиг. 18) при два вариращи параметъра в широки граници - температура (20-85°C) и pH (2-12), за всеки един от изследваните обекти бе изчислена елиптичността  $[\theta]_{222}$  (отчитаща промените в  $\alpha$ -спиралните структури при 222nm), за всяка pH-стойност и температура.



**Фиг. 18.** CD-спектри, измерени в далечната ултравиолетова област (200-250 nm) на RvH2, в температурния интервал 20 - 85°C при pH 7.4.

С цел определяне на областите на обратимост за всеки един от анализирания обекти бяха изследвани зависимостите на елиптичността  $[\theta]_{222}$ , като функция на температурата при фиксирани pH-стойности и обратно. Прилагането на термодинамичния подход, предоставя възможност за изучаване на механизмите на температурните и pH-зависимите структурни промени на мултимерни протеини.

### **II.2.1. Влияние на температурата при фиксирани pH-стойности върху RvH и структурни субединици RvH1 и RvH2. T-индуцирани преходи**

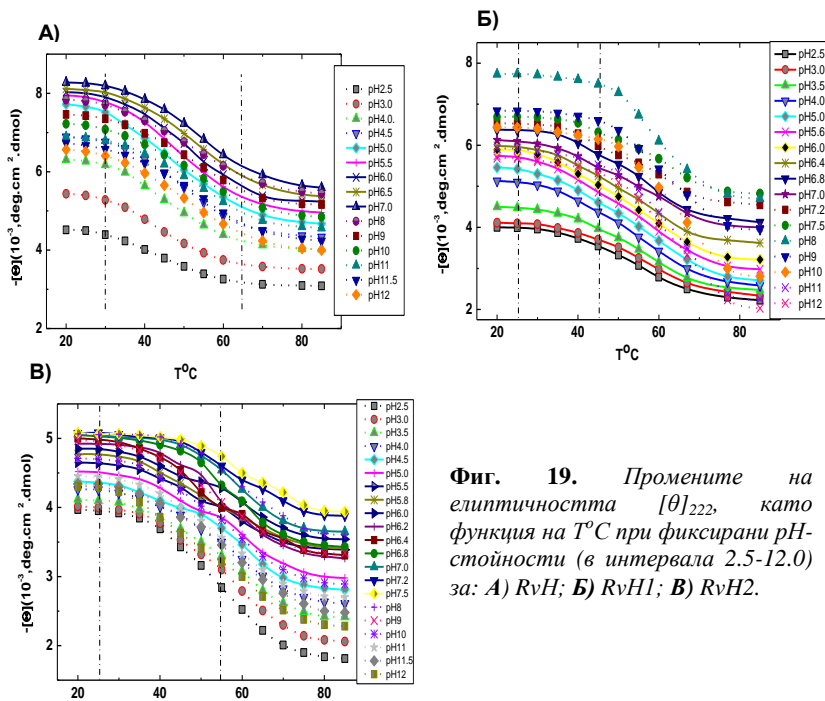
Представените графични зависимости на Фиг. 19А, Б и В ортазяват промените на елиптичността като функция на температурата при фиксирани pH-стойности за нативната молекула RvH и за субединици RvH1 и RvH2.

При анализиране на промените на елиптичността, като функция на температурата при фиксирани pH-стойности бе установено наличие на T-индуцирани промени в широк температурен интервал 20-85°C (Фиг. 19А, Б и В).

Установено бе, че амплитудата ( $\Delta[\theta]_N - \Delta[\theta]_D$ ) на кривите при различни pH-стойности плавно намалява в посока на крайните стойности. Друга особеност бе наблюдаваната необратимост в посока на “крайните състояния”, които са с относително еднакво нарушена структура (особено за нативния хемоцианин RvH).

Сравнявайки хода на елиптичните криви  $[\theta]_{222}(T)$  на Фиг. 19 А, Б и В бяха установени, относително малки промени на елиптичността  $[\theta]_{222}$  (предимно при RvH) дори и при високи температури, което показва, че много от елементи на вторичната структура се запазват, особено в

неутрално рН. Следователно, не се наблюдава Т-зависимо разгъване дори и при температури над 80°C, където протеинът запазва "глобуларното си състояние".



**Фиг. 19.** Промените на елиптичността  $[\theta]_{222}$ , като функция на  $T^\circ\text{C}$  при фиксирани рН-стойности (в интервала 2.5-12.0) за: А) RvH; Б) RvH1; В) RvH2.

От кривите отразяващи елиптичността  $[\theta]_{222}(T)$ , на Фиг. 19 Б и В, бе установено, че двете субединици имат различно поведение. Относително по-малките промени на елиптичността  $[\theta]_{222}(T)$  на RvH2 при стандартни условия (25°C) отразяват по-голямата ѝ стабилност в сравнение с RvH1.

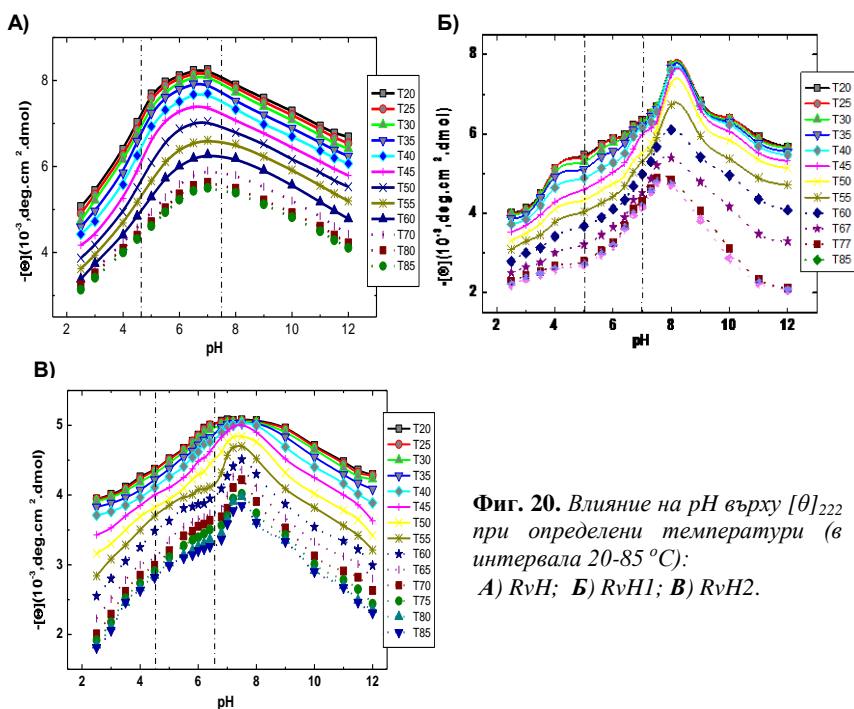
### II.2.2. Влияние на рН върху стабилността на нативната молекула RvH и структурните субединици RvH1 и RvH2 при различни температури

След изследване на елиптичността, като функция от рН, при фиксирани температури бяха получени 3 комплекта криви за нативната молекула на RvH и структурни субединици RvH1 и RvH2, представени на фигура 20 А,Б, В.

И трите комплекта криви  $[\theta]_{222}(\text{pH})$ , отразяващи рН-преходите (т.е кривите отразяващи киселата и алкална денатурация), имат "форма на камбана", с несиметрични краища в киселата и алкалната области

(особено RvH и RvH1) и с екстремум между pH 5-8 за нативната молекула на RvH, около pH 8.0 за RvH1 и между pH 7-8 за RvH2 (Фиг. 20 А, Б, В).

При сравняване на получените криви, отразяващи зависимостта  $[\theta]_{222}(\text{pH})$  при различни температури, бе наблюдавана забележителна разликата в поведението на нативната молекула на RvH и RvH1 и RvH2 (Фиг. 20). Представените елптични криви  $[\theta]_{222}(\text{pH})$  на Фиг. 20А, отразяващи pH-преходите за RvH, са подчертано несиметрични и без ясно изразени сигмоиди за всички крайни стойности на pH. Бяха наблюдавани съвсем малки промени на кривите  $[\theta]_{222}(\text{pH})$  в алкалната област (pH 8-12), което подсказва, че алкалната денатурация е необратим процес за нативната молекула RvH.



**Фиг. 20.** Влияние на pH върху  $[\theta]_{222}$  при определени температури (в интервала 20-85 °C):  
А) RvH; Б) RvH1; В) RvH2.

От хода на елптичните криви  $[\theta]_{222}(\text{pH})$  за структурната субединица RvH1 бе установено, че при стандартни условия (25°C) киселата денатурация (pH<sub>d,a</sub>) настъпва при pH 3.6, докато алкалната (pH<sub>d,b</sub>) - при pH 11.0 (Фиг. 20 Б). Освен това, процесът на денатурация в киселата област показва по-слаба температурна зависимост за разлика от алкалната.

Наблюдаваното нарастване на елиптичността  $[\theta]_{222}$  при рН между 5.3-7.0 (Фиг. 20 Б), вероятно се дължи на протонен дефицит, причинен от йонизацията на карбоксилните и имидазолните групи на RvH1.

При сравняване получените два комплекта криви, отразяващи промените на елиптичността  $[\theta]_{222}(\text{pH})$ , съответно за субединиците RvH1 и RvH2 (Фиг. 20 Б, В), беше установено, че при ниски температури (25-45°C) те са по-слабо рН-зависими, в сравнение с по-високите температури ( $\geq 50^\circ\text{C}$ ). Общото за двете субединици RvH1 и RvH2, е че при всички случаи промените на елиптичността  $[\theta]_{222}(\text{pH})$  са слабо изразени, в интервала на алкалните рН-стойности.

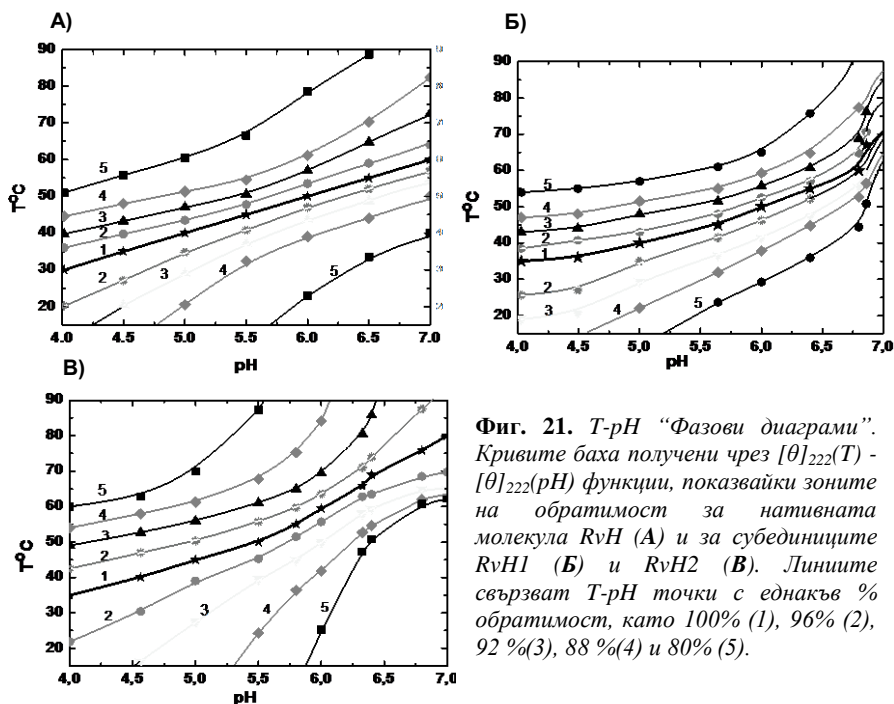
В заключение може да обобщим, че рН-преходите (Фиг. 20 А, Б, В), отразяващи кисела и алкална денатурация не са представени добре в поредицата данни за крайните стойности на рН за RvH, RvH1 и RvH2. Първата наблюдавана особеност бе по-високата стабилност на цялата молекула в сравнение със субединиците, което се дължи на влиянието на четвъртичната ѝ структура. Втората особеност е, че структурната субединица RvH2 (Фиг. 20 В) е по-стабилна в сравнение с RvH1 (Фиг. 20 Б). Наблюдаваният пик около рН 8.0 на кривите, отразяващи промените на елиптичността  $[\theta]_{222}(\text{pH})$  за RvH1, както и отсъствието на такъв за RvH2 при ниски температури в интервала 20-45°C показва, че субединицата RvH2 е стабилизирана от допълнителен - нейногенен фактор, в който допускаме участие на въглехидратните остатъци. Повишаването на температурата може да доведе до конформационни промени, касаещи олигозахаридните вериги.

### **II.2.3. Т-рН “Фазови диаграми”. Обратимост**

В резултат на големия брой експериментално отчетени точки на елиптичността  $[\theta]_{222}$  в координатната Т-рН мрежа, може да бъде направена “дисекция” на стабилността на всеки един от изследваните обекти при дадена температура за определени стойности на рН и обратно (при определено рН за съответната температура). Данните бяха превърнати в нови база данни, тъй като според принципът на термодинамиката, общата обратимост на система предполага независимост на крайните състояния от начина на тяхната реализация. Използвайки получените зависимости на елиптичността  $[\theta]_{222}(\text{T})$  и  $[\theta]_{222}(\text{pH})$ , бяха построени съответните рН-Т фазови диаграми (Фиг. 21 А, Б, В). Обратимостта на рН-Т денатурацията е пример за прилагането на термодинамичният подход, който може да бъде използван за оценка на стабилността на протеина.

От представените резултати на Фиг. 21 А, Б, В, следва, че обратимост от 100-80% на процесите на температурно и рН-зависимо

разгъване и за трите обекта е възможно само в много тесен рН-интервал в киселата област при стандартни условия (25°C). Вероятно в слабо кисела среда веригите на хемоцианина се превръщат в агломерат, поради факта, че повечето от олигозахаридните вериги са протонирани и по този начин намаляват взаимодействията на отблъскване. Тъй като RvH е олигомерен протеин, то топлинната и рН-индуцираната денатурация може да бъде придружена и от дисоцииране на съответните изоформи. Установено бе, че при стандартни условия нативна RvH молекула има малък интервал на обратимост около рН 4.0, докато субединиците RvH1 и RvH2 показват по-висока степен на обратимост в рамките на рН-интервала, съответно 4.1-4.7 и 4.2-5.3), което вероятно се дължи на силни заряд-диполни взаимодействия. В слабо кисела среда веригите на хемоцианина аломерират, което е типично за хемоцианините от гастроподи, тъй като повечето от въглехидратните остатъци са протонирани и взаимодействията на отблъскване са намалели.



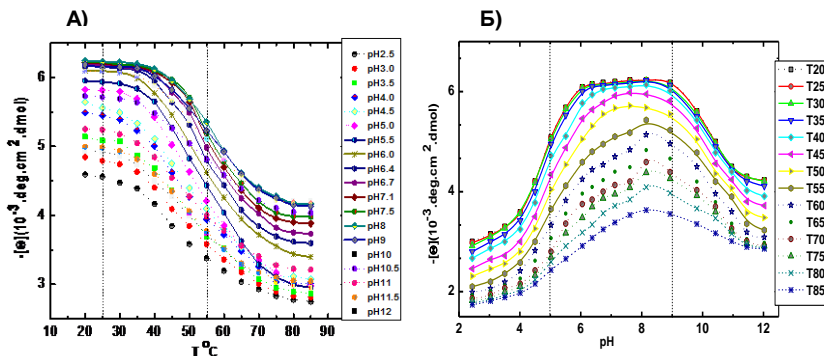
**Фиг. 21.** *T-pH “Фазови диаграми”.* Кривите бяха получени чрез  $[\theta]_{222}(T) - [\theta]_{222}(\text{pH})$  функции, показвайки зоните на обратимост за нативната молекула RvH (А) и за субединиците RvH1 (Б) и RvH2 (В). Линиите свързват *T-pH* точки с еднакъв % обратимост, като 100% (1), 96% (2), 92 % (3), 88 % (4) и 80% (5).

С нарастването на температурата в интервала 35-45°C, за структурните субединици бе установено, че обратимостта се увеличава и се "отваря прозорец на обратимост" в по-широк рН-интервал между

pH 4-6. С повишаване на температурата ( $T^{\circ}\text{C} \geq 50^{\circ}\text{C}$ ), нарастват и наблюдаваните различия за трите обекта. Наблюдаваната обратимостта при първата субединица RvH1 бе по-малка отколкото при втората субединица RvH2.

#### II.2.4. Влияние на pH и температурата върху стабилността на ФЕ RvH2-е. Т-pH “Фазова диаграма”

При идентични условия и спазване на същите критерии бяха получени съвсем различни резултати за функционалната единица RvH2-е. При анализиране на промените на елиптичността, като функция на температурата при фиксирани pH-стойности, бе установено наличие на Т-индуцирани промени в широк температурен интервал  $20\text{--}85^{\circ}\text{C}$  (Фиг. 22А), както и при RvH, RvH1и RvH2. Наблюдавани бяха сравнително малки промени на елиптичността  $[\theta]_{222}(T)$  при високи температури (Фиг. 22А), подсказва, че структурните елементи се запазват в основната си част, особено при неутрално pH. За ФЕ RvH2-е не бе установено общо Т-зависимо разгъване на протеина и по всяка вероятност дори при температури над  $80^{\circ}\text{C}$ , протеина запазва "глобулното си състояние" (Фиг. 22А), подобно на нативната молекула RvH (Фиг. 20А).

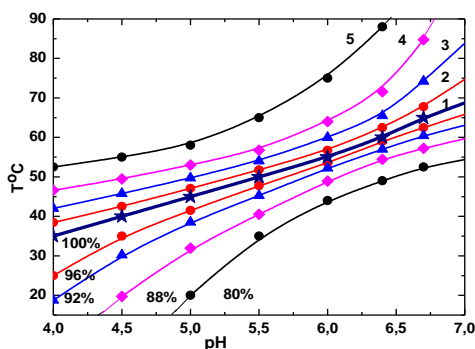


Фиг. 22. А) Влияние на  $T$  върху  $[\theta]_{222}$  на RvH2-е при фиксирани pH-стойности; Б) Влияние на pH върху  $[\theta]_{222}$  на RvH2-е при фиксирани температури.

Комплектът от криви, отразяващи pH-преходите за RvH2-е, представени на графичната зависимост  $[\theta]_{222}/\text{pH}$  (Фиг. 22Б), имат “форма на камбана” с екстремум в интервала pH 5.0-9.0 и несиметрични краища. pH-преходите, (т.е кривите отразяващи киселата и алкална денатурация) са слабо изразени за всички крайни стойности. Представените криви за  $[\theta]_{222}(\text{pH})$ , за RvH2-е (Фиг. 22Б), показват различно поведение в сравнение с получените резултати за нативната молекула RvH и двете изоформи RvH1 и RvH2 (Фиг. 20 А, Б, В). Това вероятно се дължи на

протичането на редица рН-независими процеси. Бе наблюдавано, че кривите отразяващи промените на елптичността  $[\theta]_{222}(\text{pH})$  за RvH2-е в рН-областта 6.5-8.5 (Фиг. 22Б) образуват широко плато при температури между 20-40°C, следователно те са рН-независими за разлика от получените резултати за нативната молекула RvH и RvH1 и RvH2. Отговорни за структурната стабилност на ФЕ RvH2-е в посочената област (рН 6.5-8.5) са наличието на рН-нетитруемите групи на гликопротеина. От друга страна кривите, отразяващи промените на елптичността  $[\theta]_{222}$  в същата рН-област, но при по-високи температури ( $T^{\circ}\text{C} \geq 50^{\circ}\text{C}$ ) са в известна степен рН-зависими, което се дължи на действието на два процеса на йонизация (на карбоксилните и имидазолните групи), с противоположно влияние върху левия (L) и десен (R) край на елптичността  $[\theta]_{222}(\text{pH})$  (Фиг. 22 А, Б).

Получената Т-рН фазова диаграма (Фиг. 23), отразяваща стабилността и обратимата денатурация на функционалната единица RvH2-е, бе използвана за определяне на зоните, в които процесите на температурно и рН – зависимо разгъване протичат обратимо.



**Фиг. 23.** Т-рН “Фазова диаграма” на функционална единица RvH2-е.

От представената на Фиг. 23, Т-рН фазова диаграма бе установено, че при ФЕ RvH2-е е възможна обратимост от 100-80% в сравнително широк рН-интервал от 5.5-7.0, за разлика от получените резултати за нативната молекула RvH и структурните субединици при идентични условия и спазване на същите критерии (Фиг. 22 А, Б, В).

### II.2.5. Термодинамични характеристики на Т-рН денатурацията на функционална единица RvH2-е

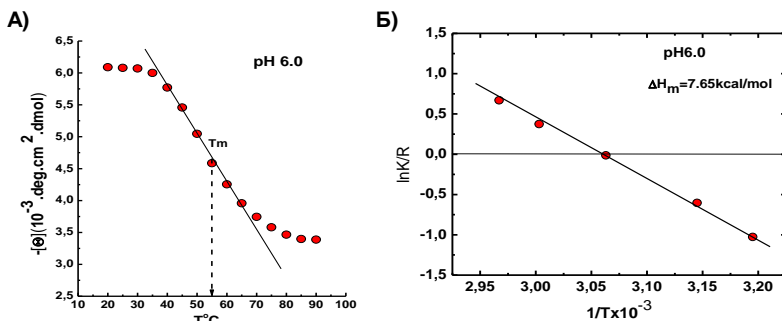
От проведения анализ на кривите, отразяващи влиянието на Т върху елптичността  $[\theta]_{222}$  при различни стойности на рН, бяха изчислени някои термодинамични характеристики на Т-рН денатурация на RvH2-е.

Инфлексната точка на кривите (Фиг. 24А), отразяващи Т-преходите при всяко рН от равновесния интервал в широк температурен



диапазон 20-85°C, бе използвана за определяне на  $T_m$  както е показано на Фиг. 24А.

Използвайки уравнението на Van't Hoff, от наклона на правите  $\partial(\ln K/R)$  към  $\partial(1/T)$  (Фиг. 25Б) бе определена ефективната енталпия на денатурация (van't Hoff's)  $\Delta H_{vH}$ , която е равна на изчислената calorиметричната енталпия  $\Delta H_{cal}$ .

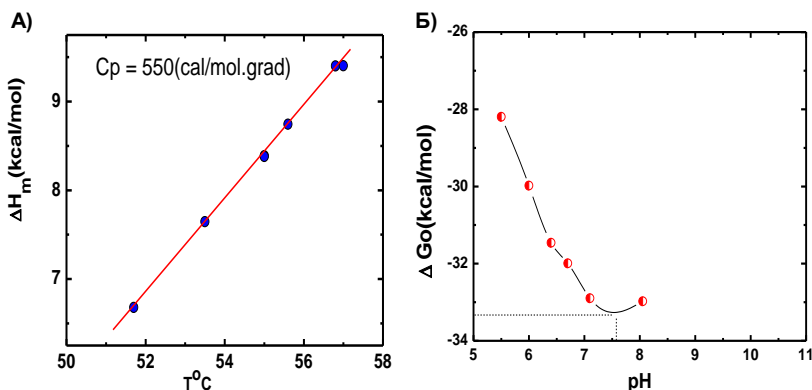


**Фиг. 24. А)** Определяне на  $T_m$  от кривата, отразяваща  $T$ -прехода при pH6.0;**Б)** Определяне на ефективната енталпия на денатурация ( $\Delta H_m$ ), при pH6,0, използвайки уравнението на Van't Hoff.

От направените изчисления бе установено, че областта на обратимост за функционалната единица RvH2-е е по-голяма от определената въз основа на  $T$ -рН фазова диаграма (рН 5.5-7.0) и тя бе разширена до рН 8.0 (Фиг. 24 А, Б). Доказателство за пълната обратимост на процеса на денатурация на ФЕ в рН-интервала от 5.5 до 8.0 бе фактът, че експериментално определените стойности за енталпията на денатурация  $\Delta H_m$  ( $\Delta H_{vH}$ ) лежат на една права от наклона, на която бе изчислен ефективният температурен капацитет при постоянно налягане ( $\Delta C_p = \partial \Delta H_{vH} / \partial T$ ).

На графиката на Фиг. 25А е представен средния топлинен капацитет ( $C_p$ ) на процеса на денатурация, определения за равновесния рН-интервал 5.5 - 8.0. Сравнително високата стойност на  $\Delta C_p = 550 \text{ cal/mol.grad}$  е в съответствие с хидрофобната природа и експонирането на повече хидрофобни АК-остатъци при разгъването на протеина при денатурация.

Определената бе свободната енергия на Гибс в равновесния рН-интервал 5.5-8.0, при екстраполация  $T = 298 \text{ K}$ . Както е показано на Фиг. 25 Б, построената крива има сложна форма с орицателен екстремум при рН 7.6, което показва, че структурната стабилност на обратима  $T$ -денатурация е рН-зависима. Експериментално определените стойности за Гибсовата енергия ( $\Delta G^0$ ) съвпадат с теоритично изчислените.



**Фиг. 25.** А) Определяне на специфичния топлинен капацитет ( $C_p$ ) на процеса на денатурация за равновесния интервал pH 5.5-9.0; Б) Крива на Свободната енергия на Гибс в pH-интервала 5.5-8.0

След преизчисляването на  $\Delta H^\circ$  от  $\Delta H_m$  за всяка фиксирана pH-стойност при стандартна температура 298K в разширената pH-област 5.5-9.0, бе установено, че  $\Delta H^\circ$  е pH-независима и със стойност около 8,0 kcal/mol, което е характерно за процеси на хидрофобно пренареждане на четвъртичната структура.

В условия на доказана обратимост бяха определени основните термодинамични величини характеризиращи структурната стабилност на ФЕ RvH2-e, като: температурите на «топене» ( $T_m$ ), промяната на топлинния капацитет ( $\Delta C_p$ ), на енталпията ( $\Delta H_m$ ) и на ентропията ( $\Delta S_m$ ) в областта на равновесие и при стандартна температура 25 °C ( $\Delta H^\circ$  и  $\Delta S^\circ$ ), както и Гибсовата енергия ( $\Delta G^\circ$ ). Получените данни са представени в Таблица 6.

**Таблица 6.** Термодинамични параметри, определени за ФЕ RvH2-e за равновесния интервал pH 5.5-9.0

pH	$T_m$ (K)	$\Delta H_m$ (kcal/mol)	$\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$\Delta G^\circ$ (kcal/mol)
5,5	324,7	6,68	-8,01	-28,199
6,0	326,5	7,65	-8,03	-29,979
6,4	328,0	8,39	-8,11	-31,460
6,7	328,6	8,74	-8,03	-31,994
7,1	329,5	9,38	-7,95	-32,901
7,5	330,0	9,40	-8,19	-33,406
8,0	329,8	9,40	-7,93	-33,194

## Следователно:

- Наблюдаваната разликата в стабилността на цялата молекула и структурните субединици отразява влиянието на четвъртичната структура, докато разликата в стабилностите на субединиците и една функционална единица отчита влиянието на третичната структура.
- Влиянието на въглехидратната структура върху стабилитетните характеристики на нативната молекула RvH, структурните субединици и една функционална единица бе индиректно установено чрез използване на кръгов дихроизъм и прилагането на термодинамичния подход за оценка на стабилността.
- Въглехидратната структура оказва влияние върху стабилността на нативната молекула RvH и структурните субединици, но не влияе върху стабилността (pH-T фазови диаграми) на една изолирана функционалната единица, тъй като е разположена на повърхността на функционалната единица и не участва във взаимодействие с АК остатъци на съседните функционални единици.

## III. Антивирусна активност

Установено е, че хемоцианините проявяват антивирусен и антитуморен ефект, които се дължат на тяхното високо въглехидратно съдържание и специфичен монозахариден състав. При сравняването на олигозахаридните структури на H1H, RvH и KLN са установени специфични различия, което се оказва от особен интерес за антигенните им свойства.

Ето защо, нативния хемоцианин RvH, гликозилирана (RvH-c) и негликозилирана (RvH-b) ФЕ-ци бяха *in vitro* тествани срещу репликацията на Полиовирус, тип 1 (LSc-2ab), Коксакивирус B1 (CV-B1) и Респираторен синцитиален вирус (RSV) за определяне на антивирусната активност.

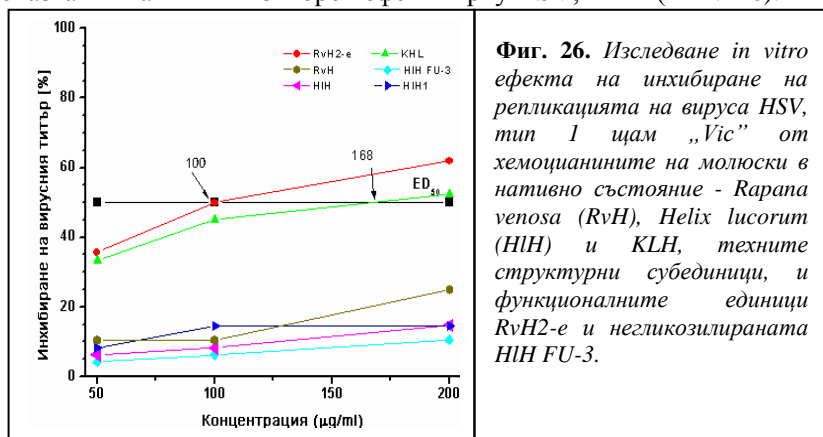
От проведените експерименти за първи път бе установено, че ФЕ на хемоцианин от молуски притежава антивирусна активност. Единствено гликозилираната ФЕ RvH-c бе показала антивирусна активност срещу репликацията на RSV, за разлика от нативната молекула RvH и негликозилираната функционална единица RvH-b.

Наблюдаваният антивирусен ефект на гликозилираната ФЕ RvH-c срещу RSV, насочва към предположение за участие на въглехидратните вериги в антивирусните свойства на хемоцианините.

За потвърждаване на антивирусните свойства на хемоцианини от молуски и значението на тяхното въглехидратно съдържание и монозахариден състав, бяха подбрани хемоцианини със специфични различия в олигозахаридните им структури, като от *R. venosa*, *H. lucorum*

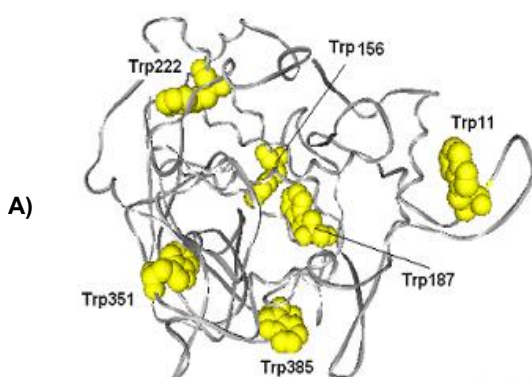
и KLH, както и техните гликозилирани и негликозилирани ФЕ-ци. И трите вида хемоцианин са хетерогенно гликозилирани, притежават високоманозен тип структури, както и гликани, свързващи ксилозен остатък. При НН, преобладаващи са метилирани гликани, а при KLH е установено и специфично разклонение с крайна галактоза (Gal), което е свързано към  $\beta$ -1,3-GalNAc.

От проведените изследвания бе установено, че най-ефективен инхибитор на Херпес симплекс вирус, тип 1, щам „Vic” (HSV-1) бе гликозилираната ФЕ RvH2-e. Прибавена в концентрация от 200  $\mu\text{g/ml}$ , RvH2-e инхибира растежа на HSV-1 вируса с 62%. Приложен в същата концентрация KLH, потиска вирусната репликация с 52%. Установено бе, че нативната молекула на RvH, НН, структурната субединица RvH1, както и на негликозилираната форма на ФЕ от НН (НН FU-3) не показват никакъв инхибиторен ефект върху HSV, тип 1 (Фиг. 26).



Наблюдаваният антивирусен ефект на гликозилираната ФЕ RvH2-e срещу репликацията на HSV, тип 1 бе още едно потвърждение на предположението за връзка между въглехидратните структури и антивирусните свойства на хемоцианините.

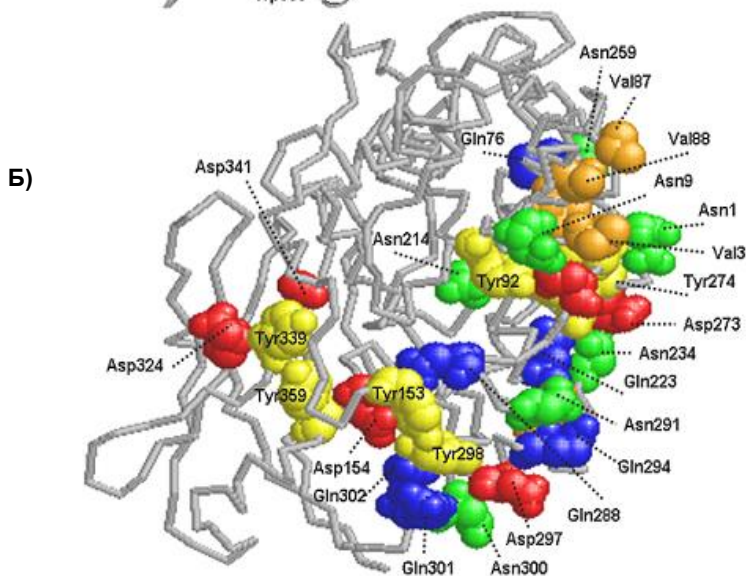
Обяснение на антивирусния ефект на гликозилираната ФЕ RvH2-e бе направено въз основа на предположение за взаимодействия между въглехидратните вериги на ФЕ RvH2-e с АК остатъци на гликопротеини от вируса, както и на взаимодействие между с АК остатъци от повърхността на ФЕ и въглехидратните вериги на гликопротеини от вируса, отговорни за неговата репликация. Девет от единадесетте гликопротеина в HSV-тип 1 са добре изучени. Установено е, че гликопротеин G-2 (gG-2) е отговорен за вирусната репликация и притежава четири N-свързани центъра на гликозилиране.



**Фиг. 27.** 3-D - модел на функционална единица RvH2-е.

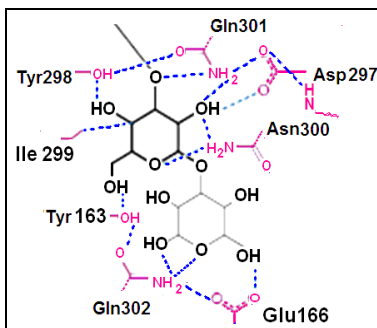
**А)** Шестте триптофилови остатъка са представени в жълто.

**Б)** Аминокиселинните остатъци, включени в дуповете са показани в синьо и зелено.



От първичната структура на функционалната единица RvH2-е от хемоцианин RvH е известно, че тя притежава 6 триптофилови остатъка (Фиг. 28А), около 18 тирозинови и няколко хистиридинови остатъка, които вероятно са включени в образуването на комплекса между HSV-тип 1 и RvH2-е (Фиг. 27Б).

Въз основа на данните от тези изследвания, инхибиращият ефект на RvH2-е по аналогия може да бъде обяснен с Ван-дер-Ваалсови взаимодействия между въглехидратните остатъци на ФЕ RvH2-е и HSV - тип 1, както и с някои групи от аминокиселинни остатъци от полипептидните вериги на RvH2-е и HSV-тип 1 (Фиг. 28).



**Фиг. 28.** Схема на водородните връзки и Ван-дер-Ваалсови взаимодействия между RvH2-е и HSV-тип 1, предположени по аналогия, на въглехидрат-свързващия домен от лектин 7 от *Narcissus psuedonarcissus* (NPL7), с Man  $\alpha(1-3)$  Man66 (PDB ID 1npl). Манозният остатък в главния „свързващ джоб“ е показан с удебелени линии и със съответните водородни връзки.

Представените резултати, получени от изследванията на въглехидратната структура на хемоцианин RvH разкриват, че той е хетерогено гликозилиран, като преобладават гликани от високоманозен тип. Но вероятно, в структурните субединици, както и в цялата молекула, повечето въглехидратни вериги са “погребани”. По тази причина те не могат да участват във Ван-дер-Ваалсови взаимодействия с аминокиселинните остатъци от полипептидни вериги от вируса, поради което не се наблюдава антивирусен ефект. За разлика от тях въглехидратните вериги на ФЕ RvH2-е биха могли да взаимодействат със специфични области от гликопротеин G-2 (gG-2) от HSV-вируса, посредством Ван-дер-Ваалсови взаимодействия и водородни връзки със специфични аминокиселинни остатъци. Няколко поредици от такива АК остатъци могат да бъдат идентифицирани по повърхността на функционалната единица RvH2-е, които могат да бъдат включени във взаимодействието между RvH2-е и HSV, тип 1 – вируса.

Представените от нас резултати убедително доказват, че хемоцианинът от *R. venosa* представлява интересен гликопротеин, поради четвъртичната си структура и наличието на сложни въглехидратни вериги с разклонената антенна структура, съдържащи разнообразни монозахаридни остатъци.

Охарактеризираната въглехидратна структура на хемоцианин от *R. venosa* има фундаментално значение, тъй като разширява познанията относно многообразието на N-гликанови структури на хемоцианини от моллюски. Изучаването на влиянието на въглехидратните структури върху стабилността и биологичната активност на хемоцианините е от интерес за прилагането им в бъдещи изследвания за рекомбинантна продукция на гликани за диагностика или терапия.

## ИЗВОДИ

1. Разработена е нова методика за изследване на въглехидратната структура на хемоцианини, която включва два основни подхода: 1) изолиране и анализиране на гликани и 2) изолиране и анализиране на гликопептиди. Тази методика дава възможност да бъде определена както олигозахаридната структура, така и гликозилираните центрове.
2. Чрез различни маспектрометрични методи и техники са определени въглехидратните структури от високоманозен и комплексен вид на 25 гликани, изолирани от RvH1 и 28 гликани от RvH2, като и са установени центровете на гликозилиране.
3. За първи път е открит нов важен клас N-гликани за хемоцианините, включващ хексууронова киселина и GlcNAc остатък, свързани към вътрешен фукозен остатък.
4. От проведените изследвания с трансмисионна електронна микроскопия е установено различие в стабилността и реасоциацията на нативната молекула и на структурни субединици (RvH1 и RvH2), които зависят от рН на средата и концентрацията на  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  йони.
5. Установено е влиянието на въглехидратната структура върху реасоциацията на структурните субединици, което води до образуване на дълги и стабилни тубули при RvH1, докато при RvH2 се образуват дидекамери и къси мултидекамери. Това поведение може да бъде обяснено със специфичното разположение на въглехидратните вериги на повърхността на дидекамера на RvH2, което затруднява формирането на дълги мултидекамери и тубули.
6. Влиянието на въглехидратната структура върху стабилитетните характеристики на нативната молекула RvH, структурните субединици и една функционална единица е установено индиректно чрез кръгов дихроизъм и прилагането на термодинамичния подход за оценка на стабилността.
7. Показано е, че процесите на температурно- и рН-зависимо разгъване на нативната молекула RvH и структурните субединици са обратими в много тесен рН-Т интервал, за разлика от ФЕ RvH2-е, където е

установен по-широк интервал на обратимост. В условия на доказана обратимост са определени основните термодинамични величини, характеризиращи структурната стабилност на ФЕ RvH2-е.

8. Между контактуващите гликанови вериги вероятно са налице силни и специфични заряд-диполни взаимодействия. В слабо кисела среда веригите на хемоцианина се превръщат в агломерат, поради факта, че повечето от олигозахаридните вериги са протонирани и по този начин намаляват взаимодействията на отблъскване.
9. Показано е, че въглехидратната структура оказва влияние върху стабилността на нативната молекула RvH и структурните субединици, но не влияние върху стабилитетните характеристики на една отделна функционална единица (RvH2-е), тъй като се намира на повърхността на ФЕ.
10. За първи път е показан инхибиращ ефект на гликозилираната ФЕ RvH2-е срещу репликацията на HSV- тип 1, докато такъв ефект не се наблюдава при нативната молекула и двете структурни субединици. Това може да бъде обяснено с Ван-дер-Ваалсови взаимодействия и образуване на водородни връзки между въглехидратните остатъци на RvH2-е и HSV-тип 1.



## ПРИНОСИ

1. Разработена е високо ефективна методика за определяне и идентифициране на сложни въглехидратни структури на хемоцианини от молюски с неизвестна или частично известна първична структура.
2. Определена е въглехидратна структура на хемоцианин от *R. venosa*, представена от 53 гликанови структури. Това е достижение с фундаментално значение, тъй като разширява познанията относно многообразието на N-гликанови структури на хемоцианини от молюски, така и с практическо приложение, свързано с бъдещи изследвания на гликаните за диагностика и/или терапия.
3. Обогатена е база данни за въглехидратни структури, като е идентифициран нов важен клас N-гликани за хемоцианините, включващ вътрешен фукозен остатък, свързан с GlcNAc и заместен на две позиции с един N-ацетилхексозаминов остатък и една хексуринова киселина. Това е нов вид структура във въглехидратните вериги на хемоцианини от молюски.
4. За първи път е установено, че гликолизираната ФЕ RvH-с на хемоцианин от молюски RvH притежава антивирусна активност срещу репликацията на RSV.
5. Наблюдаваният антивирусен ефект на гликозилираната ФЕ RvH2-е срещу репликацията на HSV- тип 1 е още едно потвърждение за връзка между въглехидратните структури и антивирусните свойства на хемоцианините. За пръв път е предложен механизъм за обяснение на антивирусния ефект на хемоцианин от молюски.
6. Получената информация за въглехидратната структура и стабилността на нативната молекула, структурните субединици и една функционална единица на хемоцианин от *R. venosa* е основа за обяснение и на други свойства на този гликопротеин, като антивирусен, антитуморен ефект и като имуностимулатор.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА

1. P. Dolashka-Angelova, A. Beck, A. Dolashki, S. Stevanovic, M. Beltramini, B. Salvato, R. Hristova, **L. Velkova**, W. Voelter. (2004) Carbohydrate moieties of molluscan *Rapana venosa* hemocyanin. *Micron* 35, 101–104 (IF 1.464)
2. A. Dolashki, **L. Velkova**, B. Atanasov, R. Hristova, W. Voelter, S. Stevanovic, H. Schwarz, P. Di Muro, P. Dolashka-Angelova. (2008) Reversibility and “pH-T phase diagrams” of *Rapana venosa* hemocyanin and its structural subunits. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784 (11), 1617–1624. (IF 2.223)
3. P. Dolashka-Angelova, B. Lieb, **L. Velkova**, N. Heilen, K. Sandra, L. Nikolaeva-Glomb, A. Dolashki, A. Galabov, J. Van Beeumen, S. Stevanovic, W. Voelter and B. Devreese. (2009) Identification of glycosylated sites in *Rapana venosa* hemocyanin by mass spectrometry and gene sequence, and their antiviral effect. *Bioconjugate Chemistry* 20 (7), 1315–1322. (IF 4.384)
4. P. Dolashka, **L. Velkova**, S. Shishkov, K. Kostova, A. Dolashki, I. Dimitrov, B. Atanasov, B. Devreese, W. Voelter, J. Van Beeumen. (2010) Glycan structures and antiviral effect of the structural subunit RvH2 of *Rapana* hemocyanin. *Carbohydrate Research* 345 (16), 2361–2367. (IF 2.025)
5. **L. Velkova**, P. Dolashka, A. Dolashki, W. Voelter, B. Atanasov. (2010) Structural analysis and molecular modeling of the RvH2-e functional unit of *Rapana venosa* hemocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804, 2177–2182. (IF 2.480)

## УЧАСТИЕ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ

1. **L. Velkova**, D. Todorov, I. Dimitrov, S. Shishkov, B. Atanasov, P. Dolashka-Angelova (2009) Bulgarian-Japanese Symposium “Genomics and Proteomics in Personalized Medicine”, 19–20 March 2009, Sofia, Bulgaria. P 2.11. *Rapana venosa* hemocyanin with antiviral activity.
2. L. Yossifova, **L. Velkova**, I. Iliev, I. Dimitrov, V. Moshtanska, S. Zacharieva, P. Dolashka-Angelova (2009) Bulgarian-Japanese Symposium “Genomics and Proteomics in Personalized Medicine”, 19–20 March

- 2009, Sofia, Bulgaria. P 2.9. *Helix vulgaris* hemocyanin: structure and anticancer activity.
3. B. Bakalov, S. Shishkov, D. Todorov, K. Kostova, **L. Velkova**, P. Dolashka-Angelova (2009) 6<sup>th</sup> Balkan Congress of Microbiology - Microbiologia Balkanica 2009 & 4<sup>th</sup> Congress of Macedonian Microbiologists. Inhibition of Herpes simplex virus replication by hemocyanins *in vitro*.
  4. **L. Velkova**, I. Iliev, I. Dimitrov, L. Yossifova, V. Moshtanska, S. Zacharieva, P. Dolashka-Angelova (2009) XI Anniversary Scientific Conference “Biology –traditions and challenges”, 27–29 May 2009, Sofia, Bulgaria. MB 17. Isolation of molluscan hemocyanin *Helix vulgaris* with antitumor effect on Guerin ascites tumor-bearing animals.
  5. **L. Velkova**, D. Todorov, I. Dimitrov, S. Shishkov, B. Atanasov, P. Dolashka-Angelova. (2009) XI Anniversary Scientific Conference “Biology –traditions and challenges”, 27 – 29 May 2009, Sofia, Bulgaria. MB 13. *Rapana venosa* hemocyanin with antiviral activity.
  6. **L. Velkova**, P. Dolashka-Angelova, W. Voelter, B. Atanasov. XI Anniversary Scientific Conference “Biology –traditions and challenges”, 27 – 29 May 2009, Sofia, Bulgaria. MB 15. Thermodynamic and electrostatic analysis of functional unit RvH2-e of *Rapana* Hemocyanin.
  7. O. S. Boyanova, P. Dolashka-Angelova, L. Yosifova, S. Zaharieva, **L. Velkova**, I. Dimitrov, D. Toncheva (2010) European Human Genetics Conference, 12-15 June 2010, Gothenburg, Sweden. P06.015. Testing the antitumor effect of hemocyanins on genomics and proteomics level.
  8. **L. Velkova**, A. Dolashki, S. Shishkov, P. Dolashka-Angelova, (2010) VIII Научна конференция по химия, 18-19 юни 2010 г. гр. Копривщица, България. P-77. Complete oligosaccharide structure of *Rapana venosa* hemocyanin.
  9. **L. Velkova**, L. Nikolaeva-Glomb, L. Mukova, A. Dolashki, P. Dolashka, A. Galabov, (2011) 2<sup>4th</sup> International Conference on Antiviral Research (ICAR), May 8-11<sup>th</sup>, 2011, Sofia, Bulgaria. Antivir. Res., 90, (2), A 47, abstr. 94. Antiviral effect of molluscan haemocyanines.

## ЦИТАТИ

Забелязаните цитати на публикациите, включени в дисертационния труд са: общо 15 цитата.

Dolashka-Angelova P., Beck A., Dolashki A., Beltramini M., Stevanovic S., Salvato B., Hristova R., **Velkova L.**, Voelter W. Carbohydrate moieties of molluscan *Rapana venosa* hemocyanin. *Micron* 35 (2004), 101–104.

1. Kurtz D.M.Jr. Iron Proteins with Dinuclear Active Sites Encyclopedia of inorganic chemistry. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd. (2006) - Wiley Online Library.
2. Harvey D.J. Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update for 2003–2004. *Mass spectrometry reviews* 28 (2009), 273–361.
3. Gutternigg M., Bürgmayr S., Pörtl G., Rudolf J., Staudacher E. Neutral N-glycan patterns of the gastropods *Limax maximus*, *Cepaea hortensis*, *Planorbarius corneus*, *Arianta arbustorum* and *Achatina fulica*. *Glycoconj J.* 24 (2007), 475–489.
4. Zunino, S.A. Participatio de receptores tipo-lectina en la inmunogenicidad y en el efecto antitumoral de hemocianinas de mollusco en mamíferos. *Niversidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas* (2012).

Dolashki A., **Velkova L.**, Atanasov B., Hristova R., Voelter W., Stevanovic S., Schwarz H., Di Muro P., Dolashka-Angelova P. Reversibility and “pH-T phase diagrams” of *Rapana venosa* hemocyanin and its structural subunits. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784 (2008), 1617–1624

1. Varshney A., Ahmad B., Rabbani G., Kumar V., Yadav S., Khan R.H. Acid-induced unfolding of didecameric keyhole limpet hemocyanin: detection and characterizations of decameric and tetrameric intermediate states. *Amino acids* 39(3) (2010), 899–910.
2. Tang B., Wang Y., Zhang D., Zhang H. Fluorescence properties and conformational stability of the hemocyanin from Chinese mitten crab *Eriocheir japonica sinensis* (Decapoda, Grapsidae). *J. Molecular Structure* 920 (2009), 454–458.
3. Spinozzi F., Mariani P., Mičetić I., Ferrero C., Pontoni D., Beltramini M. Quaternary Structure Heterogeneity of Oligomeric Proteins: A SAXS and SANS Study of the Dissociation Products of Octopus vulgaris Hemocyanin. *PLoS one, PEER-REVIEWED* (2012) - dx.plos.org

Dolashka-Angelova P., Lieb B., **Velkova L.**, Heilen N., Sandra K., Nikolaeva-Glomb L., Dolashki A., Galabov A., Van Beeumen J., Stevanovic S., Voelter W., Devreese B. Identification of glycosylated sites in *Rapana*

venose hemocyanin by mass spectrometry and gene sequence, and their antiviral effect. *Bioconjugate Chemistry* 20 (7) (2009), 1315–1322.

1. Manubens A., Salazar F., Haussmann D., Figueroa J., Del Campo M., Martínez P.J., Huaquín L., Venegas A., Becker M. Concholepas hemocyanin biosynthesis takes place in the hepatopancreas, with hemocytes being involved in its metabolism. *Cell and Tissue Research, Springer* 342 (2010), 423–435.
  2. Trabalón M., Carapito C., Voinot F., Martrette J.-M., Van Dorsselaer A., Gilbert C., Bertile F. Differences in Brachypelma albopilosa (Theraphosidae) hemolymph proteome between subadult and adult females. *J. Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 313A (2010), p. 651–659.
  3. Guo D., Wang H., Zeng D., Li X., Fan X., Li Y. Vaccine potential of hemocyanin from *Oncomelania hupensis* against *Schistosoma Japonicum*. *Parasitology International* 60 (2011), 242–246.
  4. Del Campo M., Arancibia A.S., Nova E., Salazar F., Gonzaleza A., Moltedo B., De Ioannes P., Ferreira J., Manubens A., Becker M.I. Hemocianinas, una herramienta inmunológica de la biomedicina actual. *Revista Med Chile* 139 (2011), 236–246.
  5. Varshney A., Ahmad B., Rabbani G., Kumar V., Yadav S., Khan R.H. Acid-induced unfolding of didecameric keyhole limpet hemocyanin: detection and characterizations of decameric and tetrameric intermediate states. *Amino acids* 39(3) (2010), 899–910.
- Dolashka P., **Velkova L.**, Shishkov S., Kostova K., Dolashki A., Dimitrov I., Atanasov B., Devreese B., Voelter W., Van Beeumen J. Glycan structures and antiviral effect of the structural subunit RvH2 of *Rapana* hemocyanin. *Carbohydrate Research* 345(16) (2010), 2361–2367.
1. Guo D., Wang H., Zeng D., Li X., Fan X., Li Y. Vaccine potential of hemocyanin from *Oncomelania hupensis* against *Schistosoma Japonicum*. *Parasitology International* 60 (2011), 242–246.
  2. Arancibia S., Salazar F., Becker M.I. Hemocyanins in the Immunotherapy of Superficial Bladder Cancer. *From Basic Science to Robotic Surgery* (2011).
- Velkova L.**, Dolashka P., Dolashki A., Voelter W., Atanasov B. Structural analysis and molecular modeling of the RvH2-e functional unit of *Rapana venosa* hemocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804 (2010), 2177–2182.
1. Varshney A., Ahmad B., Rabbani G., Kumar V., Yadav S., Khan R.H. Acid-induced unfolding of didecameric keyhole limpet hemocyanin: detection and characterizations of decameric and tetrameric intermediate states. *Amino acids* 39(3) (2010), 899–910.

**Structure and function of carbohydrate chains of hemocyanin,  
isolated from marine snail *Rapana venosa***

ANNOTATION

Hemocyanins act as oxygen-transporting glycoproteins in many arthropod and mollusc species. There are large differences in the molecular masses, structure, and carbohydrate content and monosaccharide composition.

Molluscan hemocyanins (Hcs) have recently received particular interest due to their significant immunostimulatory properties. This is mainly related to their high carbohydrate content and highly specific monosaccharide composition. Although it is generally accepted that the oligosaccharide constituents of Hcs are of prime significance for its antigenicity and biomedical properties, knowledge on the carbohydrate structures of these glycoprotein are still incomplete. Now we analysed the oligosaccharides and the carbohydrate linkage sites of the *Rapana venosa* hemocyanin (RvH).

The oligosaccharide structures of the structural subunits RvH1 and RvH2 of *Rapana venosa* hemocyanin (RvH) were studied by sequence analysis of glycans using MALDI-TOF-MS and tandem mass spectrometry on a Q-Trap mass spectrometer after enzymatical liberation of the N-glycans from the polypeptides. Our study revealed a highly heterogeneous mixture of glycans of the compositions Hex<sub>0-9</sub> HexNAc<sub>2-4</sub> Hex<sub>0-3</sub> Pent<sub>0-3</sub> Fuc<sub>0-3</sub>. A novel type of N-glycan, with an internal fucose residue connecting one GalNAc(β1-2) and one hexuronic acid, were detected. A glycan with the same structure but with two deoxyhexose residues was observed as a double charged ion. Several site-occupancies were subsequently elucidated by precursor ion scanning of the intact glycopeptides using the Q-trap-LC/MS and Nanoflow-ESI mass spectrometry.

Following reports on antiviral properties from arthropod hemocyanin, we conducted a study of antiviral effects of the native molecules of RvH, KLH and *Helix lucorum* hemocyanin (HLH), of their structural subunits, and of the glycosylated functional unit RvH2-e and the non-glycosylated unit RvH2-c on HSV virus type 1 were investigated. Only glycosylated Fu RvH2-e exhibits this antiviral activity. The carbohydrate chains of the Fu are likely to interact with specific regions of glycoproteins of HSV, through van der Waals interactions in general or with certain amino acid residues in particular. Several clusters of these residues can be identified on the surface of RvH2-e. Thus, for the first time, we demonstrate here the inhibitory effect of one glycosylated functional unit of molluscan hemocyanin RvH against viruses.