

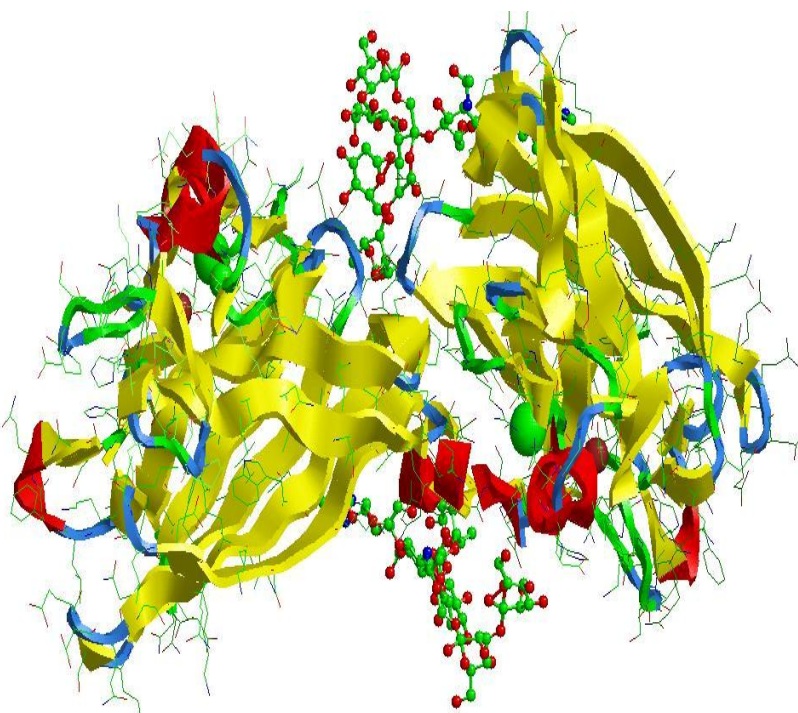
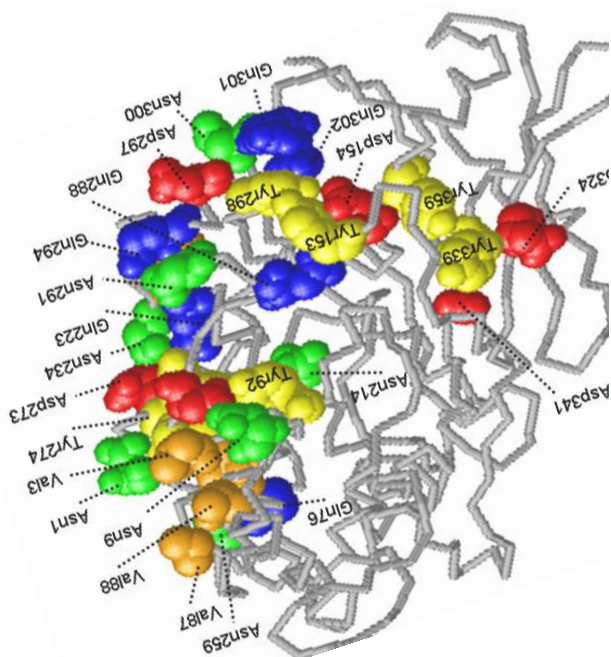
**проф. д-р, инж. ПАВЛИНКА АЛЕКСАНДРОВА ДОЛАШКА**

# **СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ НА МЕДНИ ГЛИКОПРОТЕИНИ, СВЪРЗВАЩИ КИСЛОРОДНИ ФОРМИ**

## **АВТОРЕФЕРАТ**

**за присъждане на научна степен „Доктор на науките“**

Професионално направление 4.2. Химически науки, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“



**СОФИЯ, 2017**

Дисертационният труд е обобщение на 50 научни публикации и съдържа 317 страници, 156 фигури, 28 таблици и 3 схеми. Използвани са 441 литературни източника.

Резултатите са докладвани на 71 научни конференции в чужбина и у нас.

Включените в разработката резултати са получени при изпълнението на научно-изследователски проекти, финансирани от X-1202/2002, K-1302/2003, K-1401/2004; ВУ-Л-310/2007, ТК01-496/2009, НИТС02-019/2011, BG051PO001-3.3.05-0001/2012, BG051PO001 - 3.3.06-0025/2012; ДН 01-14/2016 от **ФНИ** към МОН, **НАТО** (LST.CLG-973968/2003; LST.CLG-978560/2004; CBP.EAP. CLG9805201969/2005), **Германия ДААД** (DLR 001-01/2003; DLR-17/2007); **ДФГ** (DFG-GZ:436 BUL113/149/0-1/2007; DFG-STE1819\_5/2012); **Белгия, FWO** (VS.011.06N/2007; VS.016.09N/2008; VS.2012; и VS.076.18N /2018); от **Италия CNR** (CNR 01/2007; CNR/2009); **Украйна** НТС01-187/2008; **Китай** ДНТС-01/6/2012).

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на заседание на колоквиум ..... при Институт по органична химия с център по фитохимия – БАН (протокол от .....).

**Защитата на дисертационния труд** ще се състои на .....2019 г. от ..... ч на Института по органична химия с Център по фитохимия - БАН, ул. „Академик Георги Бончев“, бл. 9 в зала 111.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на ИОХЦФ-БАН, ул. „Академик Г. Бончев“, бл. 9, ст 206.



проф. д-р, инж. ПАВЛИНКА ДОЛАШКА

# **СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ НА МЕДНИ ГЛИКОПРОТЕИНИ, СВЪРЗВАЩИ КИСЛОРОДНИ ФОРМИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**за присъждане на научна степен „Доктор на науките”**

Професионално направление 4.2. Химически науки, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“

**РЕЦЕНЗЕНТИ:**

## БЛАГОДАРНОСТИ:

Сърдечно благодаря на **проф. д-р, д-р, Волфганг Фьолтер, проф. д-р Мария Ангелова, проф. д-р Борис Атанасов и проф., д-р Юрий Стефановски** за изключителната подкрепа и за полезните съвети, които получавах в нелекия път на научната работа.

Благодарност изказвам на проф. Стефан Стеванович, проф. Ханс Рамензе, проф. Щенсъл, д-р Шварц (Германия), проф. Ван Биимен и проф. Барт Де Врезе (Белгия), проф. Салвато и проф. Тралди (Италия), проф. Нестерова (Украйна), проф. Евангелина Ливаниус, проф. Раня Оранус (Гърция) за предоставената ми възможност да специализирам в модерно оборудваните им лаборатории и за съвместната работа по представените теми в дисертационния труд.

Специални благодарности към моите колеги : гл. асист. д-р Людмила Велкова, гл. асист. д-р Александър Долашки, доц. д-р Румяна Христова, доц. Анна Коюмджиева, проф. Стоян Шишков, доц. Петя Христова, проф. Елена Тодоровска, доц. Цветанка Стефанова, доц. Любомира Гломб, проф. Ренета Тошкова и др., за приятелството и подкрепата в съвместната работа, с които разработихме представените резултати.

Включени в дисертационния труд резултатите са постигнати с финансовата подкрепа на проекти: X-1202/2002, K-1302/2003, K-1401/2004; ВУ-Л-310/2007, ТК01-496/2009, BG051PO001-3.3.05-0001/2012, BG051PO001-3.3.06-0025/2012 и др., финансирани от Фонд за научни изследвания към МОН.

Изключително значение за изследователската ни работа е финансовата подкрепа и от международни проекти: **НАТО** (LST.CLG-973968/2003, LST.CLG-978560/2004, CBP.EAP.CLG9805201969/2005); от **Германия - ДААД** (DLR 001-01/2003; DLR-17/2007) и **ДФГ** (DFG-GZ:436BUL113/149/0-1/2007; DFG-STE1819\_5/2012); **Белгия-FWO**(VS.011.06N /2007; VS.016.09N /2008; (VS.076.18N /2018); **Италия - CNR** (01/2007; 04/ 2009); **Украйна** (НТС01-187/2008); **Китай** (ДНТС-01/6/2012).

Благодаря на семейството и приятелите ми за безусловната подкрепа, обичта, търпението и доверието към мен!

**Благодаря!!!**

## СЪДЪРЖАНИЕ

УВОД	7 - 8
ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	8 - 8
РАЗДЕЛ I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	9 - 11
РАЗДЕЛ II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	11 - 11
РАЗДЕЛ III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	11 - 13
РАЗДЕЛ IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	14 - 25
<b>ГЛАВА IV.1. CU/ZN-СОД - ИЗОЛИРАНЕ И СТРУКТУРНО ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ЕНЗИМА</b>	<b>15 - 18</b>
IV.1.1. Пречистване на Cu/Zn-супероксид дисмутази от гъбични щамове	15 - 15
IV.1.2. Пречистване на Cu/Zn -СОД от дрожди - щам <i>K. marxianus</i> NBIMCC 1984	15 - 16
IV.1.3. Структурна характеристика на пречистените Cu/Zn-СОД-зи	16 - 18
<b>ГЛАВА IV.2. ХЕМОЦИАНИНИ ОТ ВИД ARTHROPODA - ИЗОЛИРАНЕ И СТРУКТУРНО ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ</b>	<b>19 – 21</b>
IV.2.1. Изолиране на хемоцианини от артроподни организми	19 – 19
IV.2.2. Структурна характеристика на хемоцианини от вид Arthropoda	19 – 21
<b>ГЛАВА IV.3. ХЕМОЦИАНИНИ ОТ ВИД MOLLUSCA - ИЗОЛИРАНЕ И СТРУКТУРНО ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ</b>	<b>21 – 27</b>
IV.3.1. Изолиране на хемоцианини от вид Mollusca и изграждащите ги изоформи	22 – 22
IV.3.2. Структурна характеристика на хемоцианини от вид Mollusca	22 – 27
<b>ГЛАВА IV.4. ВЪГЛЕХИДРАТНИ СТРУКТУРИ НА ГЛИКОПРОТЕИНИ - CU/ZN-СОД И ХЕМОЦИАНИНИ</b>	<b>27 - 48</b>
IV.4.1. Въглехидратна структура на Cu/Zn-СОД	27 - 29
IV.4.2. Въглехидратна структура на хемоцианини от вид Arthropoda	29 - 31
IV.4.3. Въглехидратна структура на хемоцианини от вид Mollusca	31 - 48
IV.4.3.1. Въглехидратна структура на хемоцианин от охлюв <i>Rapana venosa</i>	31 - 35
IV.4.3.2. Доказване на нов вид въглехидратна структура в RvH1	35 - 39
IV.4.3.3. Гликозилирани центрове при хемоцианин от <i>R. venosa</i>	39 - 43
IV.4.3.4. Въглехидратна структура на хемоцианин от <i>Helix lucorum</i>	43 - 45
IV.4.3.5. Въглехидратна структура на хемоцианин от <i>H. tuberculata</i>	45 - 47
IV.4.4. Нов метод за анализ на различни олигозахаридни структури	47 - 48
IV.4.4.1. Идентифициране на въглехидратни структури в хемоцианини	47 - 48
<b>ГЛАВА IV.5. ФУНКЦИЯ НА ОЛИГОЗАХАРИДНИТЕ СТРУКТУРИ В КИСЛОРОД-СВЪРЗВАЩИ, МЕДНИ ГЛИКОПРОТЕИНИ</b>	<b>49 - 68</b>
<b>IV.5.1. ФУНКЦИЯ НА ГЛИКАНИТЕ в Cu/Zn--СОД</b>	<b>49 - 50</b>
IV.5.1.1. Влияние на въглехидратната структура върху ензимната активност на Cu/Zn-СОД-зи	49 - 50
IV.5.1.2. Влияние на въглехидратната структура върху конформационна стабилност на Cu/Zn-СОД	50 - 53
<b>IV.5.2. Функция на гликаните в хемоцианини от вид Arthropoda</b>	<b>53 - 56</b>
IV.5.2.1. Участие на гликаните в структурата на хемоцианини от вид Arthropoda	53 - 53
IV.5.2.2. Влияние на въглехидратната структура върху стабилността на хемоцианини	54 - 56
<b>IV.5.3. ФУНКЦИЯ НА ГЛИКАНИТЕ в хемоцианини от вид Mollusca</b>	<b>56 - 68</b>
IV.5.3.1. Участие на гликаните в четвъртичната структура на хемоцианини от вид Mollusca	56 - 58
IV.5.3.2. Участие на гликаните в третичната структура на хемоцианини от вид Mollusca	58 - 61
IV.5.3.3. Влияние на гликаните върху стабилността на молекулата на хемоцианин от вид Mollusca	61 - 65
<b>IV.5.4. Фенолоксидазна активност хемоцианини от охлюви <i>R. venosa</i> и <i>H. vulgaris</i> (<i>H. lucorum</i>)</b>	<b>65 - 68</b>

<b>ГЛАВА IV.6. УЧАСТИЕТО НА ГЛИКАНИТЕ В ТЕРАПЕВТИЧНИЯ ЕФЕКТ НА CU/ZN-СОД И ХЕМОЦИАНИНИТЕ</b>	69 - 72
<b>IV.6.1.</b> Участие на гликаните в потенциаления терапевтичен ефект на Cu/Zn-СОД от <i>H. lutea</i> 103	69 - 70
<b>IV.6.2.</b> Участие на гликаните в потенциаления терапевтичен ефект на изолираните хемоцианини	70 - 72
IV.6.2.1. Хемоцианини от вид Mollusca, като носители на хаптени	70 - 70
IV.6.2.2. Антитуморен ефект на хемоцианини от Вид Mollusca	70 - 73
IV.6.2.3. Антивирусен ефект на изолираните хемоцианини	73 - 74
IV.6.2.4. Антибактериален ефект на изолираните хемоцианини	75 - 76
<b>РАЗДЕЛ V. ИЗВОДИ</b>	77 - 78
<b>РАЗДЕЛ VI. НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b>	78 - 80
<b>РАЗДЕЛ VIII.</b> Списък на научните трудове, включени в дисертационния труд	81 - 84
<b>РАЗДЕЛ IX.</b> Списък на конференциите, на които са представени резултати от дисертационния труд	85 - 109
<b>РАЗДЕЛ X.</b> Списък на забелязаните цитати, свързани с материала по дисертационния труд	91 -108
<b>РАЗДЕЛ XI.</b> Списък на свързани проекти с материала по дисертационния труд	1110-1011
<b>РАЗДЕЛ XII.</b> Списък на патентни предложения	1012 - 113

## УВОД

Олигозахаридите са жизнено необходими вещества в природата, които участват в почти всички биологични процеси на организма. Една от най-важните им функции е като източник на енергия за клетките. Те имат ключова роля при изграждане на клетъчните стени и са отговорни за стабилизиране на структурата на протеините. Олигозахаридите са свързани ковалентно към полипептидните вериги, като оформят комплекси *„Гликопротеини“*, които са едни от най-разпространените протеини в природата.

Голямото разнообразие на гликопротеини се дължи на различия при биосинтеза на полипептидните вериги и посттранслационната им модификация *„гликозилиране“*. Доказани са съществени разлики на свързаните глигани към полипептидните вериги, както и на вида и броя на металните йони, които участват в активния център на гликопротеините. Те са представени със специфични структури при микроорганизми, растения, вируси, безгръбначни и гръбначни организми.

Едни от най-разпространените в природата са медните, свързващи кислородни форми гликопротеини, с различен броя медни йони в активния център, различни въглехидратни структури и механизъм на взаимодействие с кислорода и кислородните радикали.

Обект на изследване в дисертационния труд са два вида медни гликопротеини, **хемоцианини и супероксид дисмутази**, които притежават сложни въглехидратни структури и участват в различни процеси с кислорода и производните му.

Значението на кислорода за живата природа е добре известно, но заедно с отговорната му роля в организма е доказано и вредното въздействие на свободните окси-радикали (СОР). Ензимът **Cu/Zn-супероксид дисмутаза** (Cu/Zn-СОД), който включва един меден йон в активния център, играе ключова роля при елиминиране на супероксидния анионен-радикал ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) и ограничава образуването на водороден пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Ензимите Cu/Zn-СОД-зи изпълняват ключова роля в антиоксидантната защита на организма.

Различна функция е установена за двата медни йона в активния център на гликопротеините, **хемоцианини**, които свързват молекула кислород и я пренасят до клетките в респираторните организми. Хемоцианините са представени в два основни вида (*Mollusca* и *Arthropoda*), които изпълняват еднаква функция, но показват съществени различия в структурната организация и въглехидратно съдържание на молекулата.

Важната функция на обемните и особено гъвкави въглехидратни вериги в СОД-зи и хемоцианините е свързана с предотвратяване достъпа на ензимите до полипептидната им верига, с което предпазват гликопротеина от увреждане. Също те участват в сложни механизми, свързани с функцията на гликопротеините.

През последните години медните гликопротеини намират все по-голямо приложение за лечение на редица заболявания. Ензимът Cu/Zn-СОД се прилага за подобряване на антиоксидантната защита на пациенти със СПИН и ускоряване на възстановителния процес след мозъчни травми. Разширяват се областите на приложение на хемоцианините, като диагностични и антимикробни реагенти при лечение на инфекции или продуценти на антитела и носители на субстрати. Ефектът на редица СОД-зи и хемоцианини също е доказан при терапия на тумор на пикочния мехур, тумор на гърдата, хранопровода и др.

Въпреки представената информация за голямото значение и различните области на прилагане на хемоцианините и Cu/Zn-СОД-зи, все още не са удовлетворени изискванията на пазара за по-широкото им включване в експерименталната и приложна медицина. Това налага откриване и пречистване на нови Cu/Zn-СОД-зи и хемоцианини, и по-задълбочен анализ на връзката между структурата и биологично действие на новите гликопротеини.

Изясняване ролята на олигозахаридните структури има значение за допълване на информацията за структурната организация на гликопротеините и установяване на влиянието им върху функцията. Това ще доведе до разширяване на областите на приложение на медните гликопротеини Cu/Zn-СОД-зи и хемоцианини, свързващи различни кислородни форми.

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

### Монозахариди

Gal	Галактоза	HexA	Хексуронова киселина
GlcA	Глюкуронова киселина	Hex	Хексоза
Man	Маноза		
Fuc	Фукоза		
Xyl	Ксилоза		
GalNAc	N-ацетил-D-галактозамин		
GlcNAc	N-ацетил-D-глюкозамин		
MeHex	Метилирана хексоза		

### Супероксид дисмутази от :

Cu/Zn-HiСОД 110/103	<i>Humicola lutea</i> 110 / 103
Cu/Zn-AnСОД 26	<i>Aspergillus niger</i> 26-физиол. условия
Cu/Zn-AnСОДтс 26	<i>A. niger</i> 26, температурен стрес
Cu/Zn-KmСОД	дрожди <i>K. marxianus</i> NBIMCC 1984

### Хемоциани от :

AcH	<i>Aplysia californica</i>
CaH	<i>Carcinus aestuarii</i>
CcH	<i>Concholepas concholepas</i>
CpH	<i>Cancer pagurus</i>
HiH	<i>Helix lucorum</i>
HaH	<i>Helix aspersa</i> Maxima
HpH	<i>Helix pomatia</i>
HtH	<i>Haliotis tuberculata</i>
KLH	<i>Megatura crenulata</i>
LcH	<i>Lepidochitona cinerea</i>
OdH	<i>Octopus dofleini</i>
PvH	<i>Penaeus vannamei</i>
RvH	<i>Rapana venosa</i>
SoH	<i>Sepia officinails</i>
RtH	<i>Rapana thomasi</i>

### Спектроскопски и Термодинамични параметри

$C_m$	средна концентрация на денатуранта
$K_m$	константа на Михаелис-Ментен
$\Delta C_p$	специфичен температурен капацитет
$\Delta G_{VH}^o$	свободна енергия (Van't Hoff's)
$\Delta H_o$	енталпия при стандартна температура 25 °C
$\Delta H_m$	енталпия на денатурация ( $\Delta H_m \equiv \Delta H_{VH}$ )
$T_c$	критичните температури на термично денатуриране
$\Delta S_m$	ентропия
$k_{cat}/K_M$	ензимната активност
$T_d$	температура на денатурация
$\Delta H_{VH}$	ефективна енталпия на прехода (Van't Hoff's) ( $\Delta H_{exp}$ )
$\Delta S_o$	ентропия при стандартна температура 25 °C
$k_{cat}$	константа Михаелис-Ментен – ензимна специфичност
$K_M$	константата на Михаелис-Ментен – сродство
$T_m$	средна температура на термично денатуриране
$\Delta G_o$	свободната енергия на Гибс при температура 25 °C

### Общи съкращения :

APTS	8-аминопирен-1,3,6-трисулфонат	Ag	антиген
CV-B1	Coxsackievirus B1 - Коксакивирус B1	3-AP	3-аминопиразол
GdnHCl	гуанидин хидрохлорид	As	антисерум
HSV	вирус Херпес симплекс"	kDa	килодалтон
L-Dopa	3,4-Дихидрокси-L-фенилаланин	ESI	електроспрей-йонизация
MS/MS	масспектър на йон от заснет масспектър	m/z	масово число
PCR	полимеразна верижна реакция	SB	стабилизиращ буфер
АКП	аминокиселинна последователност	TAg	тумор-асоцииран антиген
СВП	средно време на преживяемост	АКО	аминокиселинен остатък
2Д –PAGE	двумерна електрофореза	СЛВ	латентното време
TNP-Hc	тринитрофенил-хемоцианинов комплекс	СОР	свободни окси-радикали
ДНК	дезоксирибонуклеинова киселина	Мм	молекулна маса
дНТФ	дезоксинуклеотид трифосфат	ФЕ	функционална единица
кДНК	комплементарна дезоксирибонуклеинова к-на	[M+Na] <sup>+</sup>	единично зареден йон
o-BBV	N,N'-4,4'-bis(benzyl-2-boronic acid)-bipyridinium dibromide	[M+2Na] <sup>2+</sup>	двойно зареден йон
PNGase F	N4-(N-ацетил-β-глюкозамин)аспарагин амидаза F	3TX	заразен с тумор хамстер



## РАЗДЕЛ I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Прегледът на публикуваните научни резултати в 441 литературни източника, относно структурата и функцията на гликопротеини с медни йони в активния център, свързващи кислородни форми, както и потенциалния им терапевтичен ефект, очертава големите постижения на науката в тази област. Интересът на учените непрекъснато се повишава към изследване на тематика, защото много важни въпроси все още са нерешени, които се открояват в направения преглед във всеки раздел от литературния обзор.

### СТРУКТУРА НА МЕДНИ ГЛИКОПРОТЕИНИ, СВЪРЗВАЩИ КИСЛОРОДНИ ФОРМИ

Съществуват редица литературни данни, които представят важни функции на кислород-свързващи протеини, с различен брой медни йони в активния център. Публикувана е информация за кислород-свързващи ензими (**супероксид дисмутази**) с един меден йон в активния център, които участват в първата линия на защитната система на организма срещу оксидативния стрес. Въпреки описаните структурни различия между СОД-зи, те имат много сходни кинетични параметри и катализират реакцията на дисмутация с приблизително еднаква ефективност.

Подробна информация е публикувана за кислород пренасящи медни гликопротеини '**хемоцианини**' от видове *Mollusca* и *Arthropoda*, които включват два медни йона в активния център. Сравнителните анализи показват, че хемоцианините изпълняват еднаква функция, но имат съществени различия в структурата и свойствата. Проведените изследвания очертават някои специфични характеристики за тези гликопротеини, като ензимна фенолоксидазна активност и др.

Хемоцианините и СОД-те са разпространени в различни организми, което обяснява и голямото им разнообразие. Това налага разширяване на изследванията в тази област, като изолиране на супероксид дисмутази и хемоцианини от нови източници, което ще допринесе за разширяване на изследванията и получаване на допълнителна информация за сложната структура на така важните за организмите гликопротеини.

### ВЪГЛЕХИДРАТНИ СТРУКТУРИ НА МЕДНИ ГЛИКОПРОТЕИНИ

Въпреки представената информация, че повечето медни, кислород-свързващи протеини са гликопротеини, то въглехидратната им структура все още не е добре изучена.

Широко разпространените в природата ензими Cu/Zn-супероксид дисмутази се срещат много рядко в природно гликозилирана форма, като са публикувани данни само за няколко гликозилирани СОД-зи. Доказани са олигозахаридните им структури и важната им роля за защитната функция на организма.

Информацията за въглехидратната структура на хемоцианини от артроподи представя пониско въглехидратно съдържание (0.1–2%) и еднообразен монозахариден състав, предимно O-свързани олигозахариди в структурата им. Интерес представляват съществените различия в сложната олигозахаридна структура на хемоцианини от молюски и артроподи, като повечето хемоцианини от клас *Gastropods* са представени като гликопротеини, които свързват голямо разнообразие от въглехидратни структури, характерни и за човека.

Хемоцианините от вид *Mollusca* притежават не само по-сложна четвъртична структура от СОД-те и хемоцианините от артроподи, но и свързват голямо разнообразие от комплексни олигозахаридни структури. Те са характерни със специфичен монозахариден състав и високо въглехидратно съдържание, между 2-9%. Ето защо гликопротеините 'хемоцианини' от молюски са подходящ модел за проследяване на процесите на гликозилиране на представителите на кислород-свързващите, медни гликопротеини.

## **ВЛИЯНИЕ НА ВЪГЛЕХИДРАТНИТЕ СТРУКТУРИ ВЪРХУ БИОЛОГИЧНАТА ФУНКЦИЯ НА ГЛИКОПРОТЕИНИТЕ**

Функционалните свойства на гликопротеините определят основните направления на изследване и областите на приложение. Разнообразието им в природата влияе върху много биологични процеси и важни биологични функции, които изпълняват, като транспортни, имунологични, защитни и др. Представена е подробна информация за връзка на гликозилирането с формирането на структурата и влияние върху физико-химичните свойства на гликопротеините.

За разлика от твърде малко представените данни за природно гликозилирани СОД-зи, гликозилираните хемоцианини са обект на голям научен интерес. Представени са резултати за влияние на въглехидратните им структури върху четвъртичната структура, както и върху физико-химичните им свойства. Публикуваните литературни данни показват важна зависимост между конформационна стабилност на хемоцианините и гликозилирането на протеините. Изказаните различни предположения показват участие на олигозахаридните структури на хемоцианини от молюски във оформянето на четвъртичната им структура и за стабилизиране на цялата молекула. Това налага по-задълбочен анализ на нови хемоцианини от различни източници и проследяване на влиянието на въглехидратните структури върху структурата, стабилността и функцията на хемоцианини от видовете *Mollusca* и *Arthropoda* и супероксид дисмутази.

## **ТЕРАПЕВТИЧЕН ПОТЕНЦИАЛ НА СОД-зи И ХЕМОЦИАНИНИ**

Едни от най-често срещаните гликопротеини, които активно участват в 'защитата' на организма са супероксид дисмутазите. Използването на антиоксидантния ензим в превенцията и лечението на най-разпространените заболявания - туморни заболявания, исхемична болест, грипна инфекция, възпалителни процеси и др. е добре изучено и представено от различни автори. Съвременната наука свързва възникването на много разпространени злокачествени туморни образувания с повишаване на нивото на генерираните  $\cdot\text{O}_2^-$  и намаляване на антиоксидантната защита на организма, което ускорява туморното развитие. Очаква се прилагането на нов подход на редуциране на СОР чрез антиоксиданти, включително и СОД-зи да доведе до развитието на нова концепция в терапията на редица заболявания.

Въпреки че съществуват много доказателства за терапевтичния ефект на СОД-те, все още приложението им е ограничено, поради много малко изолирани природно-гликозилирани СОД-зи и недостатъчно производство на подходящи препарати. Въпреки разработените методи за допълнително гликозилиране на СОД, то по-голямо предимство имат природно гликозилираните СОД-зи, защото не се нуждаят от допълнително гликозилиране и следователно не води до нежелани странични продукти. Също така природно гликозилираните СОД-зи са доказали и по-силен ефекти при терапевтичното приложение.

Другите медни гликопротеини, свързващи кислородни форми са хемоцианините, които също намират широко приложение във фармацевтичната промишленост и в медицината. Те са

добре известни като имуностимуланти и носители на хаптени. Представена е информация за редица важни свойства на хемоцианините и за включването им в антивирусни, антибактериални или антитуморни ваксини.

В резултат на задълбочени анализи, хемоцианините от вид *Mollusca* се смятат за потенциални нови адюванти за имунизация и възможна имунотерапия на някои видове тумори, като добре изследван е антитуморният ефект на KLN при третиране на рак на пикочния мехур. Хемоцианините от вид *Arthropoda* са подходящи за прилагане срещу някои вирусни и бактериални инфекции.

Въпреки доказаните възможности за приложение на СОД-те и хемоцианините, механизмите на тези ефекти все още не са подробно обяснени, като са изказани само предположения. Това налага допълнително изолиране, пречистване и структурно характеризиране на нови гликозилирани СОД-зи и хемоцианини. Резултатите от допълнителни експерименти ще представят по-точна характеристика на връзката между гликозилираната природа и функцията на медните, кислород-свързващи гликопротеини, ще очертаят ролята на въглехидратните структури върху биологичната им активност. Това ще подпомогне представянето на задълбочена информация за терапевтичния ефект и механизма на действие на новите гликопротеини, с което ще се разшири броят на потенциалните фармакологични средства.

## **РАЗДЕЛ II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

**ЦЕЛТА** на представения дисертационен труд е:

**Изолиране и характеризиране на нови, медни гликопротеини, свързващи различни кислородни форми, определяне на структурата на гликаните и влиянието им върху биологичните свойства на протеините.**

За постигане на основната цел в отделните глави на дисертационния труд са поставени и решени следните **ОСНОВНИ ЗАДАЧИ** :

1. Изолиране и пречистване на нови кислород-свързващи гликопротеини от различни природни източници, като Cu/Zn-супероксид дисмутази (Cu/Zn-СОД-зи) и хемоцианини от видовете *Arthropoda* и *Mollusca*.
2. Изследване на структурата и физикохимичните свойства на новите гликопротеини.
3. Определяне на въглехидратните структури на новите Cu/Zn-СОД-зи, хемоцианини от видовете *Arthropoda* и *Mollusca*.
4. Изследване на връзката на въглехидратната структура със сложните структури и функцията на пречистените гликопротеини.
5. Проучване на терапевтичния потенциал на новите гликопротеини и значението на гликозилирания им характер.

## **РАЗДЕЛ III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

### **III.1. ИЗПОЛЗВАНИ МАТЕРИАЛИ**

**III.1.1. Гъбични щамове и дрожди:** Гъбични щамове: *Humicula lutea* 110, *Humicula lutea* 103 и *Aspergillus niger* 26; дрожди : *Kluveromyces marxianus* NBIMCC 1984.

**III.1.2. Организми:** Артроподни организми: рак *Limulus polyphemus* (LpH), *Carcinus aestuarii* (CaeH), *Eriphia verrucosa* (EvH) и скорпион +*Buthus indicus* (Bsi);

Организми от молюски: морски охлюв *Rapana venosa* (RvH), градински охлюви *Helix lucorum* (HlH) и *Helix aspersa* (HaH), мида *Megatura crenulata* (KLH) и *Haliotis tuberculata* (HtH).

## **III.2. ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ**

### **III.2.1. Геномен и протеомен анализ**

**Геномиката** е наука, която изучава гените в клетката, а като следваща стъпка за изучаване на биологичните системи се смята **протеомиката**. Изучаване на структурата, функцията и взаимодействието на протеините в живата природа се нарича "**протеомика**", а определеният пълен набор от тези протеини "**протеом**". Протеомът изразява "състоянието на протеините" в една проба (клетъчна култура, тъкан, организъм) в определен момент от времето. Протеомиката изследва протеома в клетката, който се променя непрекъснато, в отговор на множество фактори на околната среда и на извънклетъчните въздействия. Тя е по-сложна наука от геномиката, защото геномът на организмите е сравнително постоянен, докато за протеома се наблюдава различие между отделните клетки и също в една клетка в различен период от нейното развитие.

### **III.2.2. Гликобиология и гликомика**

Голям интерес в изследванията на живата природа представлява научната област «**гликомика**», която е подразделение на **гликобиологията** и изследва гликома или броят на гликаните (олигозахариди или въглехидрати) в дадена клетка, тъкан или организъм. Не може да бъде разбрана имунологията, неврологията, както и развитието на биологичните процеси в организма или различните заболявания без да е анализирана гликобиологията на организма.

**Гликобиологията** е насочена към изучаване на структурата, биологичния синтез и биологична роля на гликаните, които са неразделна част от живите организми. Тя обхваща пълно изследване на свободните олигозахариди или свързаните в сложни комплексни структури (т.е. свързани в сложни молекули - гликопротеини и гликолипиди).

### **III.2.3. Масспектрометрични анализи**

Приложението на масспектрометрията за определяне на молекулните маси и аминокиселинна последователност (АКП) на протеини и пептиди представлява ядрото на протеомиката и е един от най-широко използваните методи за анализ на биомолекули, пептиди и протеини. Използваните масспектрометри за анализи на представените в този дисертационен труд пречистени нови протеини, ензими и гликопротеини са MALDI-TOF-TOF (time of flight) (време на полет), LC/ESI-MS, LC-Q-trap-MS/MS и нано-ESI-MS и др..

Определянето на гликани и гликопептиди е проведено с Q-trap система Absciex 4000 Q-trap масспектрометър (Applied Biosystems), снабден с наноспрей йонен източник (Proxeon, Odense, Denmark), тандем масспектрометър (Q-TOF; Micromass, Manchester, United Kingdom), снабден с нано-ESI, с хибриден квадруполен анализатор.

**III.2.4. Пречистване и структурно характеризиране на Cu/Zn-СОД-зи и хемоцианини от видовете *Arthropoda* и *Mollusca*.**

**III.2.5. Спектрофотометрични анализи за определяне на структурата и свойствата на гликопротеините Cu/Zn-СОД-зи и хемоцианини чрез:**

- Определяне на първичната структура на протеините след хидролиза с химотрипсин и

трипсин и анализ на фрагментите чрез Едманово разграждане и MALDI-MS/MS.

- Определяне на четвъртичната структура на протеините чрез ПАГЕ, ТЕМА с микроскоп „Philips® CM10, тандем-масспектрометричен анализ и др.

### **III.2.6. Определяне на въглехидратни структури на СОД-зи и хемоцианини :**

- Определяне на структурата на гликаните в гликопротеините;
- Разработване на нов подход и определяне на гликозилираните центрове след  $^{18}\text{O}$ -белязване на гликопептидите и чрез генно фрагментиране.
- Разработване на нов метод за анализ на олигозахаридни структури на хемоцианини - Идентифициране на въглехидратните структури след титруване на N,N'-бис-(бензил-2-боронова киселина)-[4,4']бипиридин дибромид (*o*-BBV) комплекс.

### **III.2.7. Определяне на функцията на гликаните в медните гликопротеини:**

Влиянието на въглехидратната структура върху конформационната стабилност на Cu/Zn-СОД-зи и хемоцианините е проследено чрез кръгов дихроизъм (КД), с Jasco J-720 Дихрограф (Jasco, Токио, Япония), като за оценка на ефективните термодинамични характеристики на гликопротеините са приложени два подхода:

- Проследяване на рН-зависимата топлинна денатурация - чрез елиптичността  $[\Theta]_{222}$ , като функция на температурата при различни стойности на рН;
- Проследяване на Т-зависима рН-денатурация - чрез елиптичността  $[\Theta]_{222}$ , като функция на рН, при различни стойности на температурата;
- Определяне на термодинамичните параметри на Cu/Zn-СОД-зи и хемоцианините.

### **III.2.8. Превръщане на хемоцианините в ензими с фенол-оксидазна активност.**

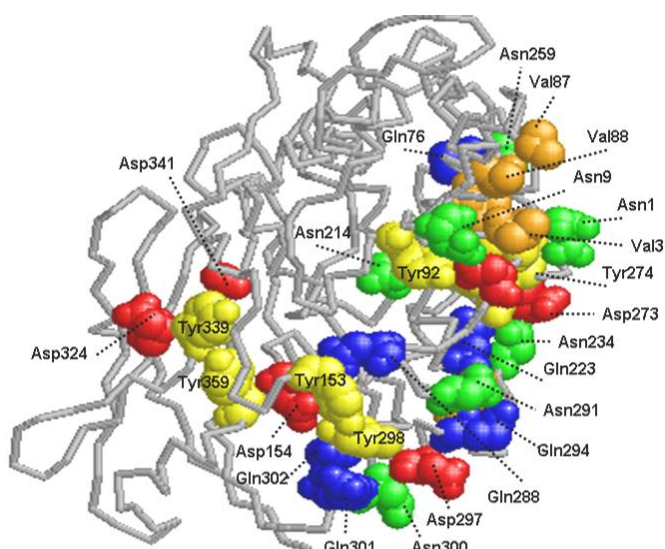
### **III.2.9. Определяне на потенциалния терапевтичен ефект и участието на гликаните на Cu/Zn-СОД-зи и хемоцианини :**

- Проследяване на антитуморния и антивирусния ефект на Cu/Zn-СОД от *H. lutea* 103 (Cu/Zn-НІСОД) срещу тумор на Graffi в хамстери;
- Определяне на ефекта на хемоцианините върху имунотерапия и имунопрофилактика на тумор на Graffi и асцитен тумор на Guerin;
- Определяне на ефекта на хемоцианините при терапия на тумор на пикочния мехур. Сравнителен анализ на антитуморния ефект на хемоцианините чрез 2Д-ПАГЕ;
- Определяне на антивирусния ефект на изолираните хемоцианини върху репликацията на различни вируси - Полио вирус - вид 1 (LSc-2ab), CV-B1, RSV и HSV-тип 1;
- Определяне на антибактериалния ефект на изолираните хемоцианини срещу различни бактериални щамове: Грам<sup>+</sup> и Грам<sup>-</sup> бактериален щам - (Dolashka et al., 2015a;b, 2016).

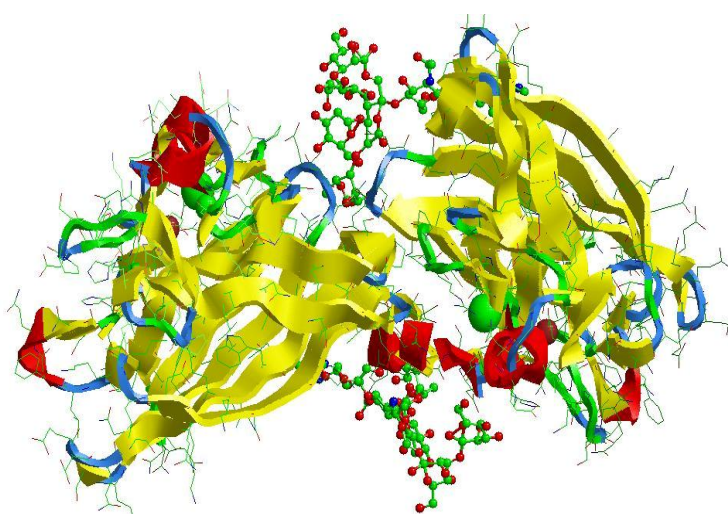
# РАЗДЕЛ IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Голямото разнообразие на природни медни гликопротеини, които участват в различни реакции с кислорода и производни, винаги е било актуален обект с повишен научни интерес, който особено се засили през последните години. Представеният дисертационен труд предоставя информация за структурата и свойствата на нови гликопротеини, свързващи различни кислородни форми, които включват в активния център :

- един меден йон - Cu/Zn-СОД-зи
- два медни йона – хемоцианини

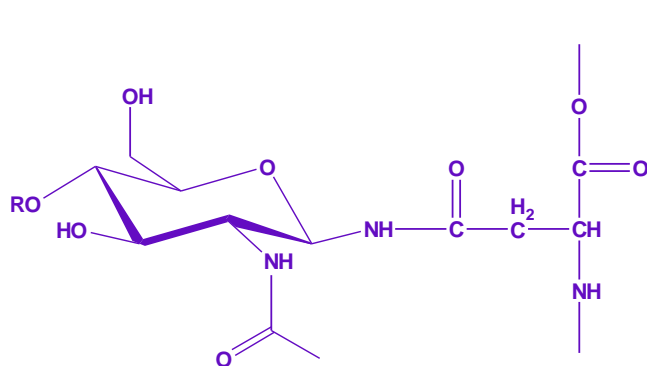


Хемоцианини

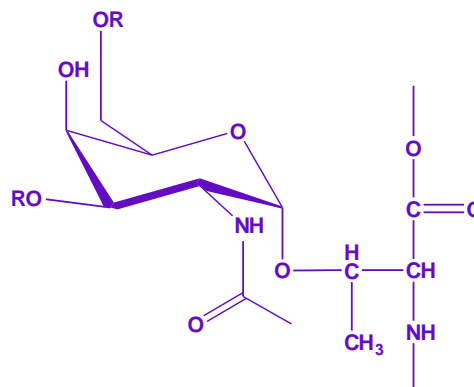


Cu/Zn-СОД-зи

Представен е и задълбочен анализ на въглехидратните структури и значението им за функцията и потенциален терапевтичен ефект на пречистените гликопротеини.



N-гликозилирани  
Asn-X-Ser/Thr



O-гликозилирани  
Към Ser или Thr -

## ГЛАВА IV.1. Cu/Zn-СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗИ - ИЗОЛИРАНЕ И СТРУКТУРНО ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ЕНЗИМА

Връзката между структурата и функцията на свързващи кислородни форми гликопротеини с един меден йон в активния център е представена след анализ на четири Cu/Zn-СОД-зи, изолирани от различни източници : от **гъбичен щам** *Humicola lutea* 110 (Cu/Zn-НlСОД 110), *Humicola lutea* 103 (Cu/Zn-НlСОД 103), *Aspergillus niger* 26 (Cu/Zn-АnСОД 26) и от **дрождеви** щам *Kluyveromyces marxianus* NBIMСС 1984 (Cu/Zn-КmСОД NBIMСС 1984).

### IV.1.1. Пречистване на Cu/Zn-супероксид дисмутази от гъбични щамове

Проведените изследвания върху гъбичните щамове *H. lutea* 110, *H. lutea* 103 и *A. niger* 26 показват трите щамове като добри продуценти на две форми на ензима, Cu/Zn-СОД и Mn-СОД. Като най-подходящи продуценти на Cu/Zn-СОД са гъбичните щамове *H. lutea* 103 (Angelova et al., 2001; Krumova et al., 2007) и *Aspergillus niger* 26, като синтезът на ензима се повишава след култивиране на *A. niger* 26 в условия на температурен стрес (Abrashv et al., 2005; 2006; 2008; 2015). Установено е наличие на Cu/Zn-СОД-зи в цитозола на клетките на щам *H. lutea* 110, а при *H. lutea* 103 ензимът е открит и в митохондриите, което е нетипично за СОД-зи. Ето защо обект на изследване са изолираните Cu/Zn-СОД-зи от митохондриите и от цитозола на гъбичния щам *H. lutea* 103.

Доказателство, че пречистените ензими от щам *H. lutea* и от *A. niger* 26 са Cu/Zn-СОД-зи, са определените чрез Едманово разграждане N-крайни АКП (Табл. 1).

	5	10	15	20	25																					
<i>H. lutea</i> 110	V	K	A	V	A	V	L	R	G	D	S	K	I	T	G	T	V	I	F	E	Q	A	N	E	S	
<i>N. crassa</i>	V	K	A	V	A	V	V	R	G	D	S	N	V	K	G	T	V	I	F	E	Q	E	S	E	S	S
<i>A. fumigatus</i>	V	A	V	A	V	L	R	G	D	S	K	I	T	G	T	V	T	F	E	Q	A	R	X	N		
<i>H. lutea</i> 103 МИТ	V	K	A	V	A	V	L	R	G	D	S	K	I	T	G	T	V	T	F	E	Q	A	N	E	S	
<i>H. lutea</i> 103 ЦИТ	V	K	A	V	A	V	L	R	G	D	S	K	I	T	G	T	V	T	F	E	Q	A	N	E	S	
AnСОД 26	M	L	A	V	A	V	K	R	G	D	S	K	V	T	G	T	V	X	F	E	Q	A	N	E	T	
AnСОДтс 26	M	L	A	V	A	V	K	R	G	D	S	K	V	T	G	T	V	X	F	E	Q	A	N	E	T	

**Табл.1.** Сравнителен анализ на N-крайните АКП на Cu/Zn-СОД-зи от: щам *H. lutea* 110, *H. lutea* 103 от цитозола (ЦИТ) и от митохондриите (МИТ), *A. niger* 26 (Cu/Zn-AnСОД и Cu/Zn-AnСОДтс)

Резултатите показват 100% идентичност на N-крайните АКП на двата ензима Cu/Zn-СОД-зи, изолирани от митохондриите и цитозола от щам *H. lutea* 103, както и Cu/Zn-СОД-зи от щам *A. niger* 26, култивиран при нормални физиологични условия (Cu/Zn-AnСОД) и в условия на температурен стрес, при 40°C (Cu/Zn-AnСОДтс).

### IV.1.2. Пречистване на Cu/Zn-СОД от дрожди *K. marxianus* NBIMСС 1984

Предпоставки за изследване на възможността дрождите да бъдат използвани за продуценти на ензима Cu/Zn-СОД са свързани с отсъствие на биотехнологии за мащабна продукция на СОД-зи от гъбични щамове и че дрождите са добре познати продуценти на ензима СОД, което се дължи на устойчивостта им при високи температури.

Разработената нова схема е подходяща за изолиране на Cu/Zn-СОД *K. marxianus* NBIMСС 1984, която включва три стъпки на пречистване: 1) термична обработка и диализа на екстракта, 2) йонообменна хроматография и 3) хроматофокусиране (Nedeva et al., 2009). Първата стъпка след термична обработка на клетъчния екстракт, води до денатуриране и утаяване на значителна част от протеините в екстракта, като активността му се запазва и около 65% от общата СОД-активност се дължи на Cu/Zn-KmСОД.

Разработената и приложена схема за пречистване на СОД доказва, че в дрожди *K. marxianus* NBIMСС 1984 се продуцират двете форми на ензима, Mn-KmСОД и Cu/Zn-KmСОД,

Със специфична активност 996.0 E/mg (Nedeva et al., 2009).

#### IV.1.3. Структурна характеристика на пречистените Cu/Zn – СОД-зи

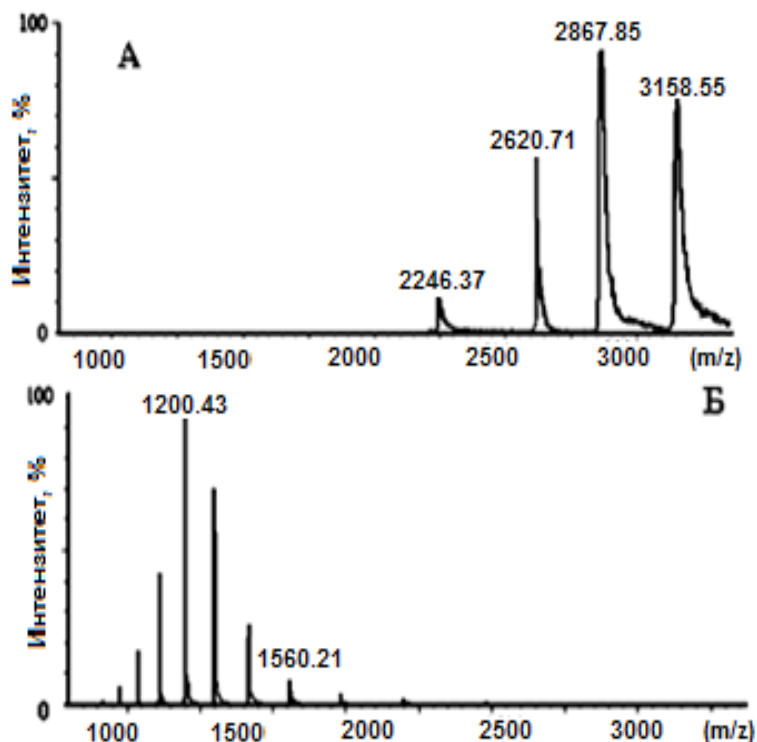
Едни от важните характеристики на пречистените Cu/Zn-СОД-зи от гъбични щамове *H. lutea* 103 и *H. lutea* 110, *A. niger* 26, и от дрождеви щам *K. marxianus* NBIMCC 1984 са :

- 1) Молекулна маса (Мм) на ензимите и изоформите им, определени чрез ПАГЕ-зи и MALDI-TOF - масспектрометричен анализ с;
- 2) Първична структура на СОД-зи, определена с Едманово разграждане и MALDI-TOF-TOF;
- 3) Построени 3D- (триизмерни) модели на пречистените Cu/Zn-СОД-зи.

#### Молекулни маси на пречистените Cu/Zn-СОД-зи

Проведените изследвания доказват, че молекулите на пречистените Cu/Zn-СОД-зи са високо хомоложни димери, оформени от два мономера (субединици), които включват 153 АКО при Cu/Zn-AnСОД и Cu/Zn-KmСОД NBIMCC 1984, докато 152 АКО са включени в субединицата на Cu/Zn-HiСОД 103. За субединиците на Cu/Zn-СОД-зи, изолирани от митохондриите (15 912 Da) и от цитозола (15 935 Da) на щам *H. lutea* 103, са изчислени еднакви Мм. Също молекулата на Cu/Zn-HiСОД 103 е представена от две идентични субединици, които образуват димер с Мм 31 893,5 (Angelova et al. 2001; Krumova et al., 2008). Сходни Мм са измерени с MALDI-MS за друг пречистен ензим от същия щам, който представлява хомотетрамер на Mn-СОД (75440 Da), изграден от 4 хомоложни субединици с Мм 18860 Da. Потвърждение на направените изводи са резултати от електроспрей-йонизационен масспектрометричен анализ (ESI-MS) на ензима, проведен в буфери с неутрално (Фиг. 1А) и кисело рН на средата (Фиг. 1Б).

Представените в MS спектъра йони за ензима, в буфер с рН 7.5 (Фиг. 1А), се променят след понижаване на рН на средата до 2.5, като на фигура 30Б е показана само една мономерна форма (Мм 15940 Da), която съответства на Мм на субединица на Cu/Zn-HiСОД. Изчислената Мм 31880 Da чрез MassLynx v3.1 за ензима в буфер с рН 7.5 съвпада с измерената Мм за Cu/Zn-HiСОД с MALDI-TOF (Krumova et al., 2007). Подобна е определена Мм (~32 kDa) за двете димерни форми на Cu/Zn-AnСОД 26 и Cu/Zn-AnСОДтс. Измерените Мм за субединиците на Cu/Zn-AnСОД 26 (15821 Da) и Cu/Zn-AnСОДтс (15828 Da), също са потвърдени от стойностите (Мм 15772 Da и 15788 Da) чрез ESI-MS анализи (Dolashki et al., 2008a).



Фиг. 1. ESI-MS анализ на Cu/Zn-HiСОД, разтворена в 10 mM амониево-ацетатен буфер:

А) MS анализ на интактната молекула в буфер с рН 7.5.

Б) MS анализ на структурна субединица на Cu/Zn-HiСОД 103 в буфер с рН 2.7.



Приложените методи доказват хомодимерна структура на Cu/Zn-KmCOD NBIMCC 1984, изградена от две идентични субединици с Мм 15814 Da (Nedeva et al., 2009; Dolashka-Angelova et al., 2010b).

### Първична структура на Cu/Zn-СОД-зи

Представената информация за първичната структура на пречистените Cu/Zn-СОД-зи е друга важна характеристика, свързана със стабилността и функцията на ензимите. Определяне на първичната структура на пречистените Cu/Zn-НІСОД 103, Cu/Zn-AnCOD 26 и Cu/Zn-KmCOD NBIMCC 1984 (Табл. 2) е постигнато след трипсинолиза на ензима и прилагане на два подхода за анализ на получените пептиди. Приложеният първи подход за определяне на АКП на Cu/Zn-НІСОД 103 включва няколко етапа :

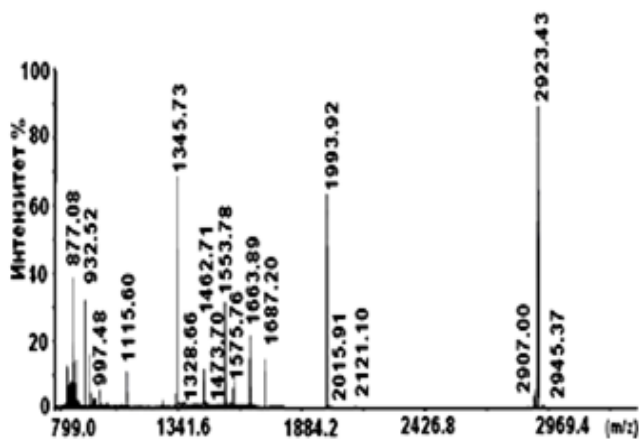
- 1). хидролиза на ензима с трипсин;
- 2). разделяне на получените фракции с обратнофазова хроматография и HPLC система;
- 3). определяне на Мм на получените пептиди чрез MALDI-TOF-MS и
- 4). определяне на АКП чрез Едманово разграждане (Dolashka-Angelova et al., 2004a). Като недостатък на този метод е установена необходимостта от по-голямо количество ензим и време за анализ, както и трудно интерпретиране на спектрите, защото след Едманово разграждане на една позиция може да се наблюдават няколко АКО. Ето защо за анализ на другите два ензима, Cu/Zn-KmCOD и Cu/Zn-AnCOD, е приложен втория подход.

	1	10	20	30	40
<i>K. marxianus</i> 1984	QAVAVLKGDSNVSGIVKFEQSESDQ	STKEV	WNIT	GN	SPNALRG F
<i>K. marxianus</i> L3	NAVAVLKGDSNVSGIVRFEQSESDQ	STKIS	WEIT	GN	DANALRG F
<i>S. cerevisiae</i>	QAVAVLKG DAGVSGVVKFEQASESEPTT	VSYEI	AGNS	PN	AERGF
<i>C. famata</i>	QAVAVLRGDSKVIQVNFQSSSED	PTFI	WEIS	GN	DANALRG F
<i>A. niger</i>	KAVAVIRGDSKVSQTVTFEQANENT	PTTI	WNIT	GH	DANAERGF
<i>A. oryzae</i>	KAVAVLRGDSKISQTVTFEQADANA	PTTV	WNIT	GH	DANAERA F
<i>A. fumigatus</i>	KAVAVLRGDSKITGTVTFEQADENS	PTTV	WNIK	GN	DPNAKRG F
<i>H. lutea</i>	KAVAVLRGDSKITGTVTFEQANESA	PTTV	WNIT	GH	DP AERGM
<i>N. crassa</i>	KAVAVVRGDSNVKQTVIFEQSEESA	PTTI	YDIS	GN	DPNAKRG F
	50	60	70	80	90
<i>K. marxianus</i> 1984	H SHEFGDNTNGCTSAGPHFDPSAKE-HGLPPDQQRHV	VDLGNIST			
<i>K. marxianus</i> L3	H IHEFGDNSNGCTSAGPHFNPFYKKT-HGAPGDETRH	VDLGNIST			
<i>S. cerevisiae</i>	H IHEFGDATNGCVSAGPHFNPFYKKT-HGAPTDEVRH	VDLGNIST			
<i>C. famata</i>	H VHTFGDNTNGCTSAGPHFNPFYKKT-HGAPEDDNRH	VDLGNIST			
<i>A. niger</i>	H VHQFGDNTNGCTSAGPHFNPFYKKT-HGAPEDDNRH	VDLGNIST			
<i>A. oryzae</i>	H VHQFGDNTNGCTSAGPHFNPFYKKT-HGAPEDDNRH	VDLGNIST			
<i>A. fumigatus</i>	H VHQFGDNTNGCTSAGPHFNPFYKKT-HGAPEDSERH	VDLGNIST			
<i>H. lutea</i>	H IHQEGDNTNGCTSAGPHFNPFYKKT-HGAPTDEVRH	VDLGNIST			
<i>N. crassa</i>	H IHTFGDNTNGCTSAGPHFNPHGGTTHGDRTA	EV	RHV	VDLGNIST	
	100	110	120	130	
<i>K. marxianus</i> 1984	DAQGVAKGSKQDLLIKLIFQNSVVGRTVVVHGGQDD	LGKGGNEE			
<i>K. marxianus</i> L3	DAQGVAKGSVTDKHKVLIIGPLSVIGRTVVVHGGQDD	LGKGGNEE			
<i>S. cerevisiae</i>	DENGVAKGSFKDSLILKLIIGPTSVVGRSVVIHAGQDD	LGKGGNEE			
<i>C. famata</i>	DTSGVAKGSKQDLFVVKLIIGQNSILGRTVVVHAGTDD	LGKGGNEE			
<i>A. niger</i>	DAEGNAVGSKQDKLVKLIIGAESVLGRTLVVHAGTDD	LGKGGNEE			
<i>A. oryzae</i>	DAEGNAVGSKQDKLILKLIIGAESVLGRTLVVHAGTDD	LGKGGNEE			
<i>A. fumigatus</i>	DAEGNAVGSKQDKLILKLIIGAESVLGRTLVVHAGTDD	LGKGGNEE			
<i>H. lutea</i>	DAEGNAVGSVQDKLILKLIIGAESVLGRTIVVHAGTDD	LGKGGNEE			
<i>N. crassa</i>	DAQGNAKGTVTDNLVVKLIIGPESVIGRTVVVHAGTDD	LGKGGNEE			
	140	150			
<i>K. marxianus</i> 1984	KTGNAGSRPACGVIGLTN				
<i>K. marxianus</i> L3	KTGNAGGRVACGVIGISN				
<i>S. cerevisiae</i>	KTGNAGPRPACGVIGLTN				
<i>C. famata</i>	KTGNAGARLACGVIGLTKPN	NS			
<i>A. niger</i>	KTGNAGPRPACGVIGIAA				
<i>A. oryzae</i>	KTGNAGARPACGVIGIA				
<i>A. fumigatus</i>	KTGNAGARPACGVIGIA				
<i>H. lutea</i>	KTGNAGPRPACGVIGIA				
<i>N. crassa</i>	KTGNAGPRPACGVIGISQ				

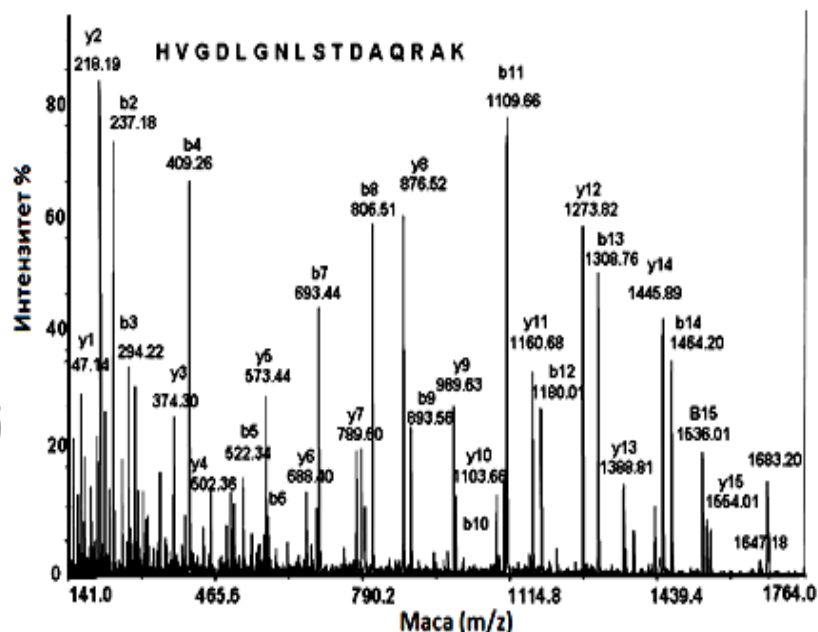
Табл. 2. Сравнителен анализ на АКП на Cu/Zn-СОД от *K. marxianus*, *S. cerevisiae* (AAT99430), *U. puniceus* (AAL24456), *C. famata* (AAK82335), *A. niger* 26 (AAU4413), *A. oryzae* (BAE58164.1), *A. fumigatus* (Q9Y8D9), *H. lutea* 103 (P83684), *N. crassa* (P07509).

## Първични структури на Cu/Zn-AnCOД 26 и Cu/Zn-KmCOД NBIMCC 1984

Определяне на първичните структури на СОД-зи е постигнато чрез втория подход, който включва по-точен и по-бърз метод, като трипсинолиза на Cu/Zn-AnCOД 26 и Cu/Zn-KmCOД NBIMCC 1984 и разделяне на получените фракции на Hypersil колона и HPLC система (Dolashki et al., 2008a; Dolashka-Angelova et al., 2010b). Предимства на този подход са прецизно измерване на Мм на пептидите чрез MALDI-MS (Фиг. 2) и точно определяне на АКП от MS/MS спектрите им (Фиг. 3). Проследяването на фрагментните у- и b-йони в MS/MS спектъра на йон с  $m/z$  1683.20  $[M+H]^+$  представя АКП на пептид HVGDLGNLSTDAQRAK и Мм 1638.20 Da (Фиг. 3).



Фиг. 2. MALDI-MS на получени пептиди след трипсинолиза на Cu/Zn-KmCOД.



Фиг. 3. MS/MS анализ на пептид с  $m/z$ 1683.20  $[M+H]^+$  от Cu/Zn-KmCOД.

След анализ на MS/MS спектрите на всички получени пептиди с програмите Mascot, BLASTA и Peaks е установена АКП на субединицата на Cu/Zn-KmCOД NBIMCC 1984, която е изградена от 153 АКО (Табл. 2). Потвърждение за прецизността на анализа е съответствие на измерената Мм 15814 Da на Cu/Zn-KmCOД NBIMCC 1984 с MALDI-MS и изчислената Мм от определената АКП на ензима (Dolashka-Angelova et al., 2010b).

Прилагането на втория подход предоставя информация за първичните структури на Cu/Zn-AnCOД-зи, изолирани от цитозола и от митохондриите на клетката, с което са доказани 153 АКО в субединиците на двата ензима (Табл. 2) (Dolashki et al., 2008a).

Представеният в таблица 2 сравнителен анализ на АКП определя консервативните позиции, като най-висока хомоложност е очертана при His46, His48, His63, His71, His80 и His120, които свързват  $Cu^+$  и  $Zn^{2+}$  йони в активния център. Позиции 59 и 147 са заети от два Cys остатъка, които могат да формират дисулфидни връзки. Също разположеният Trp остатък на позиция 32 се свързва с наблюдаваната абсорбцията при 280 nm и флуоресцентна емисия при 310-450 nm. Друг важен за стабилността на ензима е Pro остатък, разположен в цинк-свързващия активен център на ензима.

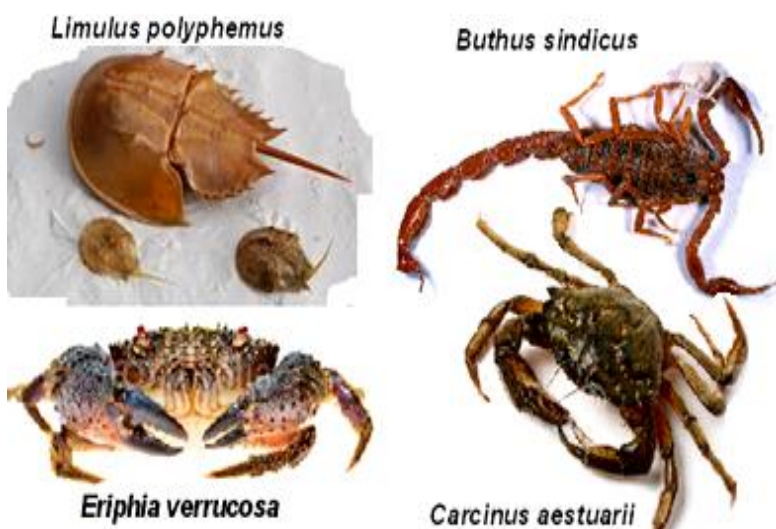
Наблюдаваното сходство в АКО при Cu/Zn-HICOД 103 и Cu/Zn-KmCOД NBIMCC 1984 на позиция 33-35 съответства на N-гликозилиран център (-Asn-Ile-Thr-), което предполага гликозилирания характер на ензима. Това е потвърдено от орцинол/ $H_2SO_4$  тест, който показва наличие на гликани само за Cu/Zn-HICOД 103 и Cu/Zn-KmCOД, но не и в Cu/Zn-AnCOД (Dolashka-Angelova et al., 2010b).

## ГЛАВА IV.2. ХЕМОЦИАНИНИ ОТ ВИД *ARTHROPODA* - ИЗОЛИРАНЕ И СТРУКТУРНО ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ

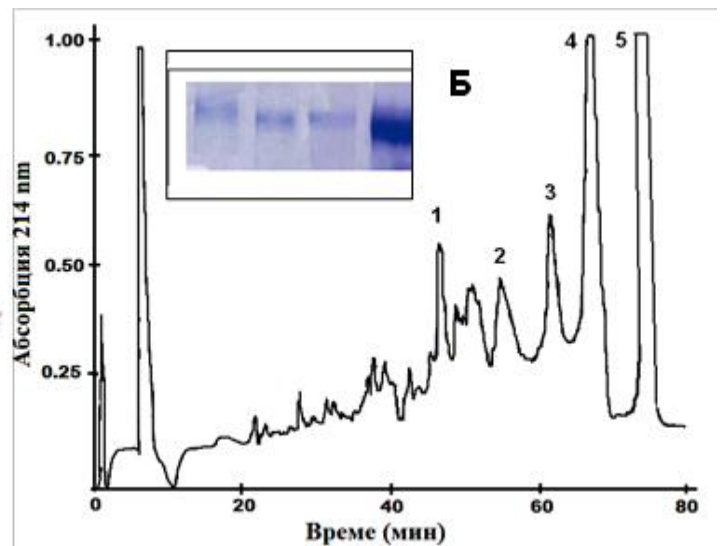
Обект на представените научни изследвания са и други много разпространени представители на кислор-свързващите протеини 'хемоцианините', при които двата  $\text{Cu}^{2+}$  йона в активния център участват в преноса на молекула кислород до клетките. Голямото разнообразие на тези протеини е представено в два биологични вида: *Arthropoda* и *Mollusca*. Те изпълняват еднаква физиологична функция, но имат съществени структурни различия, изразени в размера на молекулата, четвъртичната и въглехидратни структури.

### IV.2.1. Изолиране и пречистване на хемоцианини от артроподни организми

Проведените изследвания върху хемоцианини от вид *Arthropoda* представят сложните структури на протеина, изолиран от различни организми от двата класа: клас **Crustacea** - рак *Homarus americanus* (HaH), *Maia squinado* (MsH), *Palinurus vulgaris* (PvH), *Eriphia verrucosa* (EvH) и *Carcinus aestuarii* (CaeH), клас **Chelicerata** - скорпион *Buthus indicus* (BsH) и рак *Limulus polyphemus* (LpH) (Фиг. 4). С разработения нов метод, на колона Resource 6 ml и FPLC система, са пречистени пет субединици, които изграждат молекулата на хемоцианин от *L. polyphemus* (LpH) (Dolashka-Angelova et al., 2005a)



Фиг. 4. Използвани организми от вид *Arthropoda* и пречистени хемоцианини.

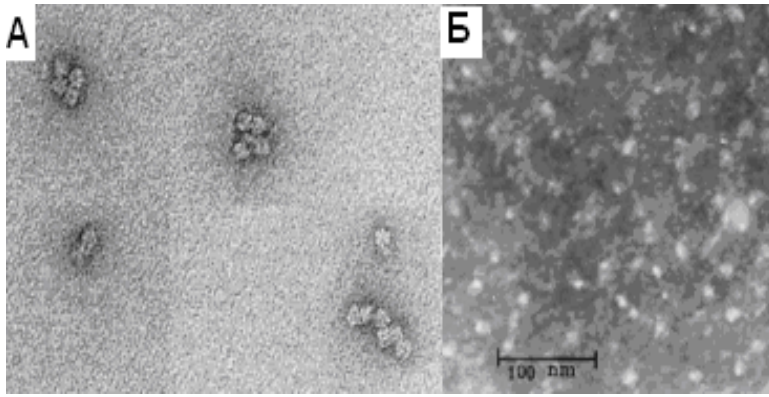


Фиг. 5А Хроматограма на изолиране на Mono Q HR 16/10 колона на субединиците на EvH, Б) 10% SDS ПАГЕ на получените фракции (пикове 1,2,3 и 4).

Други четири субединици (EvH1- EvH4) с Мм ~70-75 kDa, които оформят хексамера при хемоцианин от *E. verrucosa*, са елуирани на Mono Q HR колона с FPLC система (Фиг. 5А) и са с Мм ~75 kDa (Фиг. 5Б) (Dolashki et al., 2015). Методът е подходящ за изолиране и на четири субединици (CaeSS1-CaeSS4) на хемоцианин от рак *C. aestuarii*, от клас Crustacea (Dolashka-Angelova et al., 1999c). Докато само една субединица Bsin1 е пречистена от хемоцианина на скорпион *B. indicus* (Ali et al., 2000).

### IV.2.2. Структурна характеристика на хемоцианини от вид *Arthropoda*

Трансмисионните електронно микроскопските анализи (ТЕМА) на пречистените гликопротеини, разтворени в стабилизиращ буфер (СБ) 10 mM Tris/HCl, 20 mM  $\text{CaCl}_2$  и 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , с pH 7.0, потвърждават 4x6-мерни стабилни структури на интактната молекула на HaH, PvH, CaeH, EvH, LpH и BsH, които са оформени като ди- и моно-хексамерни агрегати (Dolashka-Angelova et al., 1999c; 1999d; Dolashki et al., 2015; Ali et al., 2000).



**Фиг. 6.** TEM анализ на 4x6-мерна структура на MsH.

**А)** 0.1 mg/ml MsH, разтворен в 20 mM Tris/HCl буфер, pH 7.0, 10 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub>;

**Б)** Дисоциирани структурни субединици MsH. Негативно оцветени с 1% уранил ацетат.

Представените на фигура 6А хексамерни форми на MsH са дисоциирани до изграждащите ги субединици след диализа срещу 0,1M NaHCO<sub>3</sub> буфер, с 10 mM EDTA и 1M урея, pH 9.5 (Фиг. 6Б) (Dolashka-Angelova et al., 2000a).

### **Молекулни маси и N-крайни АКП-ти на хемоцианини от вид *Arthropoda***

Приложените анализи с ПАГЕ представят различни стойности за Мм на субединиците на HaH и MsH (между 68 - 75 kDa), за CaeH (65 - 85 kDa) и за PvH и EvH (70-75 kDa) (Dolashka-Angelova et al., 1999d; 2000a; Dolashki et al., 2015; Ali et al., 2000). Измерената Мм чрез MALDI-MS за субединица EvH1 (75098.62 Da) е близка до Мм на трите субединици EvH2 (74488 Da), EvH3 (75753 Da) и EvH4 (74713 Da) (Dolashki et al., 2015), както и до Мм 72423.7 Da на субединица Bsin1 от BsH (Ali et al., 2000).

### **Първични структури на хемоцианини от вид *Arthropoda***

Разработените и приложени два подхода се оказаха подходящи при определяне на първичните структури на субединици на хемоцианини от *C. aestuarii* (CaeH) и *E. verrucosa* (EvH1), представители на клас Crustacea и от *B. indicus* (BsH) от клас Chelicerate. Определените АКП на получените пептиди с първия подход, чрез Едмантово разграждане и сравнителния анализ на получените данни представят 650 АКО от субединица CaeSS2, от които е изчислена сходна Мм 74870 Da на CaeSS2 с определената Мм от ПАГЕ и на други хемоцианини от клас Crustacean (Dolashka-Angelova et al., 2005b).

Много по-точен анализ за АКП на субединица EvH1 е представен от определената кДНК след подбор на праймери като **R** (TGTGTTCTCTGAAGATGTTATCCATGTACTT) и **F** (GAACTTTTTTTTTGGGT). Дизайнът на дегенеративните праймери е проведен на основа на високо консервативните участъци в хемоцианина, разположени в областта на активния център, които свързват CuA и CuB. В резултат на амплификация е получен продукт с дължина 540 бд (базови двойки), който след клониране и фрагментиране е използван за дизайн на допълнителни праймери, с които е продължен анализът на нуклеотидната последователност на хемоцианина по посока 3' (Табл. 3).

Нуклеотидната последователност представя 435 АКО за полипептид от EvH, високо хомоложен със субединиците на хемоцианин от *C. magister*. По-близки стойностите са отчетени на фрагмента с АКП на субединици Cm 4 и Cm 5, което предполага, че той може да бъде една от двете субединици, EvH4 или EvH5 (Dolashki et al., 2015). Поради по-висока хомоложност, отчетена със структурна субединица Cm5, фрагментът е представен като субединица EvH5 (Dolashki et al., 2015).

Табл.3. Сравнителен анализ на АКП на субединици CaeSS2 и EvH1 със субединици, изолирани от други хемоцианини от *Arthropoda*.

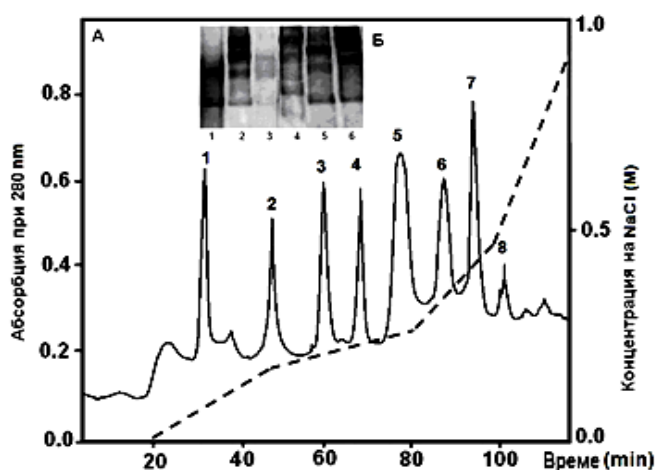
	101										200
CmH5	LFNTRQREEA	LMLYDVLEHS	TDWSTFAGNA	AFFRVRMNEG	EFVYALYAAV	IHSELTQHVV	LPPLYEVTPH	LFTNSEVIQE	AYKAKMTQTA	AKIESHFTGS	
CmH6	LFNTRQREEA	LMLYDVLEHS	TDWSTFAGNA	AFFRVMNEG	EFVYALYAAV	IHSELTQHVV	LPPLYEVTPH	LFTNSEVIQE	AYKAKMTQTA	AKIESHFTGS	
CmH4	LFNTRQRKEA	LMLYDVLEHS	TDWSTFAGNA	AFFRVHMNEG	EFVYALYAAV	IHSELTQHVV	LPPLYEVTPH	LFTNSEVIQE	AYKAKMTQTA	AKIESHFTGS	
CmH3	LFNTRQREEA	LMLYDILEHS	TDWDTFAGNA	AFFRVRMNEG	EFVYALYAAV	IHSELTQHVV	LPPIYEVTPH	LFTNSEVIQE	AYKAKMTQTR	AKIESHFTGS	
CaeSS2	LFNPRTREED	LMLYNVDEHS	GNWDTFAGNA	AFFRVHVNEG	FFVYASYSVV	IHSKLTQHVV	LPPLYEVTPH	LFTNSEVIQK	AYAAKMTQT	TKIFAHFTGS	
EvH	-----										
	201	Helix 2.1				Helix 2.2				300	
CmH5	KSNPEQRVAY	FGEDIGMNTH	HVTWHLEFPF	WWDDAHENHH	IERKGE-SFF	WVHHQLTVRF	DAERLSNHMD	PVGELHWDDV	IHEGFAPHTM	YKYGGYFPSR	
CmH6	KSNPEQRVAY	FGEDIGMNTH	HVTWHLEFPF	WWDDAHENHH	IERKGE-SFF	WVHHQLTVRF	DAERLSNYLD	PVDELHWDDV	IHEGFVPHTM	YKYGGYFPSR	
CmH4	KSNPEQRVAY	FGEDIGMNTH	HVTWHLEFPF	WWDDAHENHH	IERKGE-SFF	WVHHQLTVRF	DAERLSNYLD	PVDELHWDDV	IHEGFAPHTM	YKYGGYFPSR	
CmH3	KSNPEQRVAY	FGEDIGMNTH	HVTWHLEFPF	WWDDAHENHH	IERKGE-NFF	WVHHQLTVRF	DAERLSNHLD	PVDELHWDDV	IHEGFDPQAM	YKYGGYFPSR	
CaeSS2	KSNPEQRVAY	FGEDIGMNTH	HVTWHLEFPF	WWDDAHYDHH	IERKGESCS	WVHHQLTVRF	DAERLSNYLD	PVRELHWDDV	IHEGFAPHTS	YKYGGYFPDR	
EvH	-----	-----	-----	-----	-----E-LFF	WVHHQLTVRF	DAERLSNYLD	PVDELHWDDL	IHEGFAPHTM	YKYGGYFPSR	
	301	Helix 2.5								400	
CmH5	PDNVHFEDVD	GVARVRDMLI	LESRIRDAIA	HGYVTGRDGS	IISISDSHGI	DVLGDVIESS	LYSPNPEYYG	ALHN <del>TA</del> HMML	GRQGDPHGKF	DLPPGVLEHF	
CmH6	PDNVHFEDVD	GVARVRDMLI	LESRIRDAIA	HGYVTGRDGS	IISISDSHGI	DVLGDVIESS	LYSPNPEYYG	ALHN <del>TA</del> HMML	GRQGDPHGKF	DLPPGVLEHF	
CmH4	PDNVHFEDVD	GVARVRDMLI	LESRIRDAIA	HGYVTGRDGS	IISISDSHGI	DVLGDVIESS	LYSPNPEYYG	ALHN <del>TA</del> HMML	GRQGDPHGKF	DLPPGVLEHF	
CmH3	PDNIHFEDVD	GVADVRDMLL	YEERILDAIA	HGYVDRNGK	IVDLRNNNGI	DVLGDVIESS	LYSPNPQYYG	ALHN <del>TA</del> HMML	GRQGDPHGKF	DLPPGVLEHF	
CaeSS2	PDNVN <del>F</del> EDVD	GVARVRDMLL	FEERIQDAIA	HGYLRY- <del>NGS</del>	TINIRDNHGI	DVLGDVFESS	MYSRPQDYG	ALHNQAHRVL	GSQADPHGKF	ALPPGVLEHF	
EvH	PDNVHFEDVD	GVARVRDMLI	LESRIRDAIA	HGYITAK <del>DGS</del>	TINIRDSKGI	NVLGDVIESS	MYSNPQYYG	ALHN <del>TA</del> HVML	GRQGDPHGKF	DLPPGVLEHF	
	401	Helix 2.6								500	
CmH5	ETATRDPAFF	RLHKYMDNIF	REHKD <del>SL</del> TPY	TKDELEFPGV	AVES <del>SIS</del> LKNR	LETYFEDFEY	SLINAVDDTA	EIADVPISTV	VKRLAHKDFT	AECVINNNNE	
CmH6	ETATRDPAFF	RLHKYMDNIF	REHKD <del>SL</del> TPY	TKDELEFPGV	KIDS <del>SIS</del> LSNR	LETYFEDFEY	SLINAVDDTT	KVADVPISTI	VKRLAHKDFT	VESVITNNNE	
CmH4	ETATRDPAFF	RLHKYMDNIF	REHKD <del>SL</del> TPY	TKDELEFPGI	EID <del>SFS</del> LSNR	LETYFEDFEY	SLINAVDDTA	EIADVPISTV	VKRLTHKSFT	AKCVINNNNE	
CmH3	ETATRDPAFF	RLHKYMDNIF	RKHKDSLPPY	TKEELNFEGV	NIDNFYIKGN	LETYFETFEY	SLVNAVDDTE	DVDDVDIFTY	ISRLNHKEFS	FVGDVTNELD	
CaeSS2	ETATRDPAFF	RLHKYMDNIF	RKHKD <del>SL</del> TPY	TKNELKFEGV	NIDSIYEKGN	LETYFESFMY	TGVNIMLLTN	DVDDVDIATY	ITDLAHKELS	FQEDVTNEGD	
EvH	ETATRDPAFF	RLHKYMDNIF	REHKDSLPPY	TKEELEFPGI	AVD <del>SIS</del> FSNR	LETYFENFEY	SLINAVDDTE	QIPDVPI <del>STT</del>	VPRLAHKDFT	AIEFGITNNNE	
	501										600
CmH5	NEVMATVRIF	AWPKYDNNHV	EFSFNDGRWN	AIEMDKFWTK	LAPGPNTITR	SSKDSSVTVP	DVPSFLTIE	KTEEAVSSGS	ELHLEDYVSG	LGLPNRFLLS	
CmH6	HEVMATVRIF	AWPMYDNDV	EFSFNDGRWN	AIEMDKFWIK	LASGTNTITR	SSKDSSITVP	DVPSFQDLIE	KTKEAVSSGS	ELHLEEYVSG	LGLPNRFLLP	
CmH4	HDVIATVRIF	AWPKYDNNHV	EFSFNDGRWN	AIEMDKYWTK	LTPGPNTITR	SSMDSSVTVP	DVPSFLTIE	KTEEAVSSGS	ELHLEDYVSG	LGLPNRFLLS	
CmH3	HDVLATVRIF	AWPHEDNNGV	AFSFNDGRWN	AIEMDKFVVM	LHPGHNHIER	SSHDSATVP	DIPSFQFIKD	RTNEAIAQNK	ELHIEEFESG	LGLPNRFLIP	
CaeSS2	IGVLETVRIF	AWPHIDDDHV	EFSFN <del>E</del> GRWD	VIEMDKFVVM	LEHGHSIDR	SSFDSTVTIP	DRPSFHDIED	RTSEAI <del>P</del> HGK	ELHIEEFESV	TGLPNRFLIP	
EvH	NDVMATVRVF	AWPKYDNNHV	EFSFDDGSWN	AIELDRFWTK	LTPGHNT <del>ITR</del>	SSRDSAVTVP	DVPSFQTLMT	KTEQALASGS	ALHLEDHFSS	LGLPNRFLIP	
	601										670
CmH5	KGTTTEGMKFH	LVVVFS <del>D</del> GAK	DAAIDGLYEN	TSFNHYGAHN	GKYPDKQPHG	YPLDRRVDDDE	RIITGVTNFK	GVDVKVYHVETQ			
CmH6	KGTTQGMKFH	LVVVFS <del>D</del> GAK	DAAIDGLHEN	TSFNHYGAHN	GKYPDKRPHG	YPMDRRVDDK	RIFSGVTNIK	CMNVKVYHVETQ			
CmH4	KGTTKGMDFH	LVVVFS <del>D</del> GAK	DAAIDGLLEN	TSFNHYGAHS	GKYPDKQPHG	YPLDRRVDDK	RIITGVTNFK	GMDVKVYHVVEEQ			
CmH3	KGNVKG <del>L</del> DMD	VMVAITS <del>G</del> EA	DAAVEGLHEN	TSFNHYGCAD	GTYPDKRPHG	YPLDRHVDDDE	RIINDLHNFK	HIQVKVFHHA--			
CaeSS2	KGLVKG <del>K</del> DMD	VMVAVTS <del>G</del> EG	LAAVEGLHRS	ANFAHHGCPE	VRYPDKRPHG	YPLYRPVDDDE	RIITGVTNFK	HIQVKVFHH---			
EvH	KGKSEGMEFH	LVVVFAS <del>D</del> GAK	DAAVDGLHQI	TTFFHYGLHD	GTYPDHQPHG	YPLDRHVDDDE	RIITGVTNFK	AIDVKVYHVEH-			

## ГЛАВА IV.3. ХЕМОЦИАНИНИ ОТ ВИД *MOLLUSCA* - ИЗОЛИРАНЕ И СТРУКТУРНО ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ

Друга загадка на олигомерната молекула на хемоцианини от вид *Mollusca* са сложните въглехидратни структури, като за определянето им са изолирани и характеризирани хемоцианини от четири организми от клас *Gastropoda*: калифорнийска мида *Megathura crenulata* (KLH), морски охлюви *Rapana venosa* (RvH), наричан още *Rapana thomasiana* (RtH) и *Haliotis tuberculata* (HtH), градински охлюви *Helix aspersa* (HaH) и *Helix vulgaris* (HvH), преименуван в *Helix lucorum* (HlH) (Фиг. 7).



Фиг. 7. Организми от вид *Mollusca*, клас *Gastropoda*.



Фиг. 8А. Елуирани 8 ФЕ-ци от  $\beta_C$ -HaH на колона DEAE-Sepharose CL-6B (HR10/10); Б) 10% SDS-ПАГЕ на пречистени ФЕ-ци (от 2-ра до 7-ма фракция).

### IV.3.1. Изолиране на хемоцианини от вид *Mollusca* и изоформите им

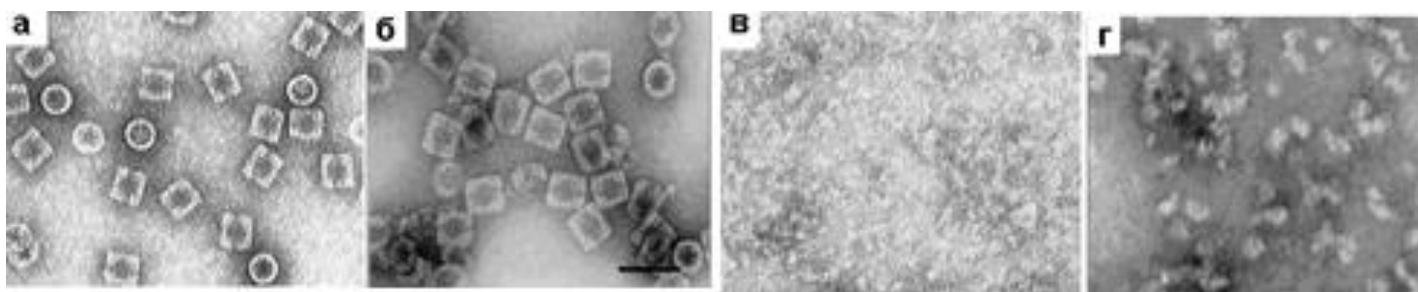
Разработените методи и подходи са подходящи за пречистване на HlH, HaH и RvH и изграждащите ги изоформи. Получените по три електрофоретично чисти структурни субединици от HaH и HlH доказват различие в организацията на молекулите с дидекамера на RvH, която е изградена от две структурни субединици (RvH1 и RvH2).

Приложеният нов подход след 4 часова трипсинолиза (400/1) на субединици RvH1 и RvH2, представя по 6 ФЕ-ци от двете структурни субединици, пречистени на колона DEAE-Sepharose CL-6B. Този подход е подходящ за изолиране на осем електрофоретично чисти ФЕ-ци от трите субединици ( $\beta_C$ -HaH,  $\alpha_D$ -HaH и  $\alpha_N$ -HaH) на хемоцианин от *H. aspersa* (Фиг. 8А,Б) (Dolashka et al., 2016).

Прилагането на различни методи позволява пречистване по осем електрофоретично чисти ФЕ-ци от  $\beta_C$ -HaH (от  $\beta_C$ -HaH-a до  $\beta_C$ -HaH-h) (Dolashka et al., 2016) и  $\beta_C$ -HlH (от  $\beta_C$ -HlH-a до  $\beta_C$ -HlH-h) (Velkova et al., 2010a), докато от двете структурни субединици RvH1 и RvH2 са изолирани по 6 ФЕ-ци (Dolashka-Angelova et al., 2003a).

### IV.3.2. Структурна характеристика на хемоцианини от вид *Mollusca*

Проведената диализа срещу 0,13 M Gly буфер, с рН 9,3 води до дисоцииране на огромните комплексни молекули на RvH, HaH и HlH (Фиг. 9а,б), до изграждащите ги субединици, което е доказано чрез ТЕМ анализи (Фиг.9в,г).

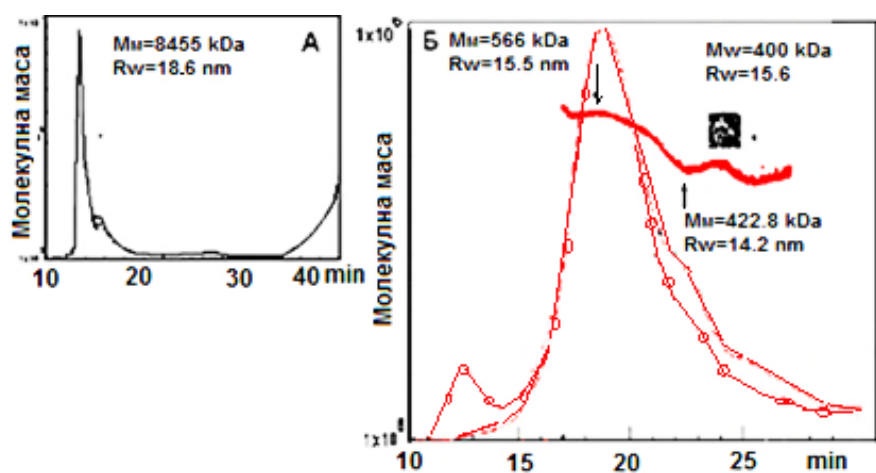


**Фиг. 9.** ТЕМА на хемоцианини: **а)** Интактна молекула на хемоцианин от *R. venosa* в СБ (50 mM Tris-буфер, с 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5); **б)** на хемоцианин от *H. lucorum*; **в)** Дисоцииран хемоцианин от *R. venosa* до структурни субединици след диализа срещу 0,13 M Gly буфер с pH 9,3; **г)** Дисоцииран хемоцианин от *H. lucorum* (Velkova et al., 2010).

Характеристика на интактните молекули на хемоцианините, както и на изграждащите ги субединици и ФЕ-ци, са представени на база на различни разработени комбинирани методи и подходи (Dolashka-Angelova et al., 2003; Velkova et al., 2010).

### **Молекулни маси и N-крайни АКП на хемоцианини от вид *Mollusca* и изоформите им**

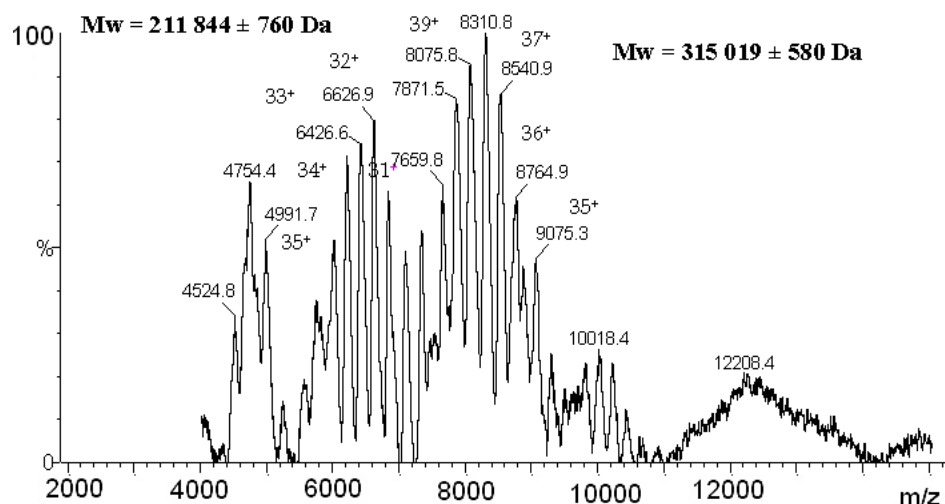
Поради огромните и сложни структури на хемоцианините, утвърдени методи не предоставят коректна информация за молекулната им маса. Точна представа за структурата на хемоцианини от молюски е постигната след определяне на Мм на RvH и субединиците с едни от най-чувствителните методи - многоъгълно разсейване на светлината (MALS или MALLS), в комбинация с ESI-MS. Определената Мм 8455±51 kDa от MALLS анализа за интактната молекула на RvH съответства на Мм на дидекамерна форма на RvH, изградена от 20 субединици (Фиг. 10А). Представеният ТЕМА показва предимно оформени дидекамерни форми на RvH (Фиг.11А), но също и рядко срещани мега-тридекамери при хемоцианини (Фиг. 11Б) (Dolashka et al., 2012a).



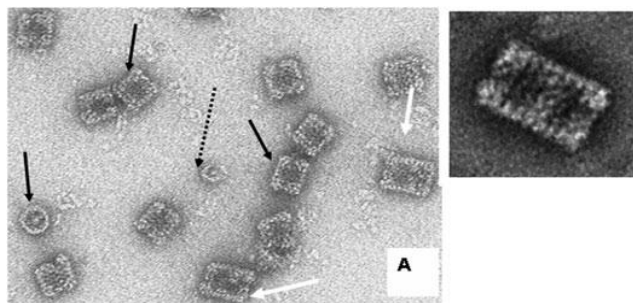
**Фиг. 10.** MALLS анализ на:

**А)** RvH, елуирана на колона Sepharose 6;

**Б)** Дисоциирана RvH в 130 mM Gly/NaOH буфер с pH 9.6.

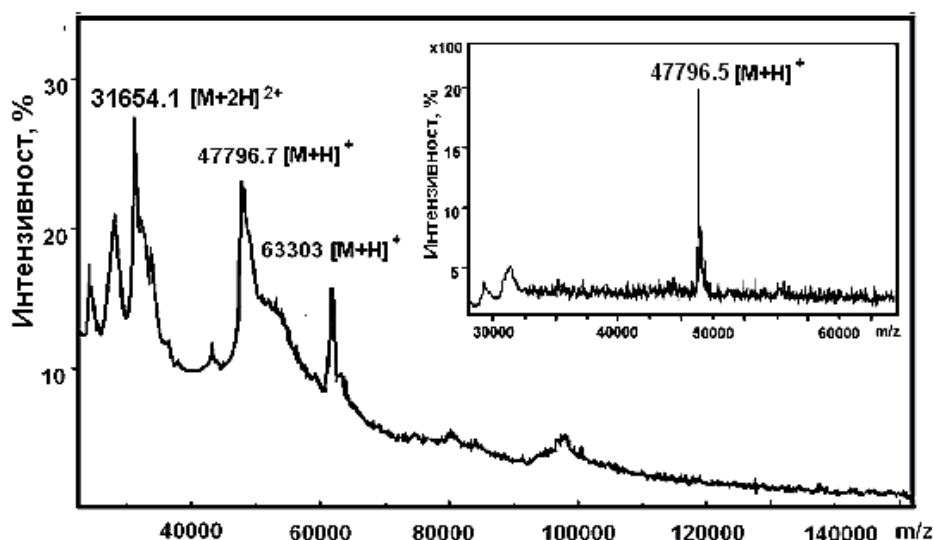


**В)** ESI-MS спектър на дисоциирана RvH, ESI-TOF (LCT, Altrincham, UK), ESI-Q-TOF II (Micromass, Altrincham, UK)



**Фиг. 11.** TEM анализ на RvH  
**А)** Дидекамери на RvH (черни стрелки); субединици (пунктирвани стрелки) и тридекамери (бели стрелки);  
**Б)** мега-тридекамер

Друга важна характеристика са измерените Мм 50585 Da, 55978 Da и 59123 Da на чистите ФЕ-ци от RvH1 с MALDI-MS (Dolashka et al., 2012a), които потвърждават електрофоретично определените Мм ~45-65 kDa на ФЕ-ци от субединици RvH, H1H и HaH (Dolashka-Angelova et al., 2000a). Сравнителните анализи показват съществени различия в Мм от MALLS анализите и публикуваните Мм (250, 150, 420 и 450 KDa) за субединиците на RvH (Idakieva et al., 2002). Представени са три елуирани фракции на колона Sepharose 6 за дисоциираната RvH с Мм  $566 \pm 2$  kDa,  $400 \pm 2$  kDa и  $422.8 \pm 1$  kDa (Фиг. 10А,Б) (Dolashka et al., 2012a), като измерените Мм  $400 \pm 2$  kDa и  $422.8 \pm 1$  kDa (Фиг.10Б) съответстват на Мм на RvH1 и RvH2. Установено е различие с измерените Мм 211844 Da и 315019 Da на ESI-MS (Фиг. 10В), сумата от които съвпада с Мм  $566 \pm 2$  kDa на елуираната на 20 min фракция (Фиг. 10Б).



**Фиг. 12.** MALDI-MS анализ на елуирана фракция 5 от  $\beta_C$ -HaH, представена на Фиг. 8А;  
**Вътрешна фигура:** MALDI-MS анализ на елуирана фракция 6, представена на Фиг. 8А.

Другата елуирана фракция 6, представена от йон с  $m/z$  47796.7  $[M+H]^+$ , съответства на чиста ФЕ с Мм 47796.7 Da (Фиг. 12). Също фракция 5 от  $\beta_C$ -HaH е представена на MS спектъра от йон с  $m/z$  47796.7  $[M+H]^+$  и от двойно зареден йон  $m/z$  31654.1  $[M+H]^{2+}$ , който определя Мм 63303.4 Da за елуираната ФЕ-ца 6 (Фиг. 8А)

### Първична структура на $\beta$ -, $\alpha_D$ -, $\alpha_N$ - изоформите на хемоцианин от *H. lucorum*

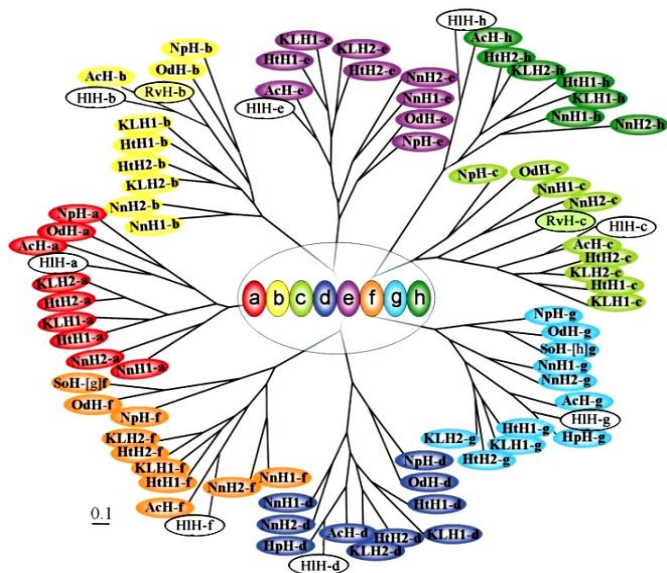
Тъй като в изграждането на молекулата на една структурна субединица на хемоцианини от молюски участват над 5000 АКО, то единственият начин да се определи първичната им структура е чрез фракциониране на генома. След проведени комбинирани анализи за първи път е представена АКП на хемоцианин с три изоформи, субединиците  $\beta_C$ -H1H,  $\alpha_N$ -H1H и  $\alpha_D$ -H1H, които изграждат молекулата на хемоцианин от *H. lucorum* (De Smet et al., 2011). Това е постигнато след изолиране на тотална РНК от крака на градински охлюв *H. lucorum* и синтезиране чрез обратна транскрипция на кДНК.

Транслирането на получените нуклеотидни фрагменти позволява определяне на АКП на субединица  $\beta_C$ -H1H, изградена от 3414  $\alpha$ -АКО (Мм ~389 kDa) и субединица  $\alpha_D$ -H1H от 3409









**Фиг. 13.** Филогенетично дърво на ФЕ-ци на хемоцианини от вид *Mollusca*. Осем отделни разклонения представят осем различни вида ФЕ-ци в субединиците.

ФЕ-ци на хемоцианини от: *N. pompilius* (NpH), *O. dofleini* (OdH), *S. officinalis* (SoH); по две изоформи на *N. nucleus* (NnH), *H. tuberculata* (HtH), *M. crenulata* (KLH), *R. venosa* (RvH), *A. californica* (AcH); две ФЕ-ци на *H. pomatia* (HpH) и *H. lucorum* (HH) ( $\beta$ -изоформа,  $\beta$ -HH).

Представените в таблица 6 структурни характеристики доказват редица сходства, но и важни различия в организацията на молекулата на хемоцианини от вид *Mollusca*. Интактната молекула на хемоцианини от *Nautilus*, *Sepia* и *Octopus* е оформена от един декамер и една субединица, докато две субединици изграждат димерната молекула на хемоцианини от *Rapana*, *KLH*, *Concholepas*, *Haliotis*, *Murex*, *Aplysia* и *Nucula* и само хемоцианините от *H. lucorum* и *H. pomatia* включват три субединици.

<p>Изоформа 1</p>	<p>(NpH) <i>Nautilus pompilius</i> (OdH) <i>Octopus dofleini</i> (SoH) <i>Sepia officinalis</i></p>	<p>декамер</p>
<p>Изоформа 1      Изоформа 2</p>	<p>(NnH) <i>Nucula nucleus</i> (HH) <i>Haliotis tuberculata</i> (KLH) <i>Megathura crenulata</i> (RvH) <i>Rapana venosa</i> (CCh) <i>Concholepas concholepas</i></p>	<p>дидекамери</p>
<p>Изоформа 1      Изоформа 2a      Изоформа 3</p>	<p>(HpH) <i>Helix pomatia</i> (HH) <i>Helix lucorum</i></p>	<p>тридекамери</p>

**Табл. 6.** Структурни характеристики на молекулата на хемоцианини от молюски, изградени от :

една субединица (*Nautilus*, *Sepia* и *Octopus*);

две субединици (*Rapana*, *Haliotis*, *KLH*, *Concholepas*, *Murex*, *Nucula* и *Aplysia*);

три субединици (*H. lucorum* и *H. pomatia*).

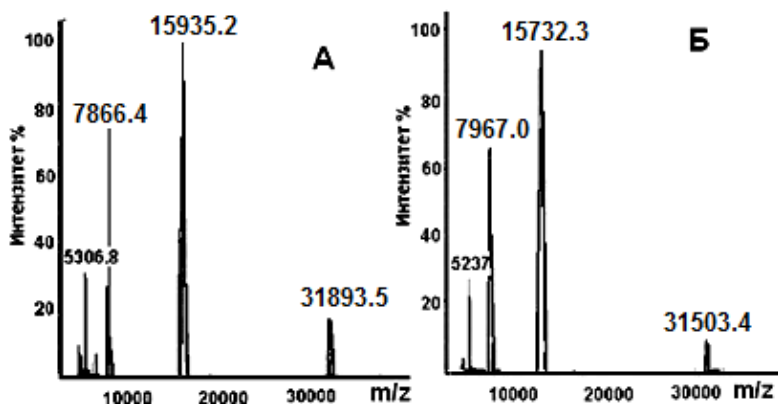
## ГЛАВА IV.4. ВЪГЛЕХИДРАТНИ СТРУКТУРИ НА МЕДНИ ГЛИКОПРОТЕИНИ (СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗИ И ХЕМОЦИАНИНИ)

В научната литература съществуват доказателства, че повечето хемоцианини от молюски са гликопротеини, някои хемоцианини от артроподи и ензимите супероксид дисмутази, но все още въгледридатните им структури не са добре изучени. Ето защо основна част в този дисертационен труд заемат представените изследвания върху олигозахаридните структури на пречистените гликопротеини.

### IV.4.1. ВЪГЛЕХИДРАТНА СТРУКТУРА НА Cu/Zn-СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗИ

#### Въгледридатна структура на Cu/Zn-СОД от гъбичен щам *H. lutea* 103

Установената гликозилирана природа на Cu/Zn-СОД-зи от гъбичен щам *H. lutea* 103 е направена на база на определените два потенциални гликозилирани центъра на позиции Asp23 и Asp33 в АКП на полипептидната верига на ензима (Dolashka-Angelova et al., 2004a).



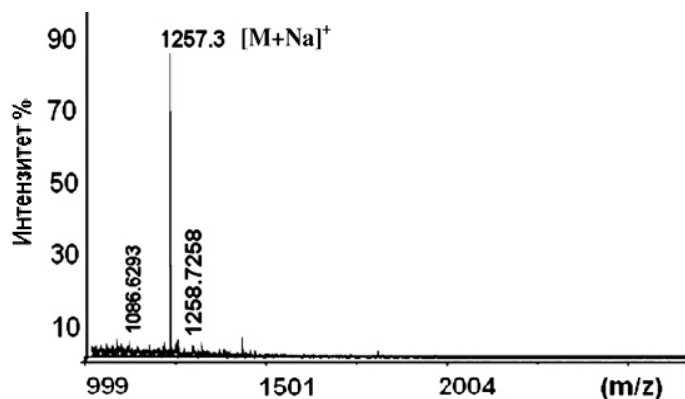
**Фиг. 14.** MS анализ на:  
**А)** интактна молекула на Cu/Zn-HiCOD 103;  
**Б)** Cu/Zn-HiCOD 103 след третиране на ензима с гликозидаза PNGase F.

Представените MALDI-MS спектри на гликопротеина, преди и след отстраняване на гликана със специфична гликозидаза PNGase F, показва разлика от 203 Da между измерената Мм 15935.2 Da на гликозилираната Cu/Zn-HiCOD 103 (Фиг. 14А) и Мм 15732.2 Da (Фиг. 14Б) на получената дегликозилирана форма на ензима. Разликата отразява Мм 16+203 Da на един монозахарид и окислен Met44. На база на тези анализи е изказано предположение за структурата на гликана, изграден от *N*-ацетилгалактозамин, която представлява 1.4% от Мм на Cu/Zn-СОД-зи от гъбичен щам *H. lutea* 103 (Dolashka-Angelova et al., 2004a) Допълнително потвърждение за свързан *N*-GlcNAc към *N*-гликозилирания център Asn23-Glu-Ser представлява разликата от 203 Da между измерената Мм (945.5 Da) за гликопептида и изчислената Мм от АКП на пептида (Dolashka-Angelova et al., 2004a).

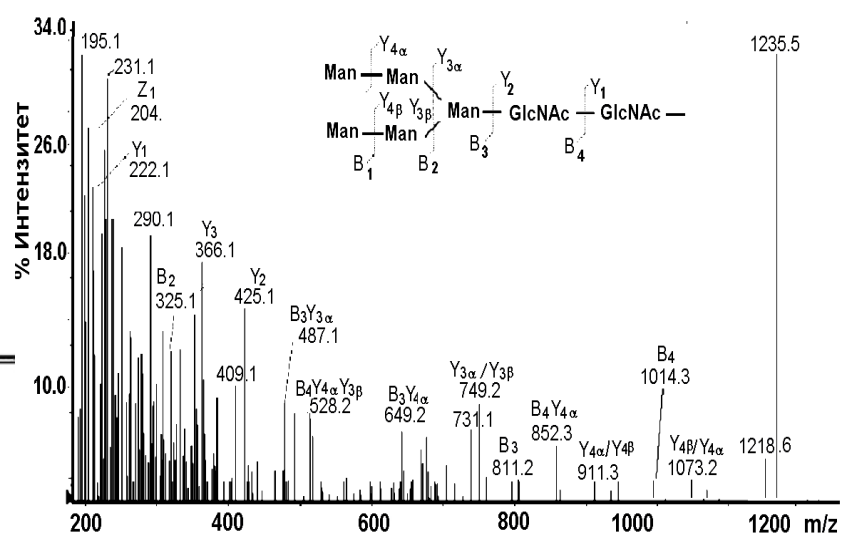
### **Въглехидратна структура на Cu/Zn-СОД от дрожди *K. marxianus* NBIMCC 1984**

Представените резултати за изолирания природно гликозилиран ензим (Cu/Zn-KmCOD) от дрожди *K. marxianus* NBIMCC 1984 разширяват информацията за гликозилирани СОД-зи (Dolashka-Angelova et. al., 2010b). Разработеният нов подход за отделяне на гликаните от протеина след третиране на ензима с гликозидаза PNGase F и елуиране на Carboglyph колона с 25% ACN, 01% ТФА, доказва един гликан в структурата на Cu/Zn-KmCOD, изразен на MS спектъра от йон с  $m/z$  1257.3  $[M+Na]^+$  (Фиг. 15А).

Гликозилираният център е доказан след ензимна хидролиза с трипсин на Cu/Zn-KmCOD NBIMCC 1984 и анализ на получените пептиди с MALDI-TOF-TOF. Сложната структура на олигозахарида Hex<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, изразена от йон с  $m/z$  1235.5  $[M+Na]^+$ , е определена след интерпретиране на фрагментните Y- и B-йони в MS/MS спектъра, заснет с Q-Trap система.

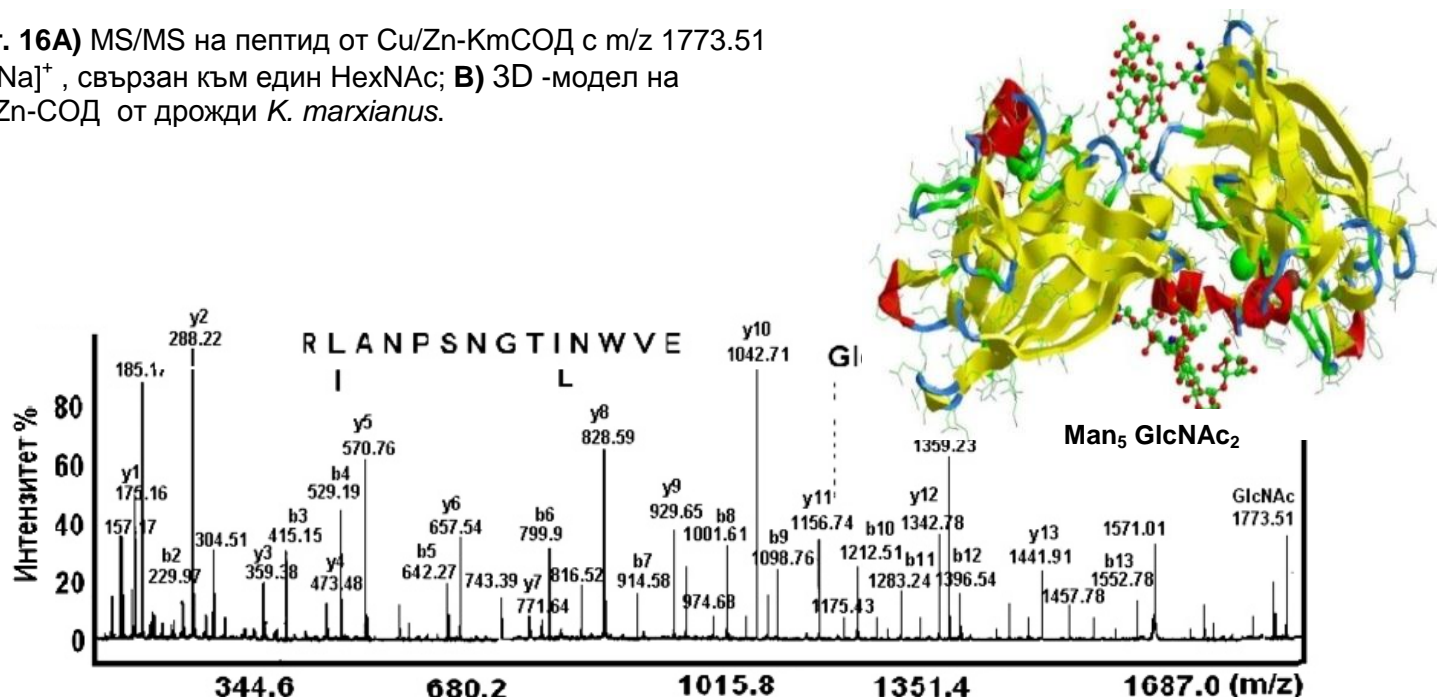


**Фиг. 15А.** MALDI-MS на *N*-гликан от Cu/Zn-KmCOD.



**Б)** MS/MS анализ и структура на гликан с  $m/z$  1255.52  $[M+Na]^+$ , изолиран от Cu/Zn-KmCOD.

**Фиг. 16А)** MS/MS на пептид от Cu/Zn-КмСОД с  $m/z$  1773.51  $[M+Na]^+$ , свързан към един HexNAc; **В)** 3D -модел на Cu/Zn-СОД от дрожди *K. marxianus*.



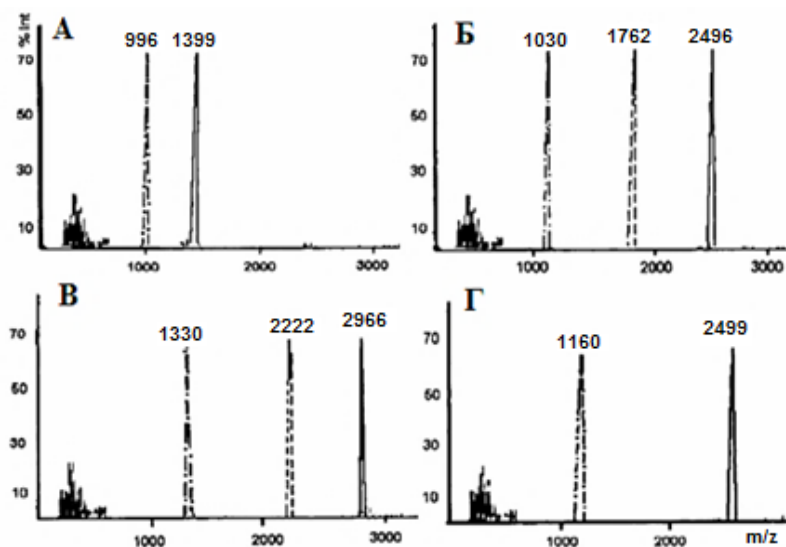
Наблюдаваната комбинация от йони (Фиг. 16А) потвърждава структурата на гликана и позицията на свързване 32-35 (-Asn-Ile-Thr-) на гликана към полипептидната верига. Потвърждение на гликозилирания характер на ензима е изразения на MS/MS пептид с йон  $y_{11}$  и Мм 1773,51 Da (Фиг. 16А), както и построения 3D -модел на гликопротеина (Фиг. 16Б).

#### IV.4.2. ВЪГЛЕХИДРАТНА СТРУКТУРА НА ХЕМОЦИАНИНИ ОТ ВИД *ARTHROPODA*

##### *Въгледхидратна структура на хемоцианин от рак C. aestuarii*

Гликозилираният характер на пречистените хемоцианини от артроподи HaH, MsH, PvH, CaеH, EvH и LpH, както и субединиците им е предсказан чрез орцинол// $H_2SO_4$  тест. Проведените анализи определят хемоцианина от *C. aestuarii* като гликопротеин, но от четирите субединици са доказани гликани само в CaеSS2. Въгледхидратната структура на субединицата е представена след ензимна хидролиза с трипсин и разделяне на фракциите на колона Superdex 300. Тестът орцинол// $H_2SO_4$  също отчита гликани само в една от тези фракции (Dolashka-Angelova et al., 2001; 2005b).

Потвърждение на гликозилирания характер на CaеSS2 е определената АКП, която включва типичните за O-гликозилиране Ser/Thr центрове в гликопептиди G1, G2, G3 и G4, изолирани на колона Nucleosil 7 C18 и HPLC. Характерни O-гликозилирани центрове са установени при G4, който включва и един N-гликозилиран център (Asp-Xxx- Ser/Thr).



**Фиг. 17** MALDI-MS анализ на гликопептиди G1-G4.

**А,Б,В)** Гликопептиди G1-G3 (плътни линии); нови фракции след третиране на гликопептидите с неураминидаза и  $\alpha$ -N-ацетилгалактозаминидаза (пунктирени линии); **Г)** Гликопептид G4 след третиране с PNGase-F.

**Табл. 7.** Структура на гликопептиди (G) от субединица CaеSS2 на хемоцианин от *C. aestuarii*

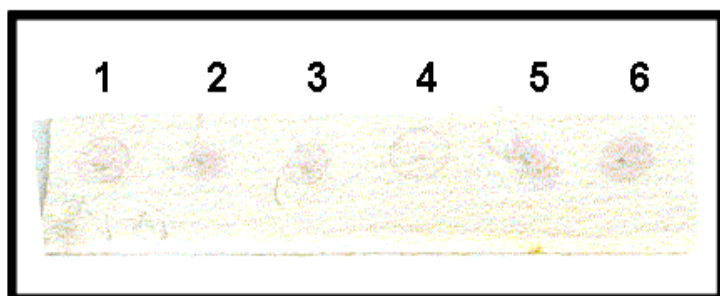
Фракция	Мм на G	Мм на G след третиране с неураминидаза	Мм на пептид	Мм на гликан	Предполагаема въглехидратна структура	Център на свързване
1	1399	1399	995	404	GalNAc <sub>2</sub>	Tht-Gln-Ser
2	2496	1762	1030	1466	<i>N</i> -Acetyl- <i>O</i> -di-NeuAc <sub>2</sub> Gal <sub>3</sub> GalNAc <sub>2</sub>	Ser-Pro-Ser
3	2855	2222	1330	1525	<i>N</i> -Acetyl- <i>O</i> -di-NeuAc <sub>2</sub> Gal <sub>3</sub> GalNAc <sub>2</sub>	Ser-Tyr-Ser
4	2498	2498	1150	1348	SO <sub>4</sub> Man <sub>4</sub> GlcNAc <sub>3</sub>	Asp-Asn-Ser

На база на тази предварителна информация са определени структурите на четири гликопептида след третиране с различни специфични ензими (фиг. 17). Съпоставяне на представените йони в MS за всички гликопептид, преди и след третиране със специфични гликозидази, определя вида на гликозилиране (Фиг. 17А-В). Установената промяна на йоните след третиране с PNGase-F доказва един *N*-гликозилиран център, разположен в G4 (Фиг. 17Г) (Табл. 7) (Dolashka-Angelova et al., 2005b).

Показаните на фигура 17 структури на изолираните гликопептиди от субединица CaеSS2 се различават съществено от олигозахаридните структури на гликани при СОД-зи. Също измереното по-високо въглехидратно съдържание (1.6%) в молекулата на CaH и 6.3% за CaеSS2 е необичайно за хемоцианини от вид *Arthropoda*.

#### **Въглехидратна структура на хемоцианин от рак *E. verrucosa* и от скорпион *B. indicus***

Потвърждение на гликозилираната структура на хемоцианини от вид *Arthropoda* са представените въглехидратни структури на хемоцианин от рак *E. verrucosa* (Dolashki et al., 2015) и от скорпиони *B. indicus* (Ali et al., 2000).



**Фиг. 18.** Орцинол/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> тест на субединици EvH1-4 след допълнително пречистване с HPLC система.

Силикагелна плака: позиция 1 - EvH1; позиция 2 – EvH2; позиция 3 - EvH3; позиция 4 - EvH4; позиция 5 – нативна EvH; позиция 6 - CaSS2.

За разлика от структурните субединици на хемоцианин от рак *C. aestuarii*, сравнителният орцинол/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> тест представя три гликопротеина (EvH1, EvH2 и EvH3) от четирите пречистени субединици EvH1, EvH2, EvH3 и EvH4 на EvH, като индикация за въглехидратно съдържание не е отчетена само при EvH4 (Фиг. 18) (Dolashki et al., 2015).

Доказателство за негликозилирания характер на EvH4 също е отсъствието на *N*-свързан център (-NXT/S-) в определената първична структура на субединица EvH4. Въпреки че в АКП на EvH4 са представени три възможни *O*-гликозилирани центъра, MALDI-MS доказват отсъствие на свързани въглехидратни вериги (Dolashka-Angelova et al., 2005b).

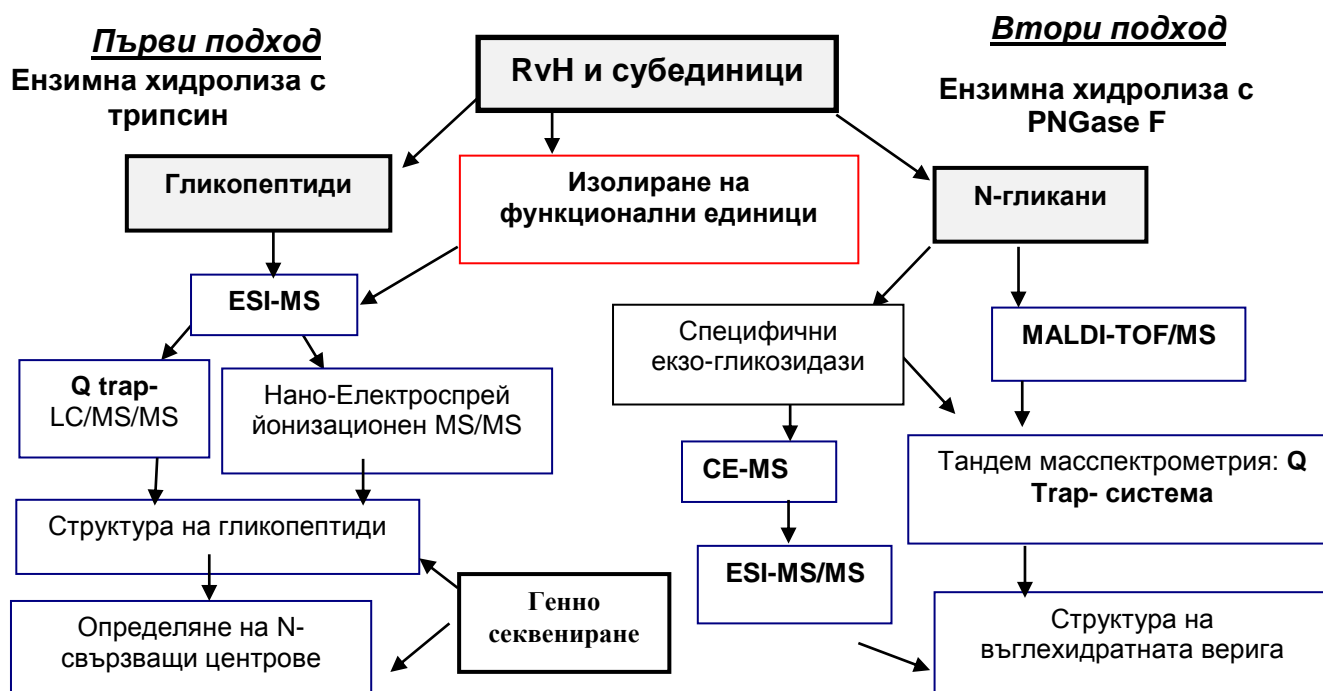
Информация за възможни гликозилирани центрове и за въглехидратно съдържание също е представена от АКП на субединица Bsin1 на хемоцианин от скорпиони *B. indicus*. Отчетената разлика (0.5%) между измерената Мм на Bsin1 чрез MALDI-MS (72423.7 Da) и теоретично изчислената Мм (72103.9 Da) от АКП на Bsin1 вероятно се дължи на гликозилираната структура на Bsin1 (Ali et al., 2000).

#### IV.4.3. ВЪГЛЕХИДРАТНА СТРУКТУРА НА ХЕМОЦИАНИНИ ОТ ВИД *MOLLUSCA*

Проведените изследвания върху въглекхидратните структури на хемоцианини от молюски представляват важна част от дисертационния труд, като са представени олигозахаридните структури на хемоцианини от охлюв *R. venosa*, градински охлюв *H. lucorum* и мидата *H. tuberculata*, които обитават места с различни условия на живот.

##### IV.4.3.1. Въглекхидратна структура на хемоцианин от охлюв *Rapana venosa*

На база на публикуваната информация за сложната олигозахаридна структура на хемоцианини е разработена и приложена нова стратегия за анализ на въглекхидратната структура на RvH1 (12.4%) и RvH2 (4.4%) RvH (Фиг. 19).



Фиг. 19. Схема за анализ и определяне на въглекхидратната структура на RvH1, RvH2 и ФЕ-ци. В основата на тази стратегия са заложили два основни подхода:

#### ПЪРВИ ПОДХОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВЪГЛЕХИДРАТНАТА СТРУКТУРА НА RvH Изолиране и характеризиране на гликопептиди от ФЕ-ци на RvH

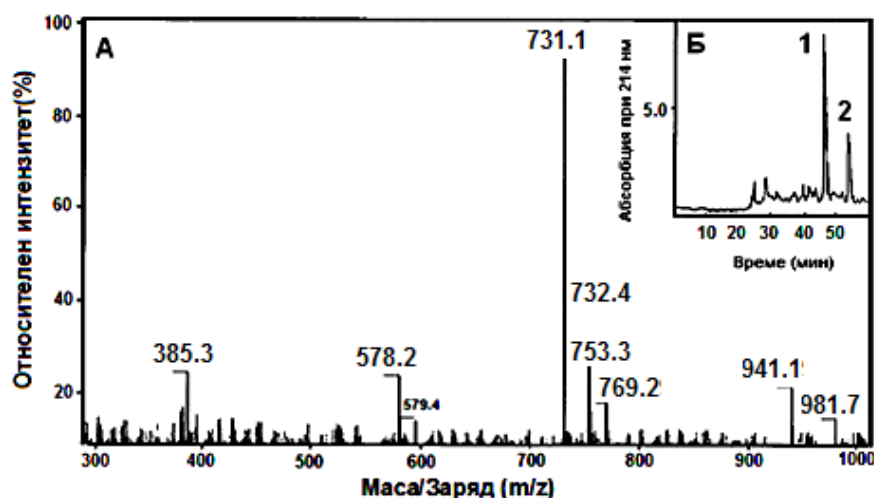
Първият подход от разработената и приложена стратегия включва трипсинолиза на ФЕ-ци от RvH1 и разделяне на получените фрагменти на колона Superdex 300 (Фиг.19). Чрез него е представена информация за олигозахаридните структури на RvH1-a, RvH1-f и RvH1-b, което го определя като подходящ за изясняване на сложните въглекхидратни структури на хемоцианини от молюски (Beck et al., 2007; Dolashka-Angelova et al., 2003b). АКП на тези ФУ са определени чрез Едманово разграждане след отстраняване на гликаните от протеина с гликозидаза PNGase-F, а положителният орцинол/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> тест доказва два (Glp1 и Glp2) гликопептида в RvH1-a и само един (Glp3) в RvH1-f.

Потвърждение на сложни въглекхидратни структури на трите гликопептида (Glp1, Glp2 и Glp3) (Табл. 8) са представени след третиране с различни гликозидази и анализи с CE-MS и ESI-MS. Показаните фрагментни йони в MS/MS на фигура 20 предсказват структурата на Glp1 (Dolashka-Angelova et al., 2004b). Проведените експерименти с ESI-MS също определят структурата на гликопептид Glp2, като свързан гликан с Мм 1653 Da (Фиг. 20А) към пептид с Мм 1175.7 Da (Фиг. 20Б) (Табл. 8).

**Табл. 8.** Анализ на гликопептиди от RvH1-a и RvH1-f преди и след третиране с PNGase-F. Мм на фракциите : **а)** измерена с MALDI-MS; **б)** изчислена Мм от АКП

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

Тези резултати доказват сложните биантенни структури на гликани с включени метилирани галактози, свързани към Glp1 и Glp2, които се различават от структурата на гликопептид Glp3 от ФЕ RvH1-f (Фиг. 20B) (Dolashka-Angelova et al., 2003).



**Фиг. 20А.** ESI-MS анализ на Glp1 след ензимна хидролиза със специфични гликозидази: PNGase-F,  $\alpha$ 1-2,3 манозидаза и  $\beta$ 1-2,3,4,6-GlcNAcase.

**Б)** СЕ на получените фрагменти след третиране на Glp2 с PNGase-F.

<b>RvH1-a</b>	<b>Гликопептид 1</b>	SO <sub>4</sub> Man( $\alpha$ 1-6) $\kappa$ 3MeGlcNAc( $\beta$ 1-2) $\leftarrow$ Man( $\beta$ 1-4) GlcNAc( $\beta$ 1-4) GlcNAc-ol 3MeGal( $\beta$ 1-3) GlcNAc( $\beta$ 1-2) Man( $\alpha$ 1-3) $\leftarrow$
<b>RvH1-a</b>	<b>Гликопептид 2</b>	3MeGal( $\beta$ 1-3) GlcNAc( $\beta$ 1-2) Man( $\alpha$ 1-6) $\kappa$ Man( $\beta$ 1-4) GlcNAc( $\beta$ 1-4) GlcNAc-ol 3MeGal( $\beta$ 1-3) GlcNAc( $\beta$ 1-2) Man( $\alpha$ 1-3) $\leftarrow$
<b>RvH1-f</b>	<b>Гликопептид 3</b>	Man( $\alpha$ 1-6) $\kappa$ Man( $\beta$ 1-4) GlcNAc( $\beta$ 1-4) GlcNAc-ol 3MeMan( $\alpha$ 1-3) $\leftarrow$

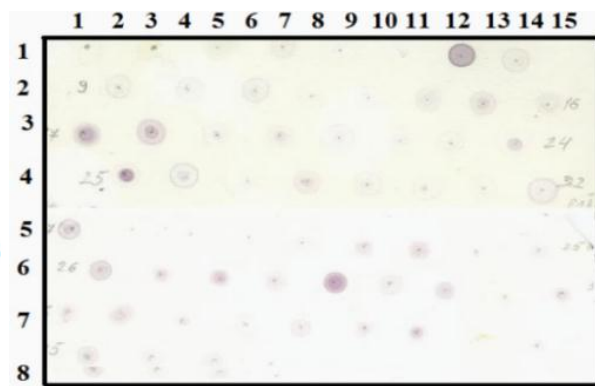
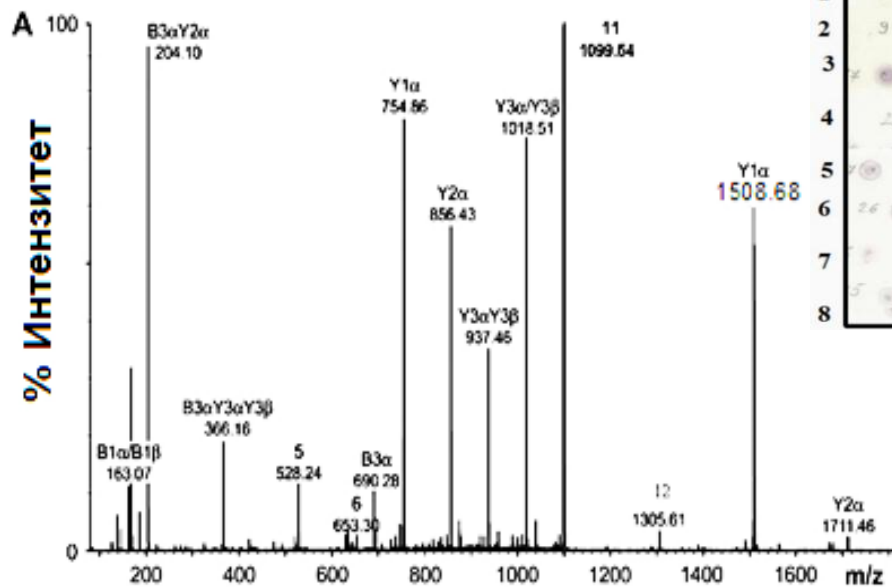
**В)** Предполагаеми въглехидратни структури на Glp1, Glp2 и Glp3. (Dolashka-Angelova et al., 2004b).

Чрез разработения подход за първи път е предоставена подробна информация за структурата на три гликана в RvH, като са потвърдени въглехидратните структури на хемоцианини от мекотели, с включени метилирани монозахариди.

### **Структура на гликопептиди от RvH, определена чрез LC/ESI-MS**

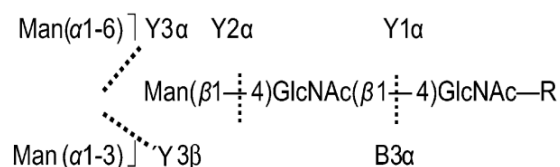
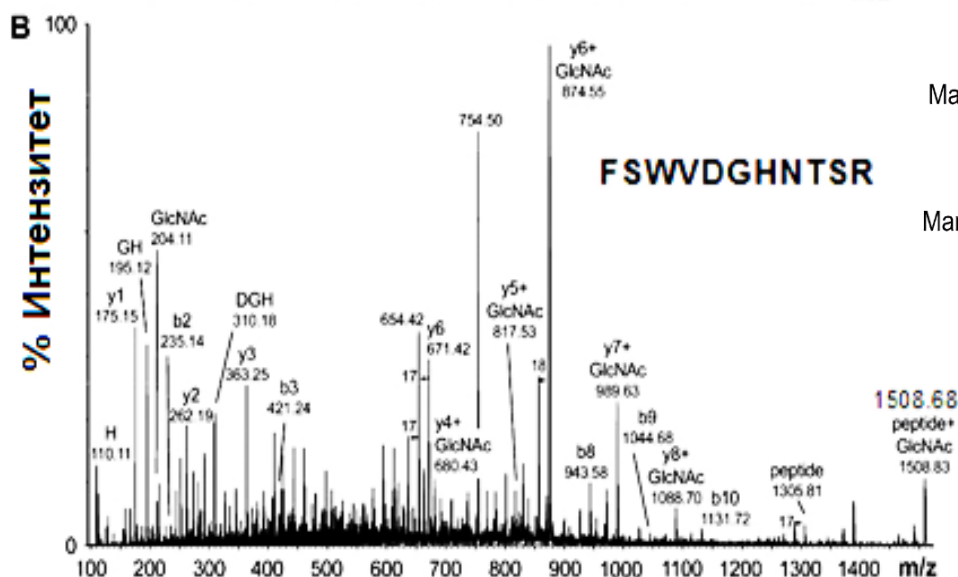
Някои от получени след трипсинолиза на RvH1 и идентифицирани на силикагелна плака гликопептиди са анализирани с nano-ESI-MS (Фиг. 21). След проследяване на фрагментните йони на MS/MS анализа на йон с  $m/z$  1099.5  $[M+2H]^{2+}$ , е определена олигозахаридната структура на два гликопептида, G2 (Мм 2197.0 Da) (Фиг. 22A) и на G3 чрез тандем-маспектрометрия. Подробни структурни детайли за гликопептида са представени след сканиране с псевдо-MS/MS при по-високо напрежение и енергия на сблъсък (Фиг. 22B), в резултат на което е определена АКП (FSWVDGHNTSR) на пептид с Мм 1508.83 Da и един *N*-свързан център с GlcNAc. Разликата от 203 Da между два йона с  $m/z$  1305.81  $[M+2H]^{2+}$  и с  $m/z$  1508,83  $[M+2H]^{2+}$ , представя свързан HexNAc към пептид с





**Фиг. 21.** Орцинол/ $H_2SO_4$  тест на получените фракции на RvH1 след трипсинолиза.

**Фиг. 22А.** MS/MS анализ на гликан от G2 с  $m/z$  1099.54  $[M+2H]^{2+}$ ; енергия на сблъсък в клетката 37 eV.



**(Б)** Псевдо-MS/MS/MS на фрагментиране на пептида, свързан с един HexNAc ( $m/z$  1508.68), приложено напрежение 95 V и енергия на сблъсък 80 eV.

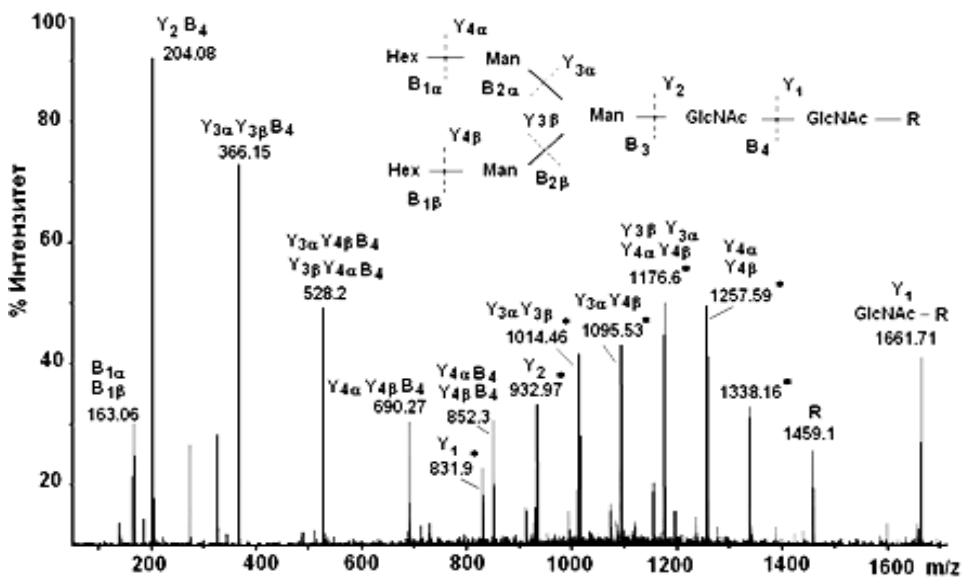
Мм 1305.81 Da, което е доказателство за гликозилираната структура на гликопептида (Beck et al., 2007)..

Интересна структура притежава и друг гликопептид от RvH1 с  $m/z$  972.5  $[M+2H]^{2+}$  (Мм 1944.0 Da), представен от свързан гликан с  $m/z$  1108,67  $[M+2H]^{2+}$   $\text{Man}(\alpha 1-6)\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)[\text{Fuc}(\alpha 1-6)]\text{GlcNAc-R}$  към Asn от пептида AENITTTTR с Мм 905,5 Da.

Потвърждение на гликозилирания характер на субединица RvH1 са проведените  $\mu\text{LC}/\text{ESI-MS}$  анализи на получените фракции след хидролиза на RvH1. Доказани са три гликопептида с Мм 2745.5 Da, 2421.0 Da и 2907.1 Da, в елуираните на 18.5 и на 20.78 min фракции, към които също са свързани въглехидратни структури от високо манозен вид (Dolashka-Angelova et al., 2003a; 2004b).

### **Структури на гликопептиди от RvH, определени чрез нано-ESI-MS**

Допълнение към информацията за въглехидратната структура на RvH са и представените гликопептиди след комплексен нано-ESI-MS анализ, които са изолирани след трипсинолиза на RvH1 и RvH2. Доказани са структурите на гликаните, АКП на пептидите и гликозилираните центрове на гликопептидите (Beck et al., 2007).

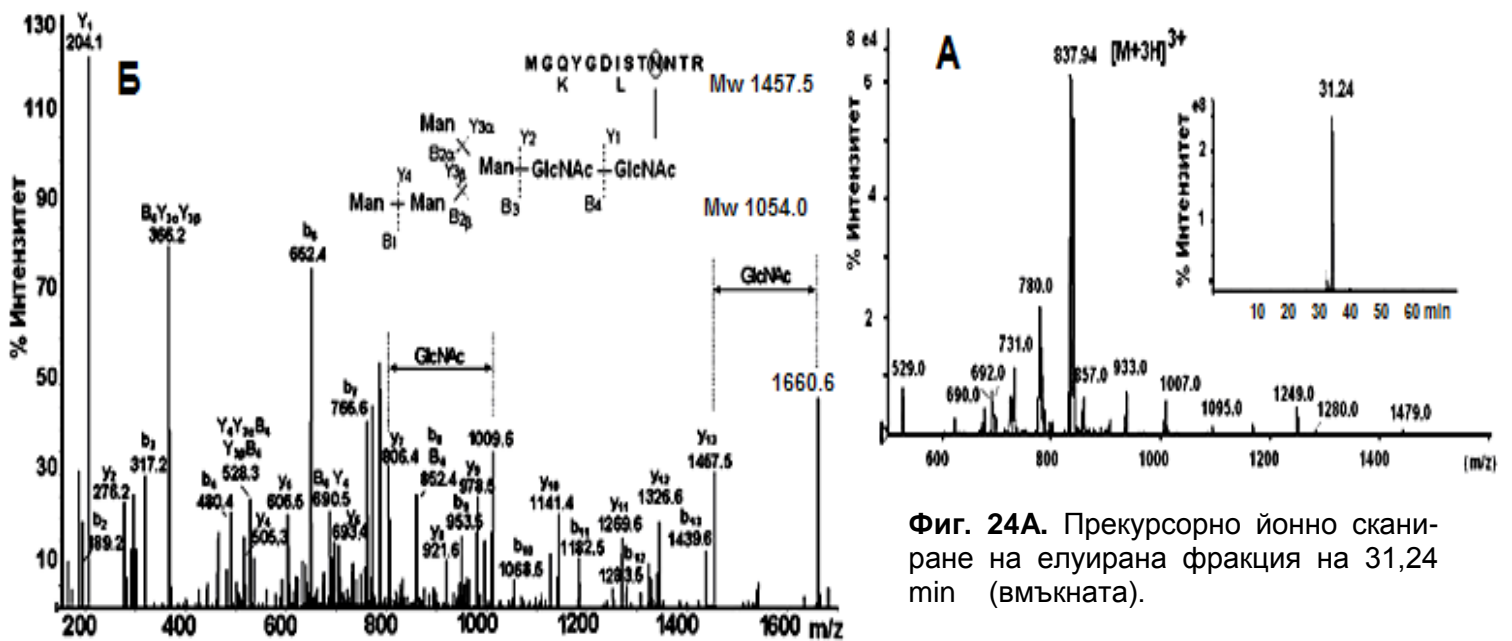


Фиг. 23. Нано-ESI-MS/MS анализ на свързан гликан към гликопептид G1, представен от йон с  $m/z$  1338.16  $[M+2H]^{2+}$ .

От представения на MS/MS йон с  $m/z$  1338.16  $[M+2H]^{2+}$  е изчислена Мм 2676.32 Da на един гликопептид от RvH1, а фрагментният йон с  $m/z$  1661.71 определя *N*-свързан гликан към пептид (R-) с  $m/z$  1459.75  $[M+H]^+$  и един GlcNAc (Фиг. 23).

### Структури на гликопептиди от RvH, определени чрез Q-trap LC/MS/MS система

Потвърждение на изразеното предположение за въглехидратната структура на RvH1 е постигнато чрез комбиниран анализ на гликопептиди с LC/MS и Q-trap системи след предварително сканиране на фракциите за йони с  $m/z$  163 (Hex<sup>+</sup>), 204 (HexNAc<sup>+</sup>) и 366 (HexHexNAc<sup>+</sup>) (Dolashka-Angelova et al., 2009; Dolashka et al., 2009).



Фиг. 24А. Прекурсорно йонно сканиране на елуирана фракция на 31,24 min (вмъкната).

Б) EPI сканиране при повишена резолюция на йон с  $m/z$  837.97  $[M+3H]^{3+}$ .

Получената при висока резолюция на сканиране LC/MS/MS хроматограма, на елуираната фракция на 31.24 min, изразява един доминиращ йон с  $m/z$  837.97  $[M+3H]^{3+}$  (Фиг. 24А), който представя гликопептид с Мм 2511.91 Da (Фиг. 24Б). Другите фрагментни *y*- и *b*-йони определят АКП на пептид MGQYGD(I/L)STNNTK (Фиг. 24Б), като очертават два потенциални центъра на гликозилиране (-D(L/I)S- и -NNT-), маркирани от йон  $b_{13}$  с  $m/z$  1439.6  $[M+H]^+$  или йон  $y_{13}$  с  $m/z$  1457.5  $[M+H]^+$ . Проведените анализи с LC/MS и Q-trap на гликопептид с Мм 2511.91 Da също доказват един свързан високоманозен гликан Hex<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (Мм 1054.0 Da) към център (-NNT-) от гликопептида.

## ВТОРИ ПОДХОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ВЪГЛЕХИДРАТНАТА СТРУКТУРА НА RvH

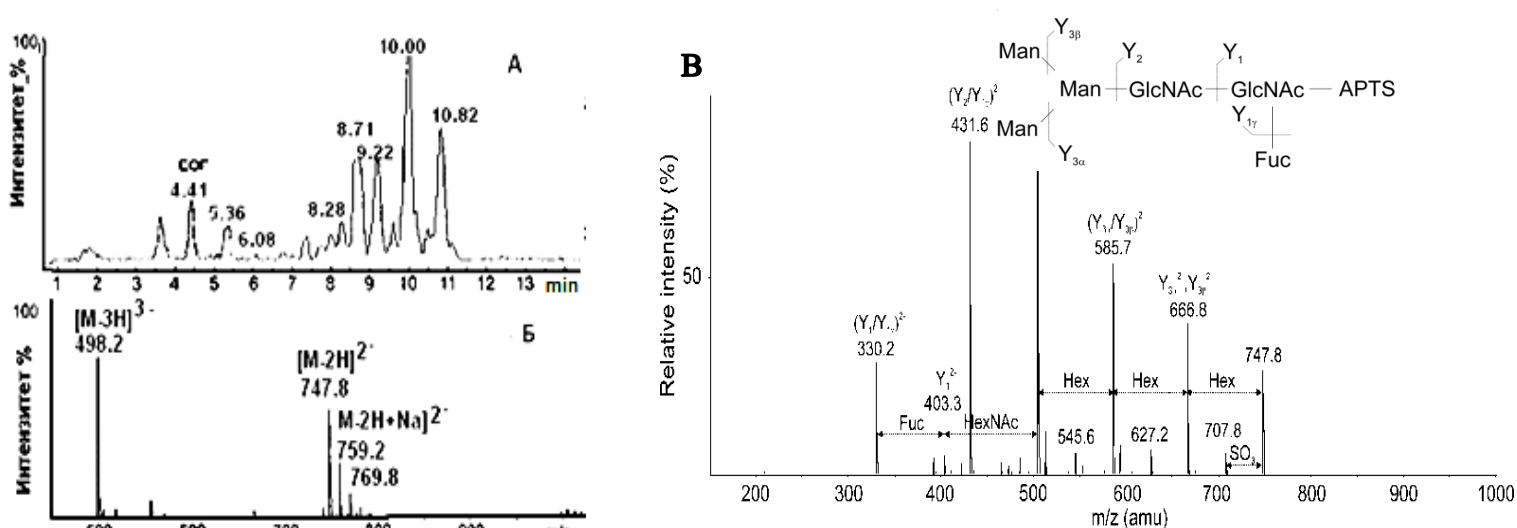
### Изолиране и характеризиране на N-свързани гликани от RvH с MALDI-TOF-MS

Като недостатък на приложения първи подход при анализ на MS на гликопептиди е установено затруднение при интерпретиране на голямото разнообразие на фрагментни у- и в-йони, които представляват фрагменти от пептида, както и Y- и B-йони, които са фрагменти от гликана. Този проблем е решен след прилагане на втория подход, при който гликаните са отделени от субединици RvH1 и RvH2 със специфична гликозидаза PNGase, след което са анализирани чрез маспектрометричен анализ.

Частична информация за структурата на елуирани гликани на Carbohydrate колоне с 2 ml 25% ACN и 0.05% TFA е установена след отчитане с MALDI-TOF и CE на промените в MS преди и след третиране на гликаните с други гликозидази, като:  $\alpha$ -1,2,3,4,6-фукозидаза  $\beta$ -галактозидаза,  $\alpha$ -1,2,3-манозидаза  $\beta$ -1,2,3,4,6-N-ацетилглюкозаминидаза. Интерес представлява третирането на гликаните с  $\beta$ -галактозидаза, което не води до промяна на йоните в MS и предполага отсъствие на Gal остатък (Dolashka et al., 2010a; Sandra et al., 2007).

### Структури на N-гликани от RvH, определени чрез капилярна електрофореза и маспектрометричен анализ

Прилагането на комбиниран подход на CE с MS анализи го определя като най-подходящ за интерпретиране на структурите на гликани, с ниски концентрации в смеси. Чрез този подход е представена структурата Man<sub>3</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> на елуирания на 10 min гликан от RvH1 след маркиране с 8-аминопирен-1,3,6-трисулфонат (APTS) (Фиг. 25A), който на CE-MS/MS е представен с отрицателно заредени йони с m/z 747.8 [M-2H]<sup>2-</sup> и m/z 498.2 [M-3H]<sup>3-</sup> (Фиг. 25B, B). В подкрепа на позицията на свързване на Fuc към началния GlcNAc остатък от гликана е йон с m/z 748 [M-2H]<sup>2-</sup> в MS/MS анализа (Sandra et al., 2007).

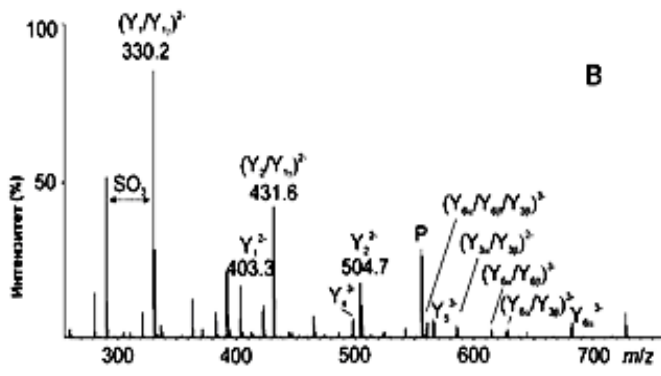
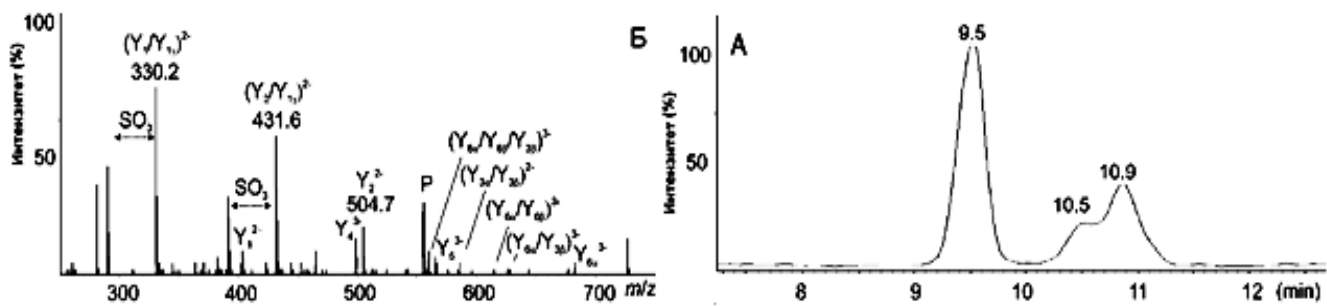


Фиг. 25. Комбиниран анализ на гликопептид с m/z 747.8[M-

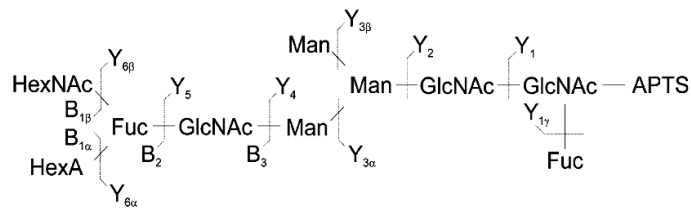
2H]<sup>2-</sup>: А) CE-MS-ПАГЕ на APTS-N-гликани от RvH1; Б) MS на елуирана фракция на 10 min; В) MS/MS на йон с m/z 747.8 [M-2H]<sup>2-</sup>.

#### IV.4.3.2. Доказване на нов вид въгледридратна структура в RvH1 и RvH2

Друго предимство на втория подход и CE-MS/MS са определените сложни структури на гликан с m/z 555.7 [M-3H]<sup>3-</sup> в смеси, които са изразени със сходни MS/MS за двете елуирани изомерни форми на 10,5 и на 10,9 min (Фиг. 26A). Установени са съществени различия в свързвания тризахарид към позиции  $\alpha$ -1,3 на GlcNAc остатък, или  $\alpha$ -1,6-arm от ядрото на двете изоформи на гликана (Фиг. 26B, B).



**Фиг. 26А)** CE-MS/MS анализ на йон с  $m/z$  555.7  $[M-3H]^3$ ; **Б)** MS/MS на елуирана фракция на 10.5 min и **В)** на 10.9 min с йон с  $m/z$  557.8  $[M-3H]^3$  и структура  $Man_5GlcNAc_2$ .

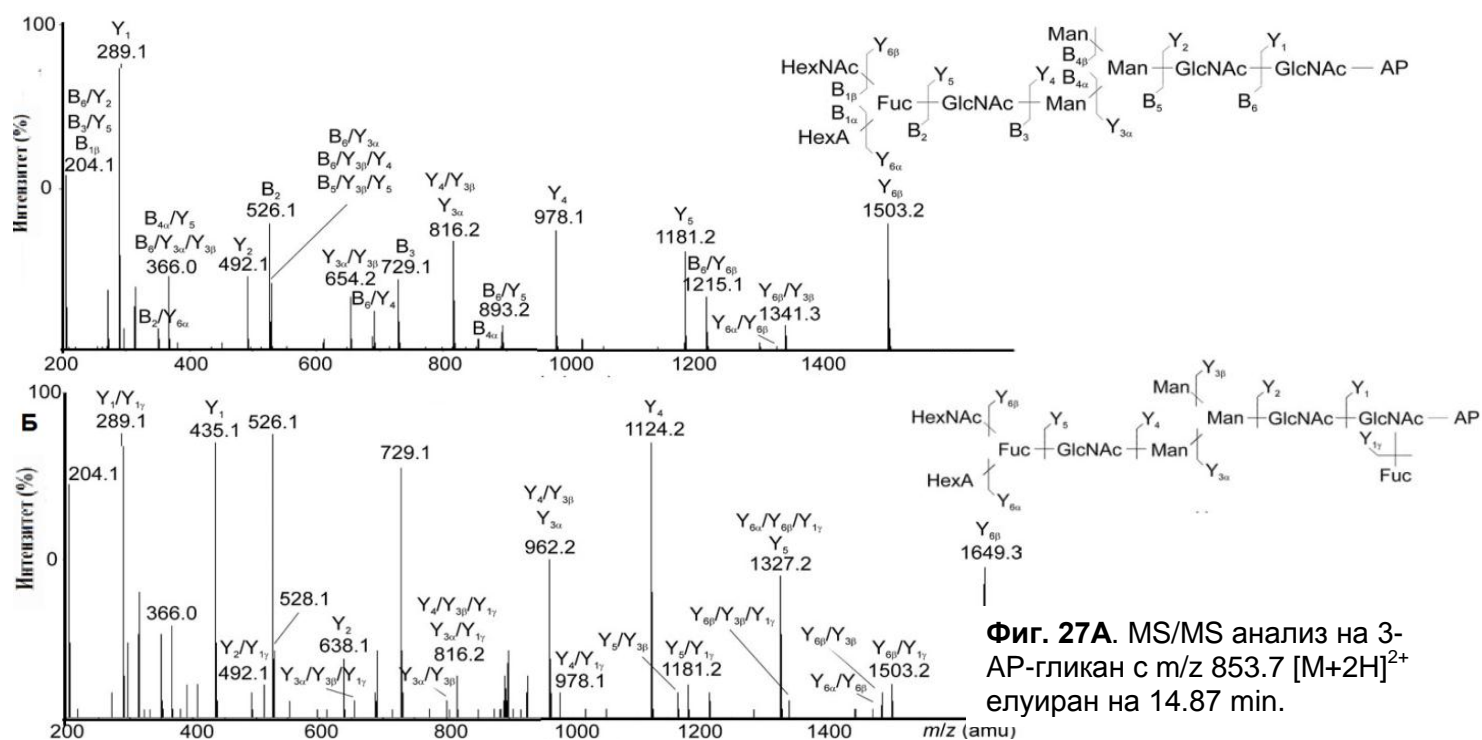


Определените изоформи представят коригирана структура на тризахарид, в който една сулфатна група е заменена с хексууронова киселина (HexA), свързана към Fuc HexNAc фрагмент. Подобни са предсказаните структури и за гликани с  $m/z$  519.2, 569.8 и 606.5  $[M-4H]^4$ , които са изомерни форми с идентични спектри.

На база на тези резултати е изказано предположение, че формирането в RvH1 на специфични структури на гликани с HexA най-вероятно е в резултат от окисляващото обкръжение, в което са разположени (Sandra et al., 2007).

**Анализ на 3-AP- и APTS- белязани гликани от RvH**

За определяне на структурите на гликани от RvH1, с много ниски концентрации в смеси, е приложен и друг нов подход, ката чрез CE-MS и MS/MS са анализирани маркирани с положително зареден 3-AP (3-аминопиразол) гликани. Представените анализи отчитат отместване във времето на елуиране (на 14.87 min и 15.59 min) в смес на два 3-AP-гликана.



**Фиг. 27А.** MS/MS анализ на 3-AP-гликан с  $m/z$  853.7  $[M+2H]^{2+}$  елуиран на 14.87 min.

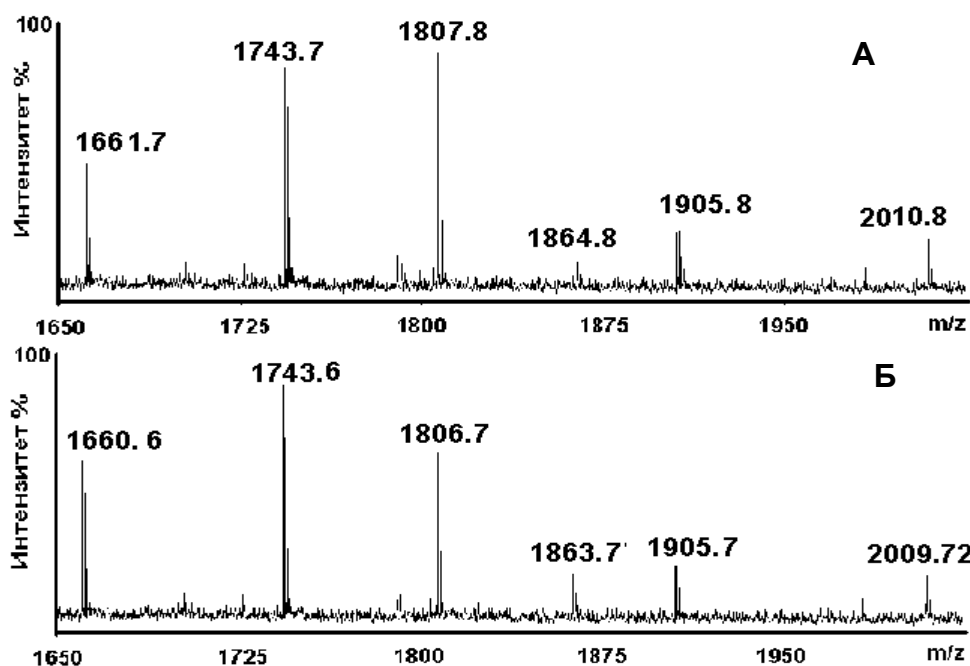
Глиганите, изразени от йон с  $m/z$  853.7 $[M+2H]^{2+}$  (FucHexANexNAcGlcNAcMan<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) (Фиг. 27А) и йон с  $m/z$  1028.5  $[M+2H]^{2+}$  (Fuc<sub>2</sub>HexANexNAcGlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) (Фиг. 27Б), имат сложни структури.

Доказателство за кисел тетразахарид, свързан на позиции  $\alpha$ -1,3 или  $\alpha$ -1,6-ам от триманозната сърцевина на тези глигани, е отчетената в MS/MS разлика между йон с  $m/z$  853.7  $[M+2H]^{2+}$  (Фиг. 27А) и с  $m/z$  926.8 $[M+2H]^{2+}$  (Фиг. 27Б), която съответства на Fuc остатък. Свързан Fuc остатък във вътрешността на веригата и друг към първия GlcNAc от веригата ( $Y_1$  йон с  $m/z$  435 и  $Y_{6\beta}/Y_{1\gamma}$  йон с  $m/z$  1503.2) са представени от йон с  $m/z$  926.8  $[M+2H]^{2+}$  (Sandra et al., 2007).

### **Доказване на хексуронова киселина в структурата на глигани от RvH1 чрез амидиране и перметилиране на глиганите**

Свързването на HexA към кисели глигани е потвърдено с разработен нов метод на амидиране (с NH<sub>4</sub>Cl) и перметилиране (с CH<sub>3</sub>I) на киселите глигани в сместа. В основата на метода е модифициране на карбоксилните групи с NH<sub>4</sub>Cl и DMT-ММ [4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2yl)-4-метилморфолиниев хлорид], след което карбоксилната киселина се превръща в амид, което води до понижаване на Мм на киселите глигани с 0.9840 Da.

Отчетената в MALDI-MS (Фиг. 28А) промяна на Мм на осем N-свързани гликана в RvH1 след амидиране с NH<sub>4</sub>Cl (Фиг. 28Б), доказва свързан HexA в глиганите на RvH. Превръщането на HexA в MeHex води до нарастване на Мм на глиганите с 14 Da след перметилиране (Табл. 9, №14, 17, 19 и 21) (Sandra et al., 2007; Dolashka et al., 2010a).



**Фиг. 28.** MALDI-MS/MS анализ на:

А) неамидирани N-глигани от RvH1

Б) амидирани N-глигани от RvH1

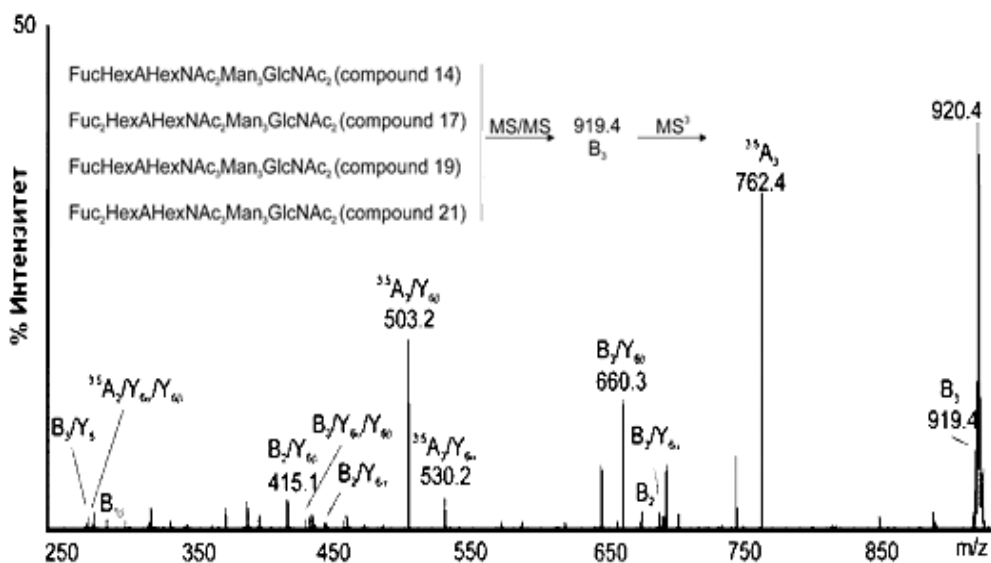
Друго потвърждение на сложните структури в RvH са анализирани с Q-trap на перметилирани глигани в сместа, които са представени от два йона с  $m/z$  660.3 $[M+H]^+$  ( $B_3/Y_{6\beta}$ ) и 919.4 $[M+H]^+$  ( $B_3$ ) (Фиг. 29).

Наблюдаваното понижаване на Мм с 1 Da при два от глиганите след амидиране на гликановата смес на субединица RvH2, е представено от йони с  $m/z$  1661.6  $[M+H]^+$  и с  $m/z$  1807.6  $[M+H]^+$ . Промяната им в нови йони с  $m/z$  1660.4  $[M+H]^+$  и  $m/z$  1806.4  $[M+H]^+$  е доказателство за присъствие на HexA, а не MeHex, при която не се отчита промяна в Мм.

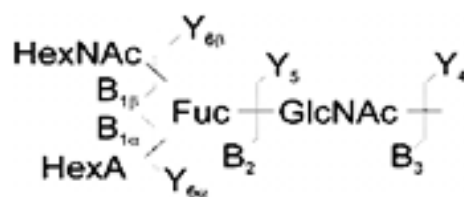
Други интересни структури са представените след анализ с Q-trap на 25 гликана от RvH1 и 28 гликана от RvH2, отделени с PNGase F (Табл. 9).

**Табл. 9.** Състав на *N*-гликани в RvH. <sup>(a)</sup> *N*-гликаните са представени като [M+Na]<sup>+</sup> йони. В скоби е отбелязана Мм на перметирираните гликани. <sup>(b)</sup> *m/z* стойности на APTS-белязани гликани.

	Структура	MALDI <sup>(a)</sup>	CE-MS <sup>(b)</sup>
1	FucMan <sub>2</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	917.3 (1141.4)	444.2 [M-3H] <sup>3-</sup>
2	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	933.3 (1171.4)	449.5 [M-3H] <sup>3-</sup>
3	FucMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1079.5 (1345.5)	498.2 [M-3H] <sup>3-</sup>
4	Man <sub>4</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1095.5 (1375.5)	503.8 [M-3H] <sup>3-</sup>
5	HexNAcMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1136.5 (1416.5)	517.3 [M-3H] <sup>3-</sup>
6	FucMan <sub>4</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1241.6 (1549.5)	552.5 [M-3H] <sup>3-</sup>
7	Man <sub>5</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1257.6 (1579.5)	557.8 [M-3H] <sup>3-</sup>
8	FucHexNAcMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1282.6 (1590.5)	566.2 [M-3H] <sup>3-</sup>
9	HexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1339.6 (1661.6)	585.1 [M-3H] <sup>3-</sup>
10	Man <sub>6</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1419.6 (1783.6)	611.8 [M-3H] <sup>3-</sup>
11	FucHexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1485.7 (1835.6)	634.1 [M-3H] <sup>3-</sup>
12	Man <sub>7</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1581.7 (1987.7)	665.9 [M-3H] <sup>3-</sup>
13	Fuc <sub>2</sub> HexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1631.8 (2009.7)	682.6 [M-3H] <sup>3-</sup>
14	FucHexAHexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1661.7 (2053.7)	519.2 [M-4H] <sup>4-</sup>
15	FucHexNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1688.8 (2080.7)	702.0 [M-3H] <sup>3-</sup>
16	Man <sub>8</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1743.7 (2191.8)	720.2 [M-3H] <sup>3-</sup>
17	Fuc <sub>2</sub> HexAHexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1807.8 (2227.8)	555.7 [M-4H] <sup>4-</sup>
18	Fuc <sub>2</sub> HexNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1834.8 (2254.8)	750.1 [M-3H] <sup>3-</sup>
19	FucHexAHexNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1864.8 (2298.8)	569.8 [M-4H] <sup>4-</sup>
20	Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1905.8 (2395.8)	774.0 [M-3H] <sup>3-</sup>
21	Fuc <sub>2</sub> HexAHexNAc <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2010.8 (2472.8)	606.5 [M-4H] <sup>4-</sup>
22	Fuc <sub>2</sub> HexAHexNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	-	657.2 [M-4H] <sup>4-</sup>
23	Fuc <sub>3</sub> HexA <sub>2</sub> HexNAc <sub>4</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	-	590.3 [M-5H] <sup>5-</sup>



**Фиг. 29.** MS<sup>3</sup> анализ на B<sub>3</sub>-йон с *m/z* 919.4 [M+H]<sup>+</sup> след перметириране на кисел гликан с *m/z* 1038.5 [M+2Na]<sup>2+</sup> (Табл. 9, структура 14). Енергия на възбуждане и сблъсък 70 80 eV.

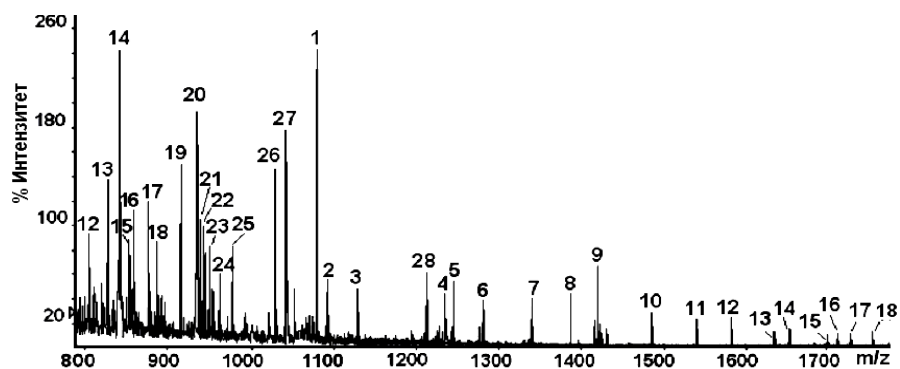


### Структури на *N*-гликани от RvH1 и RvH2, определени чрез Q-trap система

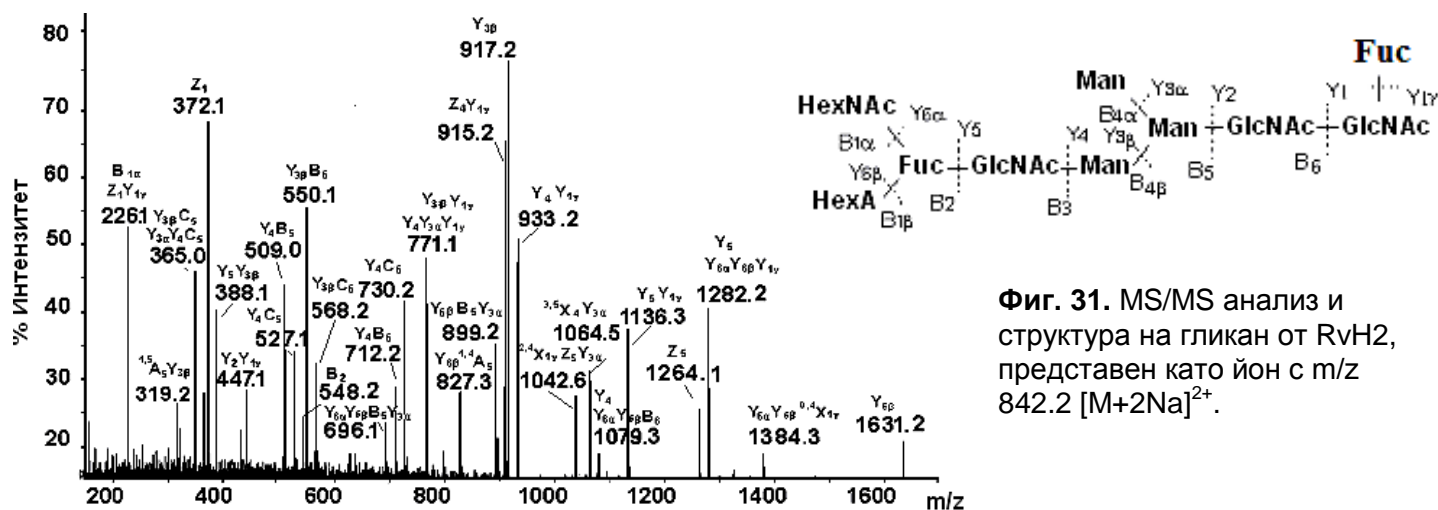
Гликаните са характерни със свързани HexNAc и HexA към вътрешен Fuc остатък, като в RvH1 те са представени от йони с *m/z* 842.2 [M+2Na]<sup>2+</sup> (1661.6) и *m/z* 915.6 [M+2Na]<sup>2+</sup> (1807.6). Само един йон с *m/z* 842.2 [M+2Na]<sup>2+</sup> (1661.6) е идентифициран в RvH2 (Фиг. 30).

В подкрепа на предсказаната сложна структура е и йон с *m/z* 566.6 (B<sub>2</sub>) от MS/MS, който определя вътрешно свързана Fuc към HexNAc от тризахарида (HexNAcHexAFuc), а не към α1,3-Man остатък (Фиг. 31) (Dolashka et al., 2010a).

Подобна структура е установена и за гликан с *m/z* 915.2 [M+2Na]<sup>2+</sup> от RvH2, като единият Fuc остатък е свързан към крайния GlcNAc, а другият към GlcNAc от средата на олигозахарида (*m/z* 1631.2 [M+2Na]<sup>2+</sup>). Сходни структури са предположени за йони с *m/z* 862.7 [M+2Na]<sup>2+</sup> (1702.9), *m/z* 867.2 [M+2Na]<sup>2+</sup> (1711.6) и *m/z* 943.6 [M+2Na]<sup>2+</sup> (1864.8) (Табл. 9).



Фиг. 30. Q-trap-MS анализ на изолирани гликани от RvH2, след третиране с PNGase F.

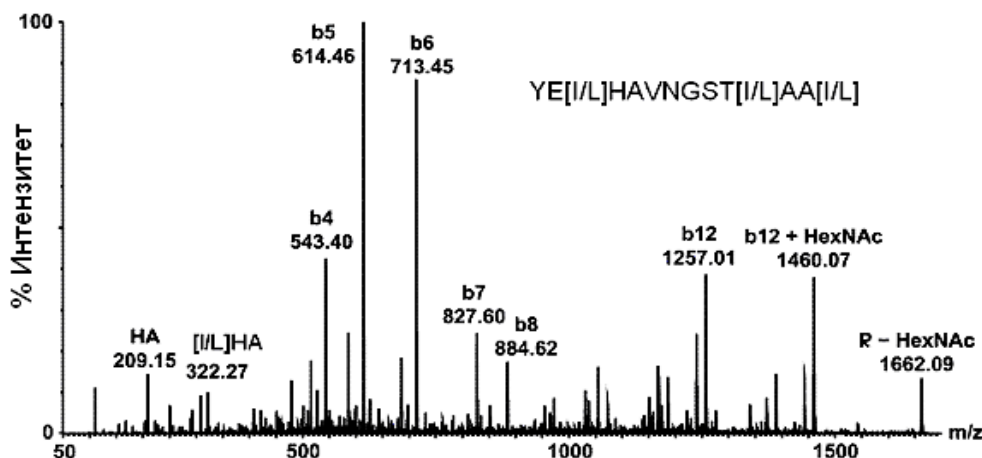


Фиг. 31. MS/MS анализ и структура на гликан от RvH2, представен като йон с  $m/z$  842.2  $[M+2Na]^{2+}$ .

#### IV.4.3.3. Гликозилирани центрове при хемоцианин от *R. venosa*

##### Гликозилирани центрове в RvH, определени с нано-ESI-MS и Q-trap-LC/MS/MS

За определяне на центрoвете на гликозилиране е разработен нов метод, при който фрагментирането на пептидната верига на гликана с нано-ESI-MS и Q-trap-LC/MS/MS системи протича в отсъствие на глигани в кюветата. ESI-MS/MS анализът на гликопептид с  $m/z$  1339.16 $[M-2H]^{2+}$  определя АКП на пептид YE[I/L]HAVN\*GST[I/L]AA[I/L] с Мм 1459.75 Da, към който е свързан един GlcNAc остатък (Фиг. 32). Доказан е *N*<sup>\*</sup>-гликозилиран център (-Asn-X-Ser/Thr-) в пептида (Табл.15, No11), както и на гликопептидите на позиции от 13 до 18 в таблица 10 (Dolashka-Angelova et al., 2003b; Beck et al., 2007). От представената АКП (MGQYGNXSTNNTR) за елуирания на 31.24 min гликопептид са определени два възможни *N*-гликозилирани центъра, но само един свързан гликан към център -**NXS**- е потвърден след тройно квадроупно сканиране (Фиг. 32). Недостатък на този метод представлява ограничената информация за доказване на гликозилираните центрове на гликопептидите.



Фиг. 32. ESI-MS анализ на гликопептид с  $m/z$  1339.16  $[M-2H]^{2+}$ .

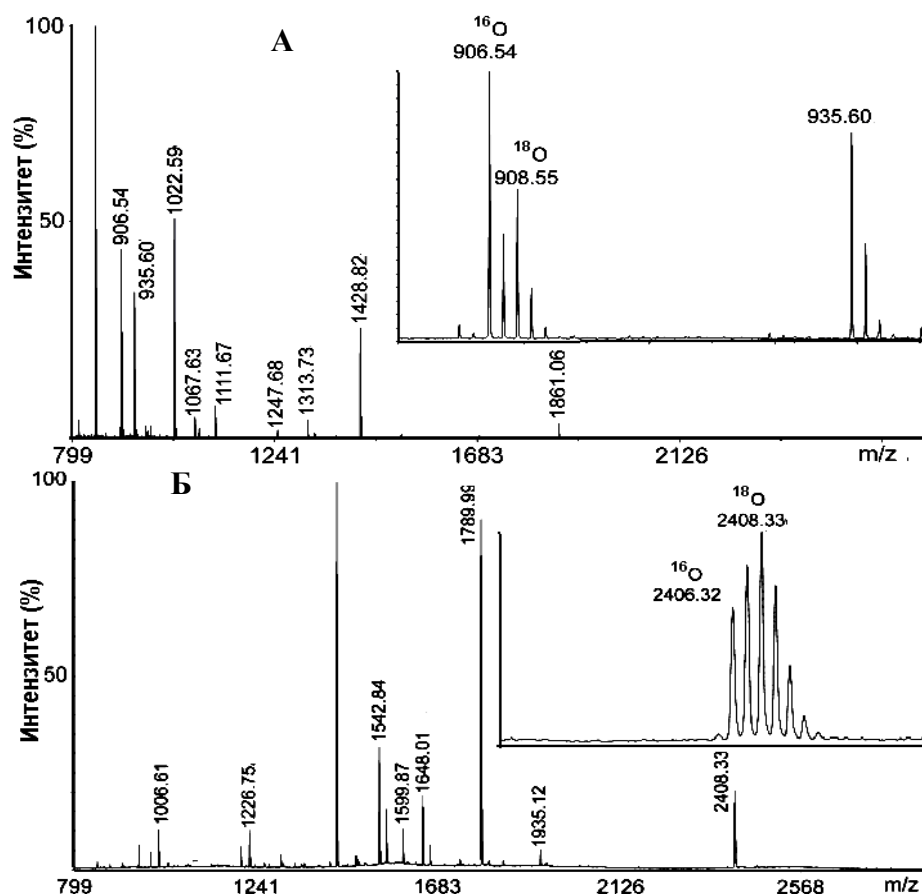
Този проблем е решен след разработване и прилагане на нов подход, който включва анализ на MS/MS спектъра от нано-LC-ESI-MS/MS на трикратно заредените <sup>18</sup>O-белязани пептиди (Sandra et al., 2007).

**Табл. 10.** АКП и въглехидратни структури на гликопептиди от RvH, анализирани чрез ESI-MS, Q-Trap-LC/MS/MS и Q-Trap система. X е неизвестен АКО (Sandra et al. 2007; Dolashka-Angelova et al., 2003b; Beck et al., 2007).

	Гликопептиди	Гликани	Маса/заряд (m/z)
	<b>CE</b>		
1	XVYSV <b>NG</b> TLLGAHVLGSR	HexA HexNAc <sub>2</sub> Fuc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1233 [M+3H] <sup>3+</sup>
2	X—XFSWVDGH <b>NTSR</b>	GlcNAcMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1168 [M+3H] <sup>3+</sup>
3	FQ <b>MD</b> TSLDGYQVAEAFHGLPAK	FucMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1149 [M+3H] <sup>3+</sup>
4	FQ <b>MD</b> TSLDGFQVAEAFHGLPPK	FucMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1153 [M+3H] <sup>3+</sup>
5	LHSYSGSYL <b>NA</b> SLLHX—X	GlcNAcMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1010 [M+4H] <sup>4+</sup>
6	X <b>NG</b> TELSPR	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	968 [M+2H] <sup>2+</sup>
	X <b>NA</b> SELSPR	Hex <sub>5</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1373 [M+2H] <sup>2+</sup>
	<b>ESI-MS</b>		
7	[QK]A <b>EM</b> LTTR	FucMan <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1036 [M+2H] <sup>2+</sup>
8	A <b>EM</b> LTTR	Fuc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	972 [M+2H] <sup>2+</sup>
9	HHGHV[...K... <b>N</b> ...]R	Fuc Man <sub>6</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1396 [M+2H] <sup>2+</sup>
10	FSWVDGH <b>NTSR</b>	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1099 [M+2H] <sup>2+</sup>
11	YE[IL]H <b>AV</b> NGST[IL]AA[IL]	Hex <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1339 [M+2H] <sup>2+</sup>
12	YE[IL]H <b>AV</b> NGST[IL]AA[IL]	Hex <sub>3</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1419 [M+2H] <sup>2+</sup>
	<b>Q trap-LC/MS/MS</b>		
13	MGQY <b>GDL</b> STMNTR	Hex Man <sub>3</sub> HexNAc <sub>2</sub>	837.97[M+2H] <sup>3+</sup>
14	SV <b>NG</b> TLLGSQILGKPY	Fuc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	896 [M+3H] <sup>3+</sup>
	SV <b>NG</b> TLLGSQILGK	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	
15	FSWVDGH <b>NTSR</b>	Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	1099 [M+2H] <sup>2+</sup>
16	A <b>EM</b> TTTR	Fuc Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	972 [M+2H] <sup>2+</sup>
17	F <b>AN</b> ATSIDGPNA	SO <sub>4</sub> MeHexAMeHexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2786 [M+H] <sup>+</sup>
18	E <b>ML</b> TL <b>NG</b> TNLA	MeHex <sub>2</sub> AHexNAc <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	2846 [M+H] <sup>+</sup>

### Определени гликозилирани центрове в RvH след <sup>18</sup>O-белязване на пептиди

Допълнително характеризиране на гликозилираните центрове в RvH е постигнато чрез нов подход, който съчетава отделяне на N-гликаните от протеина с гликозидаза PNGase F и белязване на гликозилираните центрове на RvH1 в буфер с 50% H<sub>2</sub><sup>18</sup>O.

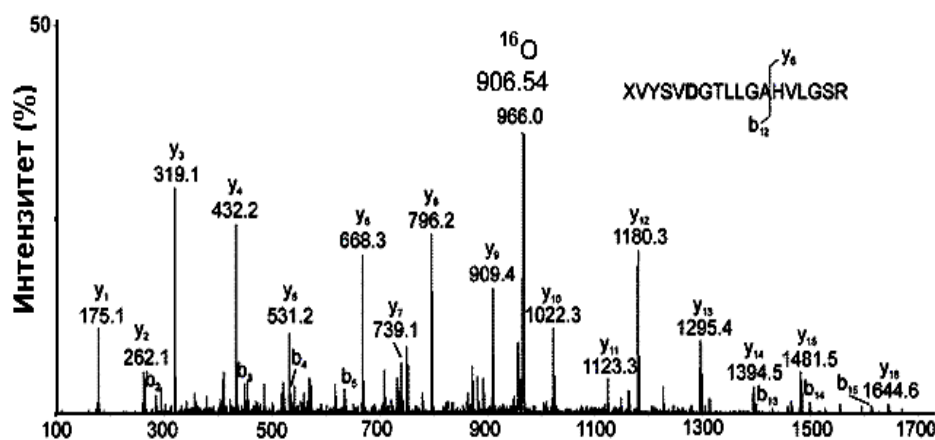


**Фиг. 33.** Нано-LC-MALDI-TOF анализ на:  
**А)** елуирана фракция на 30 min;

**Б)** елуирана фракция на 54 min

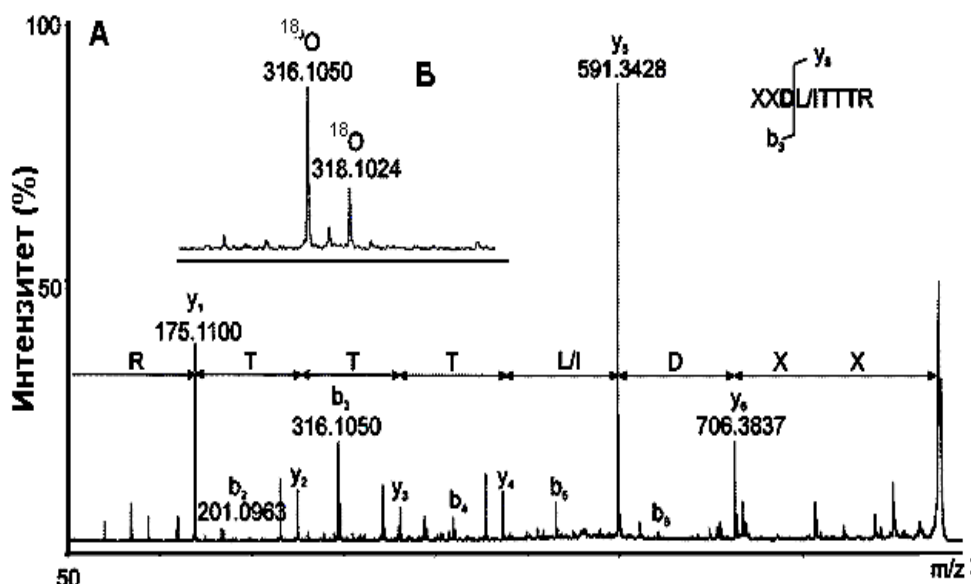
**вътрешни фигури –**  
<sup>18</sup>O-белязани йони с m/z  
 906.5461 и 2406.3296 [M+H]<sup>+</sup>.





**В)** MALDI-MS/MS анализ на  $^{18}\text{O}$ -белязан пептид с  $m/z$  906.54  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Елуираните на 30 и 50 min фракции в nano-LC хроматограмата са представени с два  $^{18}\text{O}$ -белязани пептида, изразени от йони с  $m/z$  906.54  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (Фиг. 33А) и  $m/z$  2406.33  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (Фиг. 33Б). Установена е разлика в MS/MS спектрите между  $m/z$  на белязани и небелязани йони от 2 Da за гликозилираните центрове (Фиг. 33В). Получените данни представят новия метод, като много чувствителен и подходящ за анализ на гликозилирани центрове, но като недостатък са ограничените данни от MS/MS, които не позволява *de-novo* анализ за определяне на АКП на гликопептидите.

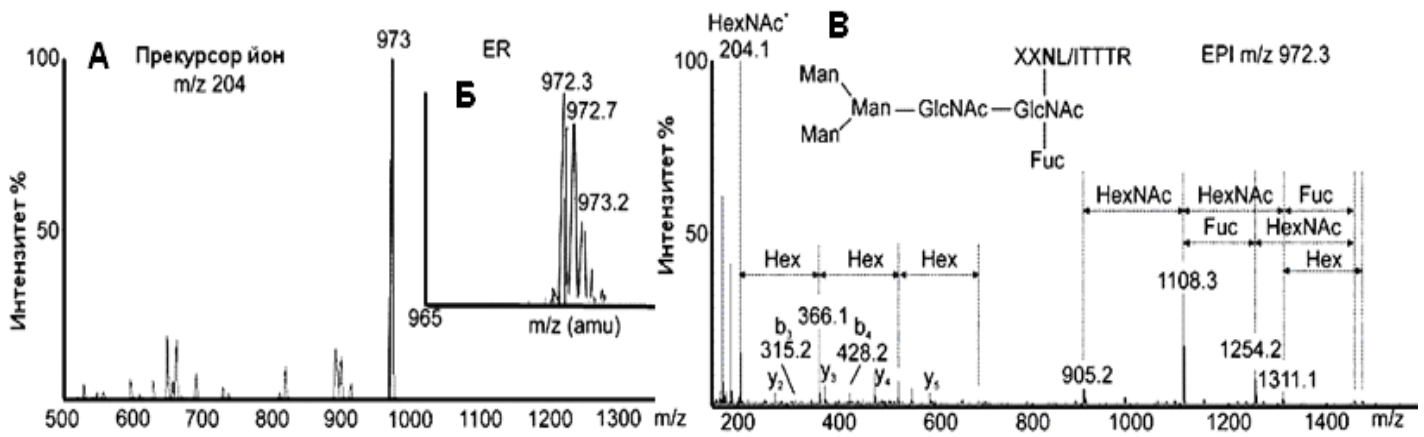


**Фиг. 34А.** TDF спектър на  $^{18}\text{O}$ -белязан пептид (йон с  $m/z$  966  $[\text{M}-2\text{H}]^{2+}$ ). Енергия на сблъсък 28 eV и време на фрагментиране 8 ms.  
**Б)** Белязаният йон  $b_3$  с  $m/z$  316.1050 е представен на вътрешната фигура.

Това се постига чрез nano-LC-ESI-Q-trap система и забавено фрагментиране с времето (TDF) на  $^{18}\text{O}$ -белязаните пептиди в MS, при което се отчитат йони с по-ниски стойности (Фиг. 34). Чрез TDF-MS анализ на  $^{18}\text{O}$ -белязан пептид с  $m/z$  966.0  $[\text{M}-2\text{H}]^{2+}$  е определена АКП, като  $y$ - и  $b_3$ -белязания йон с  $m/z$  316.1050  $[\text{M}+\text{H}]^+$  потвърждава свързан гликан само към един *N*-център (-NGT-) в гликопептида (Sandra et al., 2007).

Обобщените резултати в таблица 10 представят предимството на избрания метод за определяне на гликозилираните центрове на  $^{18}\text{O}$ -белязани гликопептиди от RvH1 в биологичен разтвор. Недостатък на този метода е точността при определяне на центровете на гликозилиране (Sandra et al., 2007), което е постигнато след сканиране при 204  $m/z$  на елуираната на 23 min фракция с най-интензивен йон с  $m/z$  973  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  (Фиг. 35А, Б), който представя гликопептид с Мм 1943.6 Da ( $[972.3 \times 2]-1=1943.6$ ).

Анализът на йон от MS/MS с  $m/z$  905.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , който изразява само пептида, доказва един свързан гликан FucMan<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> към центъра -NI/LT- от гликопептида (Табл. 10, Фиг. 35Б). Сравнителните анализи на MS отчитат разлика от 1 Da между стойностите на получения пептид след отделяне на гликана с ензима PNGase F и тези на  $^{18}\text{O}$ -белязаните йони.



**Фиг. 35А).** Йонно сканиране на елуирана фракция на 23 min. **Б)** ER сканиране на интензивния йон; **В)** EPI сканиране на фрагментни йони.

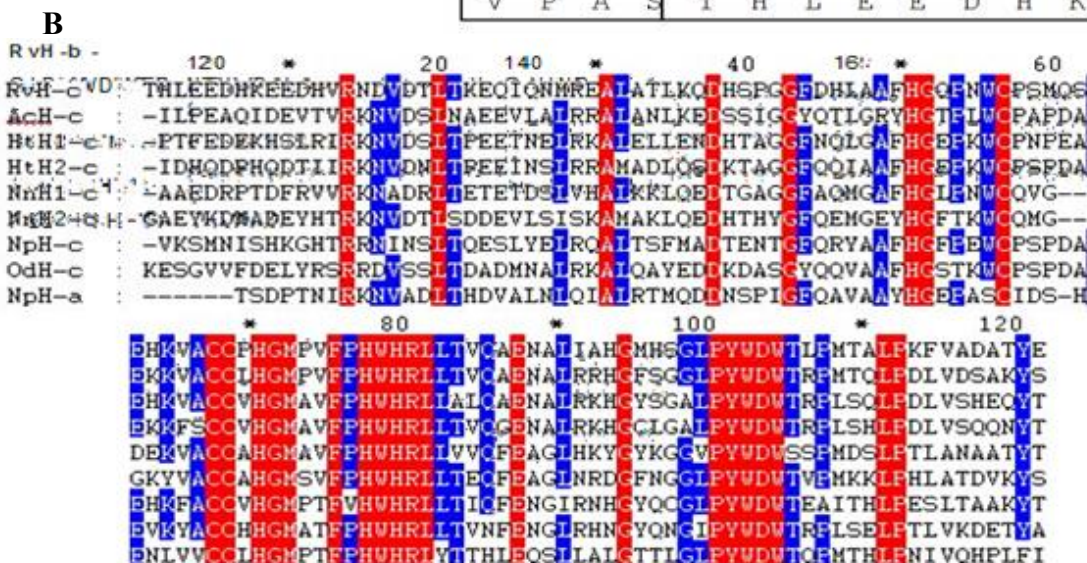
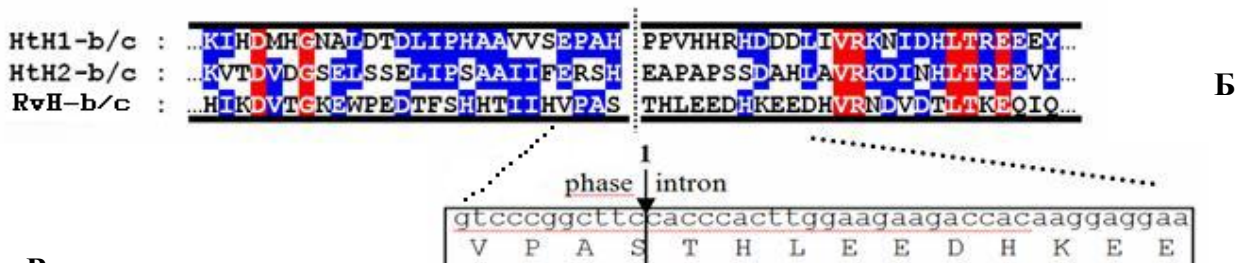
Нарастването с 1 Da на йон  $b_3$  в спектрите, в сравнение с MS/MS анализа на белязаните пептиди, е доказателство за гликозилиран център (Sandra et al., 2007).

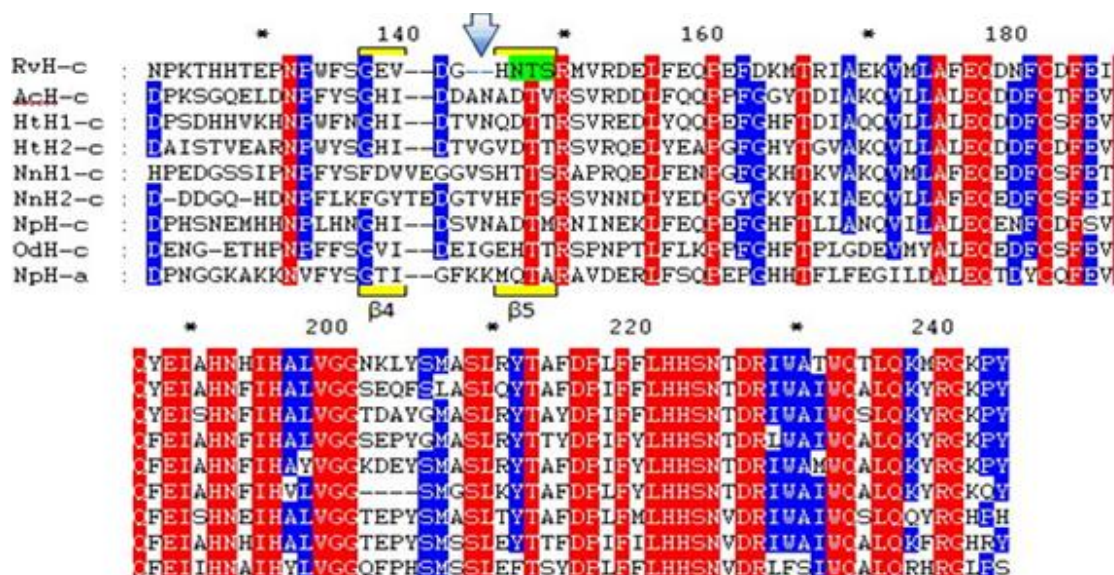
### Гликозилирани центрове в RvH, определени след фрагментиране на генома

Позицията на свързване на един гликан към полипептидната верига на RvH също е потвърдена от нуклеотидната последователност на два фрагмента от генома на RvH и два вида интрони: (i) разположени в кодиращата област между две ФЕ-ци, познати като свързващи интрони и (ii) вътрешни интрони във ФЕ-ци (Dolashka-Angelova et al., 2009).

Определената от генома АКП (FSGEVDGHNTSR) (Фиг. 36B) коригира получените данни от MS/MS анализа на гликопептид с  $m/z$  1099.19  $[M-2H]^{2+}$  (Табл.10, №10), като при нуклеотидния анализ Trp остатък е заместен с -GlyGlu-, които не винаги са ясно отразени в MS/MS спектрите. Получената информация потвърждава предполагаемите N-гликозилирани центрове, публикувани за ФЕ-ци HtH2-с, OdH-с и NpH-с (Фиг. 36B) и служи за основа за определяне на други характеристики на RvH.

**A** DHTALFDGMLLAFEQTFDFCFEVQFEVVHNAIHFLVGGFDPYTMATLHYSAYDPIFYLHHSNVDRWLWAIR  
 QKLQMRRGKLYKANHCAGSLTQELMMPFGPPPPYHNDPKTRDNARPSQIYDYESVLDYTYDSLQFGGM  
 TIAQLDHYLEERKTHDRTFVGIMLHNIGISAWATLAIEMKNGEEYTVGKVAVLGGEKEMPWHFDRTFKVEI  
 TKALHKLGLRYDDEYDVKLHIKDVTKKEWPEDTFSHHTIIHVPAS

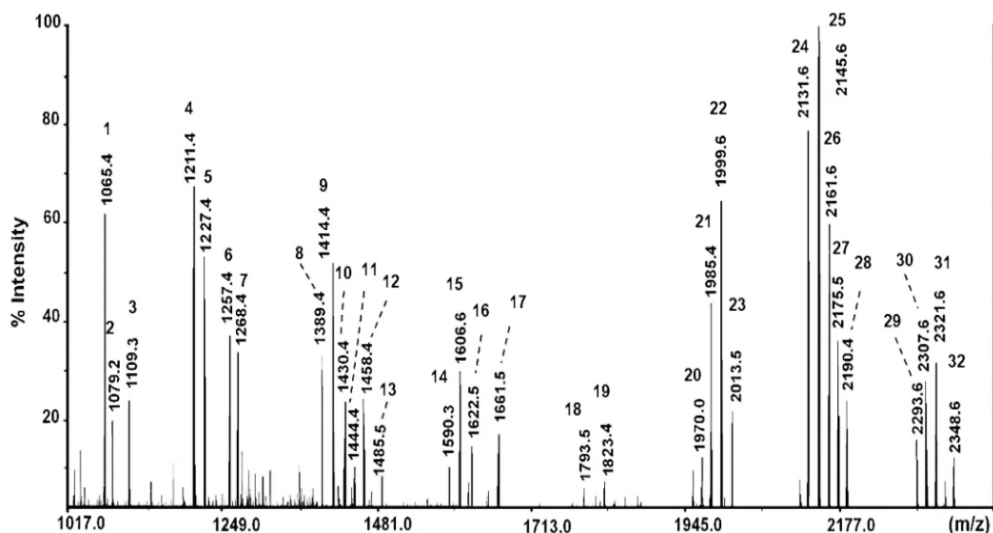




**Фиг. 36** А) Първична структура на ФЕ RvN-b, определена чрез кДНК. Б) Сравнение на “интрони” от RvN-c с изоформи HtH1-b/c, HtH2- b/c; В) АКП на RvN-c и ФЕ-с. Консервативни участъци - синьо и червено, *N*-гликозилиран център на RvN-c - в зелено.

#### IV.4.3.4. Въглеродна структура на хемоцианин от *Helix lucorum*

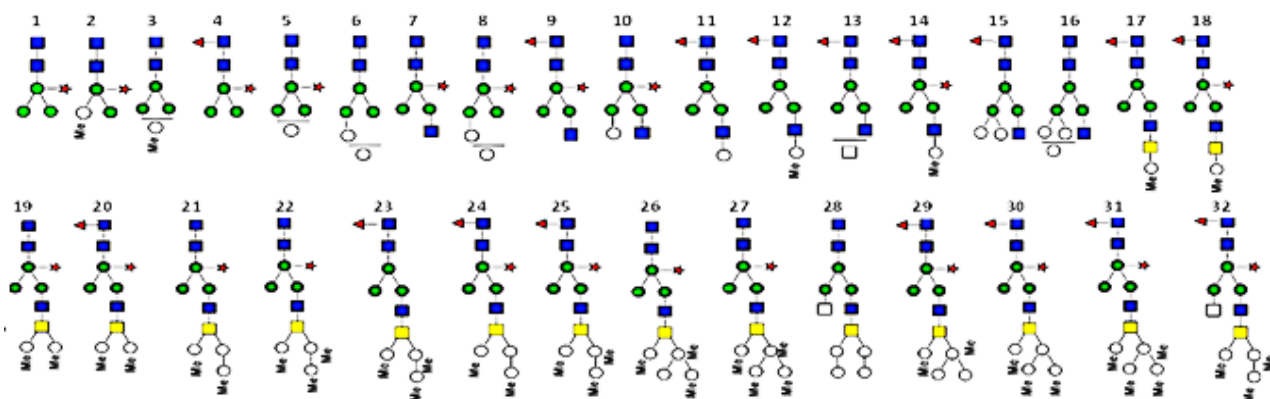
Разработените и приложени нови методи за анализ на въглеродната структура на RvN се оказаха подходящи и за анализ на въглеродната структура на хемоцианин от *H. lucorum* (НН). Проведеният MS анализ след третиране на  $\beta$ -НН с PNGase F представя различни *N*-свързани гликани (Фиг. 37А,Б) (Velkova et al., 2014; 2015; 2017).



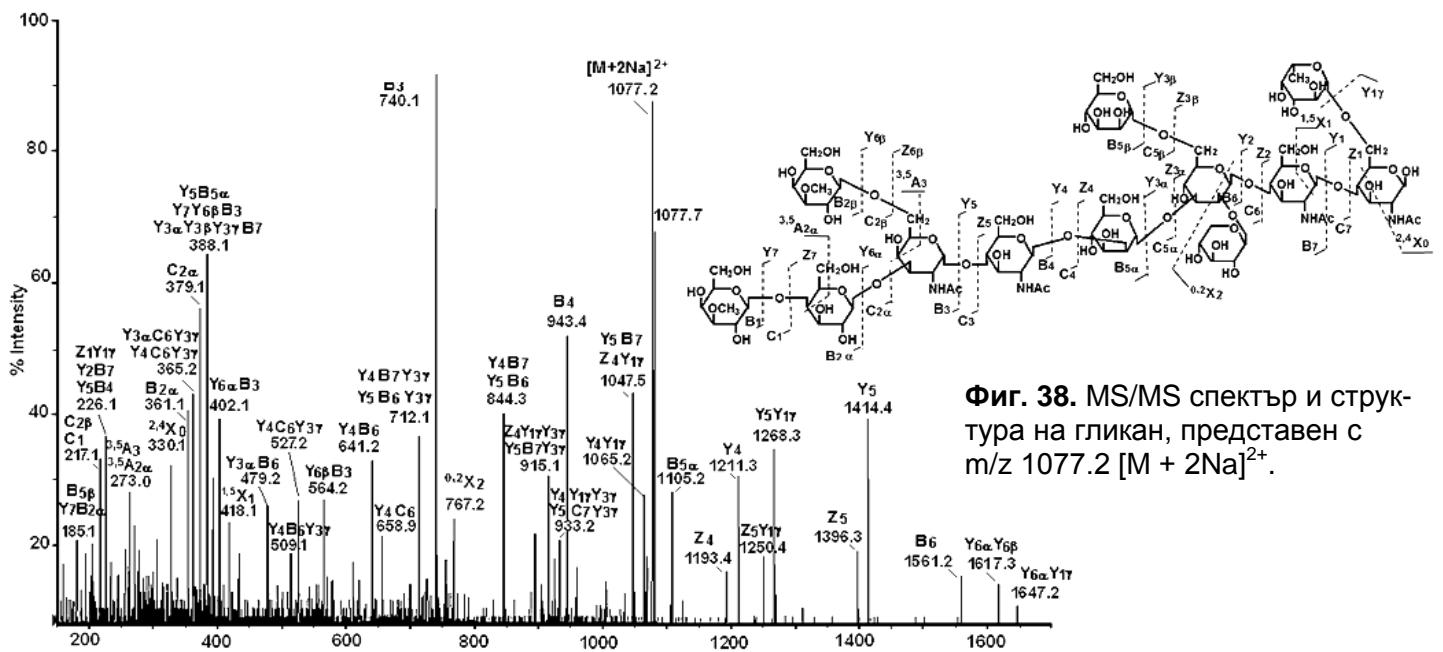
**Фиг. 37А** MALDI-MS анализ на неутрални *N*-свързани гликани от  $\beta$ -НН, получени след третиране с PNGase F (матрица 2,5-DHB).

**Б)** Структури по номенклатурата на консорциума за функционална гликомика:

Б) ● = Man; Me○ = methylated hexose (MeHex); ■ = GalNAc; □ = GlcNAc; ○ = HexNAc; ▲ = Fuc; ★ = Xyl

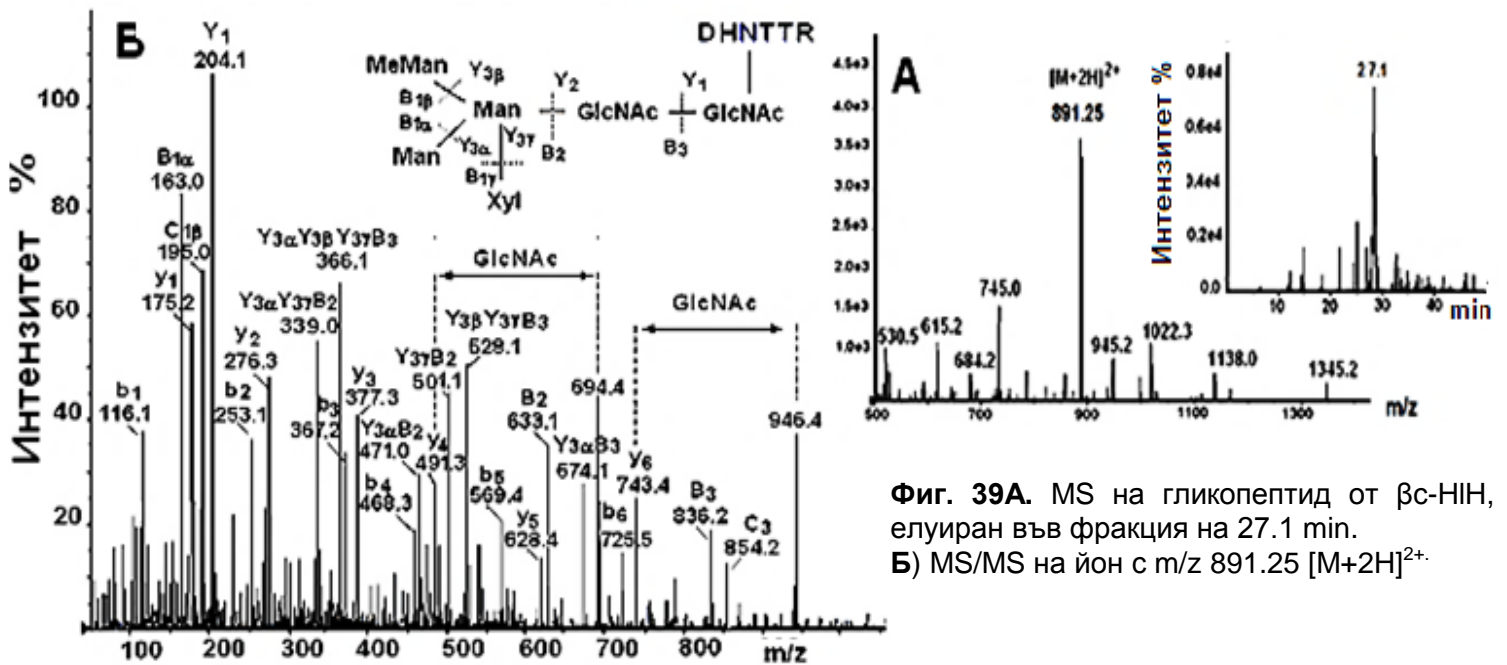


Доказателство за голямо структурно разнообразие на гликаните в НН е постигнато след интерпретиране на MS/MS спектрите от Q-trap система, както представения MS/MS анализ на йон с  $m/z$  1077.2  $[M+2Na]^{2+}$  (Фиг. 38).



Фиг. 38. MS/MS спектър и структура на гликан, представен с  $m/z$  1077.2  $[M + 2Na]^{2+}$ .

Като важни характеристики за структурите на гликаните в субединица  $\beta_c$ -НН трябва да се отбележат наличие на MeHex, която може да бъде Man или Gal, а също и отсъствие на кисели гликани с HexA (Табл. 11). Потвърждение на сложните структури в НН са CE-MS анализите на APTS-белязани *N*-гликани, които подкрепят предположението за позицията на глиганите в молекулата на  $\beta$ -НН (Velkova et al., 2015).



Фиг. 39А. MS на гликопептид от  $\beta_c$ -НН, елуиран във фракция на 27.1 min. Б) MS/MS на йон с  $m/z$  891.25  $[M+2H]^{2+}$ .

Позицията на гликаните е представена от структурата на елуирания гликопептид на 27.1 min, като след прекурсорно сканиране (Фиг. 39А,Б) и MS/MS анализ (Фиг. 39В) на йон с  $m/z$  891.25  $[M+2H]^{2+}$  е определен един свързан Xyl остатък към Man от вътрешността на гликана, който е прикрепен към център –DHNTTR– от гликопептида.

Като важно предимство при анализиране на въглехидратната структура на НН, трябва да се отбележи определената нуклеотидна последователност, от която са идентифицирани два мотива, “NXT” и “NXS”, и са определени потенциални гликозилирани центрове (De Smet et al., 2011). От тази информация са предсказани 13 *N*-свързани центъра в  $\beta_c$ -НН, 14 в  $\alpha_D$ -НН и 8 в  $\alpha_N$ -НН, като разположението на гликаните и гликозилирани центрове на повърхността на молекулата е представено от построения 3D -модел на ФЕ  $\beta_c$ -НН-g (Фиг. 40).

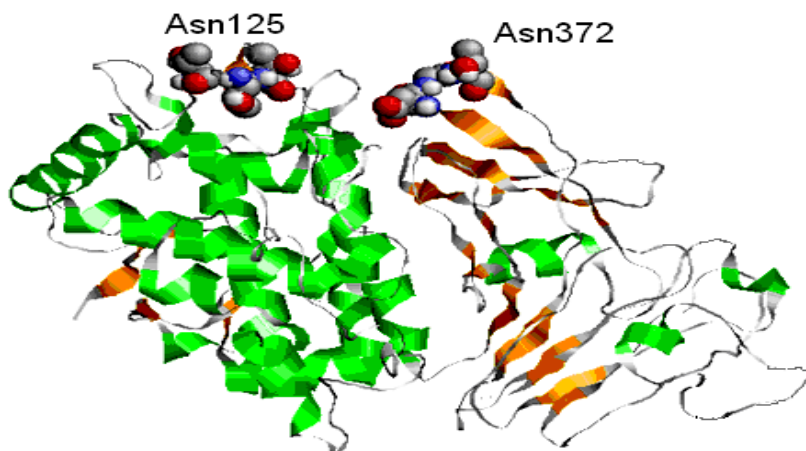
ФЕ  $\beta_c$ -НН-g е изградена от два домена, като в „централен” домен е разположен активният център и предполагаемият *N*-свързан център на позиция 125-127.

Табл. 11. Структури на гликани от  $\beta$ -H1H, определени чрез различни методи (Velkova et al., 2015).

№	Glycan's structures from $\beta$ -H1H	Q-Trap/MS (m/z)	MALDI-TOF/MS (m/z)	№	Glycan's structures from $\beta$ -H1H	Q-Trap/MS (m/z)	MALDI-TOF/MS (m/z)
1		[M+Na] <sup>+</sup> 1085,3	[M+Na] <sup>+</sup> 1085,4	19		[M+2Na] <sup>2+</sup> 923,2	[M+Na] <sup>+</sup> 1823,4
2		[M+Na] <sup>+</sup> 1079,1	[M+Na] <sup>+</sup> 1079,2	20		[M+2Na] <sup>2+</sup> 996,4	[M+Na] <sup>+</sup> 1970,0
3		[M+Na] <sup>+</sup> 1109,2	[M+Na] <sup>+</sup> 1109,3	21		[M+2Na] <sup>2+</sup> 1004,3	[M+Na] <sup>+</sup> 1985,4
4		[M+Na] <sup>+</sup> 1211,3	[M+Na] <sup>+</sup> 1211,4	22		[M+2Na] <sup>2+</sup> 1011,4	[M+Na] <sup>+</sup> 1999,6
5		[M+H] <sup>+</sup> 1205,4	[M+Na] <sup>+</sup> 1227,4	23		[M+2Na] <sup>2+</sup> 1018,3	[M+Na] <sup>+</sup> 2013,5
6		[M+H] <sup>+</sup> 1235,3	[M+Na] <sup>+</sup> 1257,4	24		[M+2Na] <sup>2+</sup> 1077,2	[M+Na] <sup>+</sup> 2131,6
7		[M+Na] <sup>+</sup> 1268,5	[M+Na] <sup>+</sup> 1268,4	25		[M+2Na] <sup>2+</sup> 1084,3	[M+Na] <sup>+</sup> 2145,6
8		[M+Na] <sup>+</sup> 1367,5	[M+Na] <sup>+</sup> 1389,4	26		[M+2Na] <sup>2+</sup> 1092,3	[M+Na] <sup>+</sup> 2161,6
9		[M+Na] <sup>+</sup> 1414,3	[M+Na] <sup>+</sup> 1414,4	27		[M+2Na] <sup>2+</sup> 1099,3	[M+Na] <sup>+</sup> 2175,5
10		[M+H] <sup>+</sup> 1378,3	[M+Na] <sup>+</sup> 1430,4	28		[M+2Na] <sup>2+</sup> 1106,5	[M+Na] <sup>+</sup> 2190,4
11		[M+H] <sup>+</sup> 1422,3	[M+Na] <sup>+</sup> 1444,4	29		[M+2Na] <sup>2+</sup> 1158,4	[M+Na] <sup>+</sup> 2293,6
12		[M+Na] <sup>+</sup> 1458,3	[M+Na] <sup>+</sup> 1458,4	30		[M+2Na] <sup>2+</sup> 1165,4	[M+Na] <sup>+</sup> 2307,6
13		[M+Na] <sup>+</sup> 1485,4	[M+Na] <sup>+</sup> 1485,5	31		[M+2Na] <sup>2+</sup> 1172,4	[M+Na] <sup>+</sup> 2321,6
14		[M+H] <sup>+</sup> 1568,2	[M+Na] <sup>+</sup> 1590,3	32		[M+2Na] <sup>2+</sup> 1185,8	[M+Na] <sup>+</sup> 2348,6
15		[M+Na] <sup>+</sup> 1606,5	[M+Na] <sup>+</sup> 1606,6				
16		[M+Na] <sup>+</sup> 1622,4	[M+Na] <sup>+</sup> 1622,5				
17		[M+H] <sup>+</sup> 1639,5	[M+Na] <sup>+</sup> 1661,5				
18		[M+2Na] <sup>2+</sup> 908,2	[M+Na] <sup>+</sup> 1793,5				

Установен е и друг *N*-свързан център (позиция 372-374) в „ $\beta$ -сандвич” домена, като предполагаемите центрове са изложени на повърхността на молекулата (Dolashka-Angelova et al., 2009).

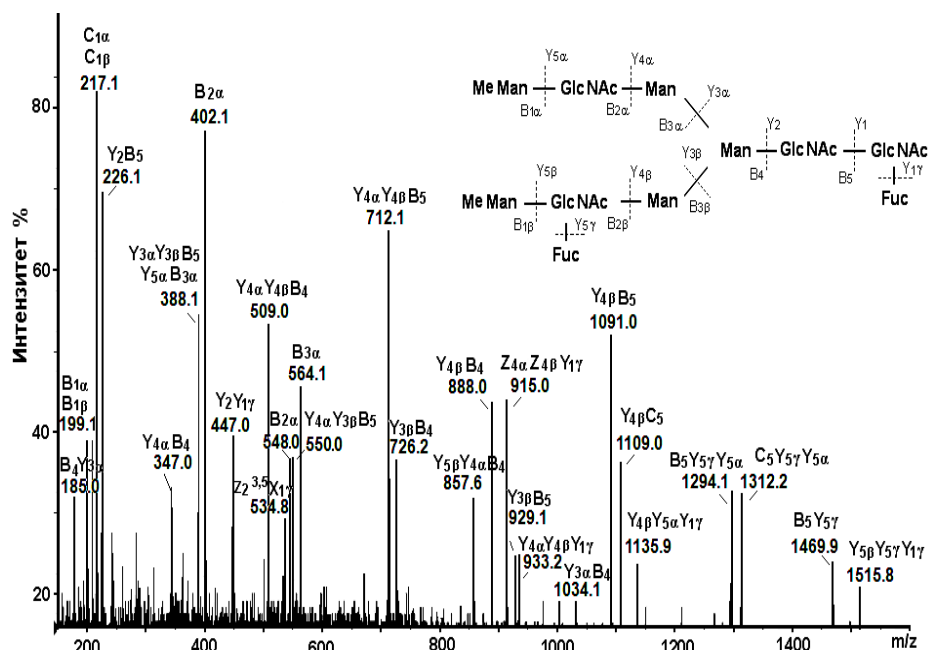
Фиг. 40. 3D - модел на ФЕ  $\beta$ -H1H - g, построен с програма Swiss PDB viewer и сравнен с модела на ФЕ „g” от *O. doffeini* (OdH-g) (Cuff et al., 1998). Посочени са два възможни центъра на гликозилиране към Asn125 и Asn2 45 остатък.



#### IV.4.3.5. Въгледрихатна структура на хемоцианин от *H. tuberculata*

Друга важна информация за въгледрихатната структура на хемоцианини от молюски е представена от структурата MeHex<sub>2</sub>HexMan<sub>3</sub>GlcNAc<sub>4</sub>Fuc<sub>2</sub> на гликан с m/z 1002.8 [M+2Na]<sup>2+</sup> от

HtH1, в който към вътрешен GlcNAc остатък са свързани два Fuc и 2 крайни MeHex остатъка. Големият набор от йони в MS/MS спектъра определя структурата на гликана, като позицията на два Fuc остатъка е потвърдена от йон с  $m/z$  1294.1 ( $Y_{5\alpha}Y_{5\gamma}B_5$  и  $Z_{4\alpha}Y_{1\gamma}$ )(Табл.12, гликан 13).

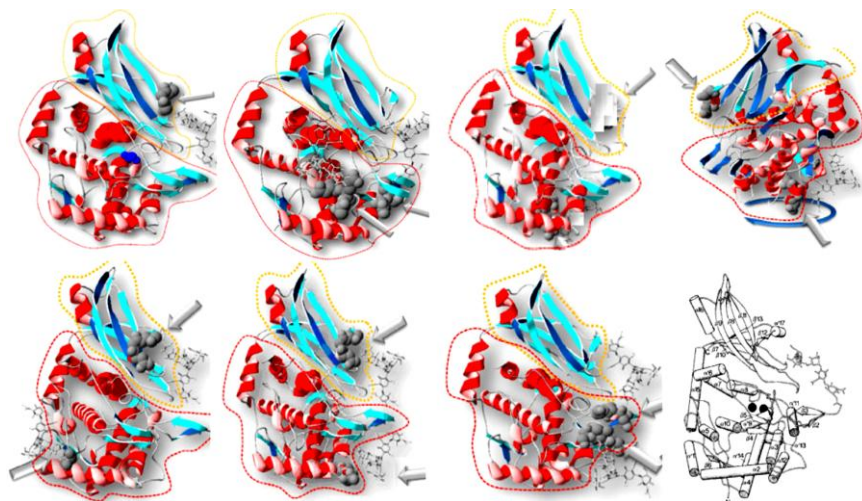


**Фиг. 41.** MS/MS на гликан от HtH1, представен от йон с  $m/z$  1002.8  $[M+2Na]^{2+}$  и комплексен вид въглехидратна структура.

Другият свързан Fuc( $\alpha$ 1-6) остатък към пентазахаридната сърцевина в гликана е изразен чрез три единично заредени йона  $[M+Na]^+$  с  $m/z$  534.8 ( $Z_2^{3,5}X_{1\gamma}$ ),  $m/z$  575.2 ( $Z_2$ ) и  $m/z$  593.0 ( $Y_2$ ) (Фиг. 41). Определените сложни структури на гликани в молекулата на HtH1 са представени в таблица 12 (Velkova et al., 2011).

**Табл. 12.** Въглехидратни структури на изолирани гликани от HtH1 (Velkova et al., 2015).

№	структури на N-гликани HtH1	Q-Trap/MS (m/z)	MALDI-TOF/MS (m/z)	№	структури на N-гликани HtH1	Q-Trap/MS (m/z)	MALDI-TOF MS (m/z)
1		$[M+H]^+$ 1056.8	$[M+Na]^+$ 1079.4	12		$[M+2Na]^{2+}$ 923.2	$[M+Na]^+$ 1823.4
2		$[M+H]^+$ 1235.0	$[M+Na]^+$ 1257.4	13		$[M+2Na]^{2+}$ 1002.8	$[M+Na]^+$ 1983.2
3		$[M+H]^+$ 1248.6	$[M+Na]^+$ 1271.4	14		$[M+2Na]^{2+}$ 1062.2	$[M+Na]^+$ 2101.4
4		$[M+Na]^+$ 1285.0	$[M+Na]^+$ 1285.4	15		$[M+2Na]^{2+}$ 1069.2	$[M+Na]^+$ 2115.5
5		$[M+H]^+$ 1422.0	$[M+Na]^+$ 1444.4	16		$[M+2Na]^{2+}$ 1076.3	$[M+Na]^+$ 2129.5
6		$[M+H]^+$ 1436.0	$[M+Na]^+$ 1458.2				
7		$[M+H]^+$ 1568.0	$[M+Na]^+$ 1590.1				
8		$[M+H]^+$ 1582.0	$[M+Na]^+$ 1604.5				
9		$[M+H]^+$ 1639.0	$[M+Na]^+$ 1661.2				
10		$[M+2Na]^{2+}$ 878.9	$[M+Na]^+$ 1736.5				
11		$[M+2Na]^{2+}$ 902.8	$[M+Na]^+$ 1782.4				



**Фиг. 42.** 3D -модели на ФЕ-ци на HtH1 от «а» до «g», построени от структурата на OdH-g. N-свързани центрове към « $\beta$ -сандвич» домен (жълто); N-свързан център (сиво);  $\alpha$ -ядро (червено), като гликаните са отбелязани със стрелки.

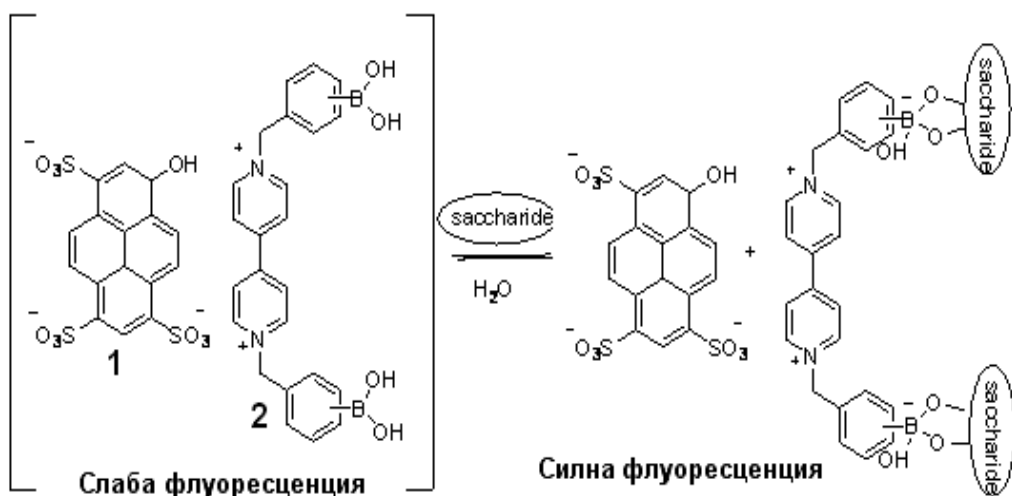
Важно е да се отбележи предимството на разработените нови методи и подходи за определяне на сложните структури на гликани 6, 8, 9, 11, 12, 13, 15 и 16, с нов структурен мотив MeMan[Fuc( $\alpha$ 1-3)]GlcNAc, свързан към вътрешен GlcNAc.. Също внимание заслужава отсъствието на потенциален гликозилиран център в модела на ФЕ HtH1-с, както и изложението на повърхността на ФЕ HtH1-h един от двата представени гликана (Фиг. 42).

Тези данни водят до предположение за важната роля на гликана, който вероятно възпрепятства реасоцирането на дисоциираните субединици HtH1, които не фибрилизират в дидекамери или по-големи агрегати, каквито се наблюдават при хемоцианини и от вид *Mollusca* (Velkova et al., 2011).

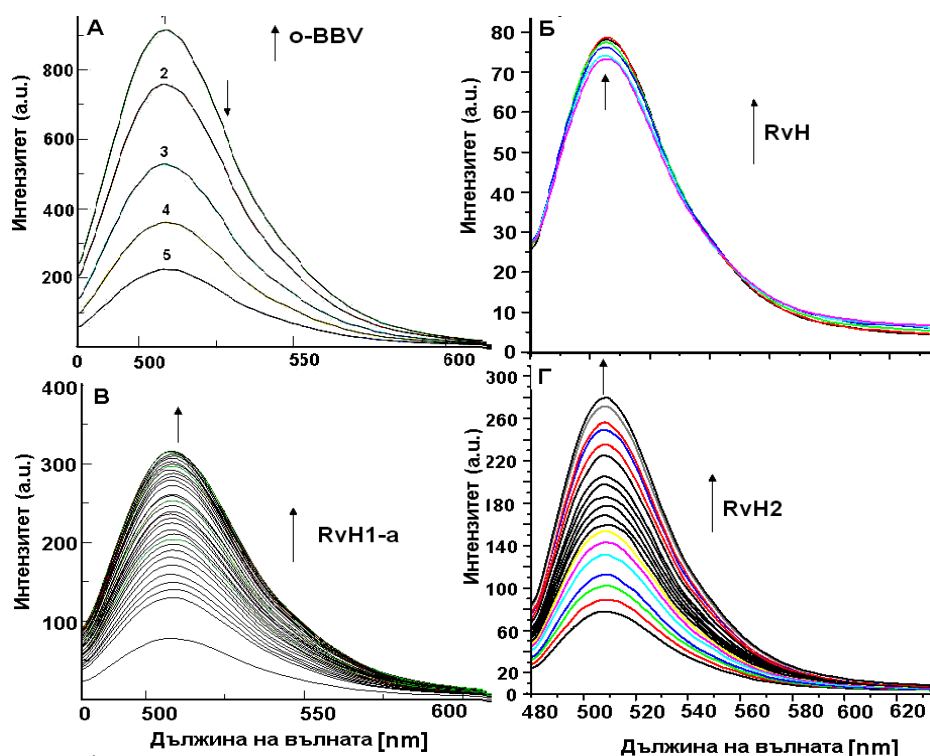
#### V.4.4. НОВ МЕТОД ЗА АНАЛИЗ НА СМЕСИ ОТ ОЛИГОЗАХАРИДНИ СТРУКТУРИ

##### IV.4.4.1. Идентифициране на въглехидратни структури в хемоцианини

Имунната системи е една от най-добре изследваните системи, при която е установена важната физиологична роля на гликопротеините. Ето защо изясняването на функцията им в структурата на биомембрани и анализът на гликани във физиологични течности са актуални задачи. Разработен е нов метод с двукомпонентна система за откриване на захари, на база на познатата система с един детектор (Фиг.43).



**Фиг. 43.** Двуетапна система от: (1) анион-флуоресцентно багрило; (2) катион-виологен, заместен с боронови остатъци, които едновременно са флуоресцентен гасител и захариден рецептор.



**Фиг. 44.** Флуоресцентен анализ на титруване на :

**А)** пиранин ( $1,33 \times 10^{-6}$ ), в 50 mM фосфатен буфер, pH 7.5 и с нарастващи концентрации на o-BBV;

**Б)** комплекса o-BBV с нарастваща концентрация на RvH;

**В)** с ФЕ RvH1-a;

**Г)** със субединица RvH2.

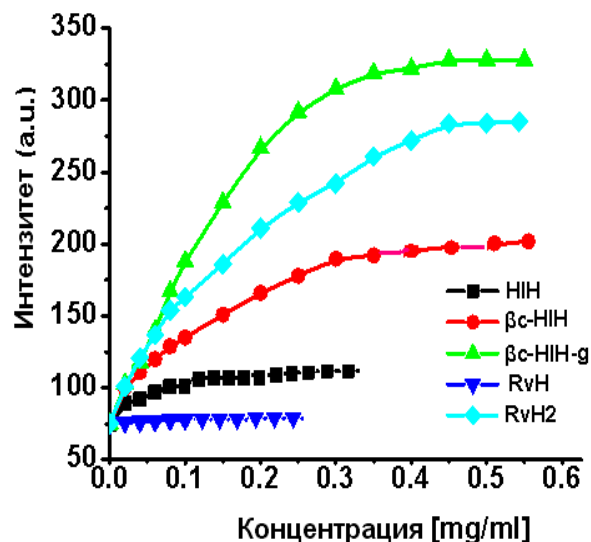
Той включва титруване на пиранин с нарастваща концентрация на N,N'-бис-(бензил-2-боронова киселина)-[4,4'] бипиридинов дибромид(o-BBV) и анионно-флуоресцентно багрило, което води до 4-кратно понижаване ( $\lambda_{em}=508\text{ nm}$ ,  $\lambda_{ex}=460\text{ nm}$ ) на флуоресцентната емисия на пиранина (Фиг. 44А).

Ефектът на този метод е тестван при титруване на три вида циклодекстрини ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD и ацетил- $\beta$ -CD), след което е приложен за предсказване на различни въглехидратни структури на хемоцианини, като ФЕ RvH1-а (Фиг. 44В) и субединица RvH2 (Фиг. 44Г).

След прилагане на метода за титруване на комплекса o-BBV с нарастваща концентрация от RvH, е отчетено минимално повишаване на флуоресцентния интензитет (Фиг. 88Б), което вероятно се дължи на слабото взаимодействие между гликаните и катион виологена от двукомпонентния комплекс.

Съществено повишаване на интензитета (~3,5 пъти) е отчетено след титруване на комплекса o-BBV с ФЕ RvH1-а (Фиг. 44В) и със субединица RvH2 (Фиг. 44Г), което вероятно се дължи на изложените гликани на повърхността на молекулата, които са достъпни за комплекса o-BBV (Kostadinova et al., 2013).

Представената зависимост на титруване на комплекса o-BBV с нарастващи концентрации на интактните хемоцианини H1H, RvH и на характерните с различни въглехидратни структури изоформи ( $\beta$ c-H1H,  $\beta$ cH1H-g, RvH2), са основание за изказаното предположение за „погребани“ хидроксилни групи в молекулата на H1H и RvH (Фиг. 45). Докато хидроксилните групи на гликаните в субединиците са изложени на повърхността на молекулата и са по-достъпни за гасителя o-BBV (Kostadinova et al., 2013).



**Фиг. 45.** Зависимост между флуоресцентната емисия и концентрацията на хемоцианини с различно въглехидратно съдържание и структури след титруване на комплекса o-BBV:

H1H	0÷0.33 mg/ml;
$\beta$ c-H1H	0÷0.55 mg/ml;
$\beta$ cH1H-g	0÷0.55 mg/ml;
RvH	0÷0.25 mg/ml;
RvH2	0÷0.55 mg/ml).

Също отчетената най-значителна промяна на флуоресцентната емисия след титруване на комплекса o-BBV с ФЕ RvH1-а, потвърждава високото въглехидратно съдържание (7%) и сложни олигозахаридни структури на двата гликана (Фиг.45В) (Dolashka-Angelova et al., 2003b).

Изказаната хипотеза от наблюдаваните резултати е, че представените два гликана в RvH-а са изложени на повърхността на молекулата RvH-а, в резултат на което хидроксилните групи са достъпни за комплекса o-BBV, защото не участват във Ван дер Валсови взаимодействия или водородни връзки. С това се обяснява повишаването на интензитета на флуоресцентната емисия след титруване на o-BBV с RvH1-а (Kostadinova et al., 2013). Получените резултати доказват, че разработеният метод за титруване с комплекса o-BBV е подходящ за откриване на гликани в смеси. От друга страна може да се прилага за разграничаване на изложените на повърхността и на „погребаните“ във вътрешността на молекулата гликани, при които е затруднен достъпът на комплекса o-BBV до хидроксилните групи на гликана.

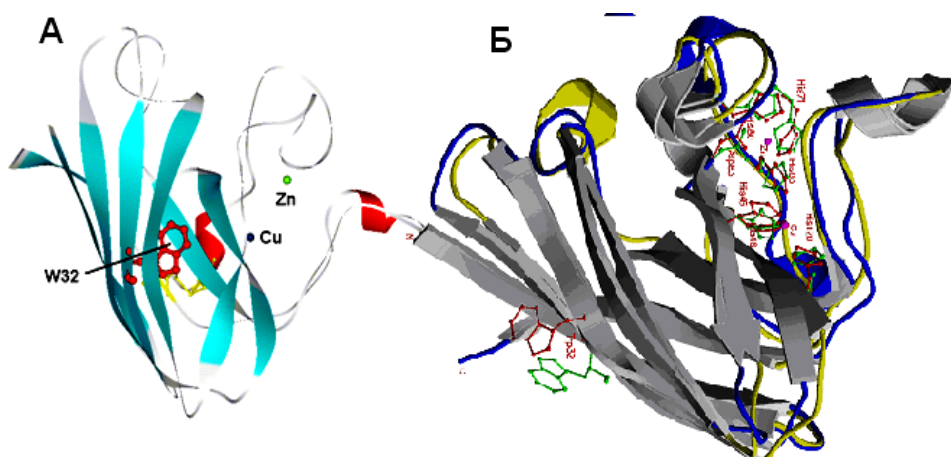


## ГЛАВА IV.5. ФУНКЦИЯ НА ОЛИГОЗАХАРИДНИТЕ СТРУКТУРИ В МЕДНИТЕ ГЛИКОПРОТЕИНИ, СВЪРЗВАЩИ КИСЛОРОДНИ ФОРМИ

Представените резултати върху структурата на пречистените нови кислород-свързващи протеини, хемоцианини и супероксид дисмутази, доказват, че някои от тях са гликопротеини със сложни въглехидратни структури. Това ги прави подходящи за проследяване на една от задачите на представения дисертационен труд - определяне на ролята и влиянието на въглехидратните вериги върху структурата, стабилността и функцията на гликопротеините.

### IV.5.1. ФУНКЦИЯ НА ГЛИКАНИТЕ В Cu/Zn-СУПЕРОКСИД ДИСМУТАЗИ

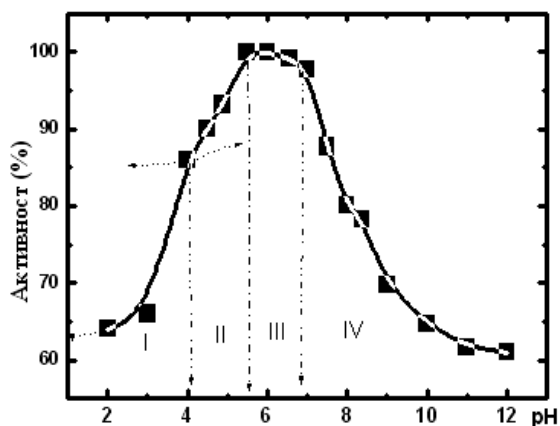
На база на определените първични и въглехидратни структури са построени 3D -модели на гликозилираните Cu/Zn-НlСОД 103 и Cu/Zn-КmСОД NBIMСС 1984, както и негликозилирания ензим Cu/Zn-АnСОД 26, с програмата MODELLER (Фиг. 46). Тези модели потвърждават високата хомоложност на СОД-зи, с преобладаващи  $\beta$ -лист антипаралелни структури, свързани чрез дълга примка и къси  $3_{10}$ -хеликс структури. Също в 3D -модела на Cu/Zn-АnСОД 26 не е представен гликан (Фиг. 46А), докато при Cu/Zn-НlСОД 103 (Фиг.46Б) и Cu/Zn-КmСОД NBIMСС 1984 (Фиг.16Б) гликаните са разположени на повърхността на молекулата (Dolashka et al., 2010b; 2011c; Dolashki et al., 2008a).



**Фиг. 46.** 3D -модели на: **А)** Cu/Zn-СОД от гъбичен щам *A. niger* 26. Маркирани N- и С-края;  $\beta$ -лист структура (синьо-зелен), S-S мост Cys57 и Cys146 (жълто); Cu-йон (сини) и Zn-йон (зелено); Trp32 (червено); **Б)** Cu/Zn-СОД от щам *H. lutea* 103 и свързан гликан към -Asn-Ile-Thr- (зелен).

#### IV.5.1.1. Влияние на гликаните върху ензимната активност на Cu/Zn-СОД-зи

Една от важните характеристики за функцията на СОД-зи е ензимната им активност, която зависи от редица фактори, като една от тях е въглехидратната структура на ензима. Влиянието на гликозидния характер върху активността на Cu/Zn-НlСОД 103 и Cu/Zn-КmСОД NBIMСС 1984 след промяна на температурата и рН на средата, е сравнено с негликозилирания ензим Cu/Zn-АnСОД 26. Установената остатъчна ензимна активност при високи температури е важна характеристика за стабилността на Cu/Zn-АnСОД26 и Cu/Zn-АnСОДтс 26 (Abrashv et al., 2008).

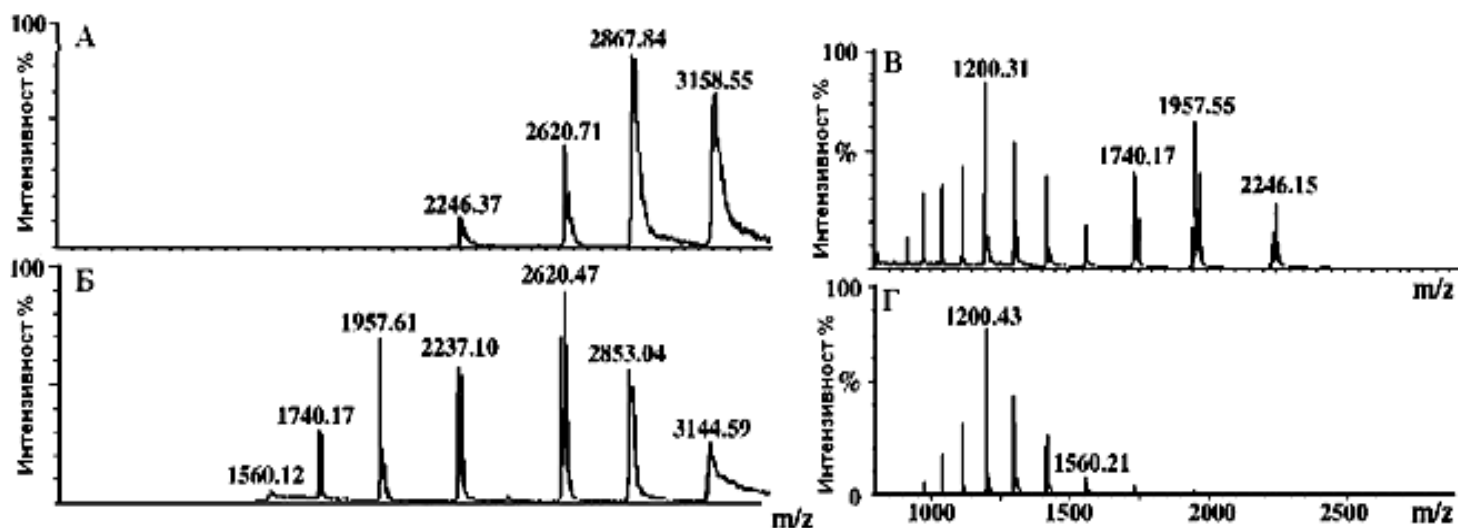


**Фиг. 47.** Графична зависимост на промяна на активността на Cu/Zn-АnСОД 26 от рН на разтвора (от рН2 до рН12).

Важно е да се отбележи силно изразено рН-влияние на реакционната смес върху активността на Cu/Zn-AnCOД 26 (Фиг. 47), както и различното поведение на Cu/Zn-HiCOД 103 (рН 6.5-7.8) и на Cu/Zn-KmCOД (рН 7.5 - 8.5), които запазват ~73% и 65% от изходната си активност (Dolashki et al., 2008a; Nedeva et al., 2009).

#### IV.5.1.2. Влияние на въглехидратната структура върху конформационната стабилност на Cu/Zn-COД

Проследната динамика на поведение на Cu/Zn-HiCOД в разтвори с различно рН, чрез много чувствителния ESI-MS анализ, отчита настъпили конформационни изменения на ензима (Фиг. 48А). Промяната на структурата на ензима след понижаване на рН на средата, е изразена с поява на нови йони в MS и изменение на интензитета на йоните с  $m/z$  2626.47 $[M+H]^+$  и  $m/z$  1957.61 $[M+H]^+$  (Фиг. 48Б). Това отразява началото на структурните промени в състоянието на ензима, свързани с дисоцииране на димерната му форма до субединици. MS спектърът отчита дисоцииране на ензима до изграждащите го субединици при по-ниски стойности на рН 4,2 (Фиг. 48В) (Krumova et al., 2007).



**Фиг. 48.** ESI-MS на Cu/Zn-HiCOД 103 (2 mM), разтворена в 10 mM ацетатен буфер, с различни стойности на рН: **А)** буфер с рН 7.5; **Б)** буфер с рН 6.4; **В)** буфер с рН 4.2 и **Г)** буфер с рН 2.7.

Допълнително потвърждение за дисоцииране на СОД до субединици е представено от йон с  $m/z$  1957,61 $[M+H]^+$ , докато началото на денатуриране на гликопротеина е отбелязано от йон с  $m/z$  1200.31 $[M+H]^+$  (Фиг. 48В). Пълно разгъване на молекулата на Cu/Zn-HiCOД 103 настъпва в разтвор при рН <3 (Фиг. 48Г) (Krumova et al., 2007).

Задълбочена информация за конформационната стабилност на ензимите е предоставена от проведените анализи с флуоресцентна спектроскопия и кръгов дихроизъм (КД). Сравнението на параметрите за холо- и апо-форми на СОД-зи доказват влиянието на медните йони върху квантовия добив на флуоресценция, както и  $\lambda_{max}$  (Табл. 13).

**Табл.13.** Флуоресцентни характеристики на Cu/ZnCOД-зи от *H. lutea* 110, 103 и *A. niger* 26.

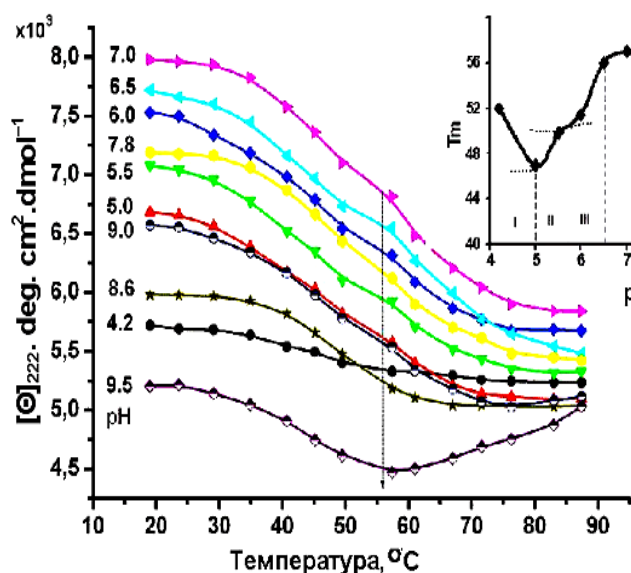
	AnCOД 26		HiCOД 110		HiCOД 103	
	Wholo-	apo-	wholo-	apo-	wholo-	apo-
Въглехидратно съдържание %	-	-	-	-	~1%	~1%
Емисионен максимум ( $\lambda_{max}$ )	343	346	328	338	346	349
Квантов добив (Q) мол	0.019	0.057	0.010	0.051	0.019	0.052
Критична температура ( $T_c$ )		68		68		61
Температура на топене ( $T_m$ )	69	61		59	65	53

Като гасител на триптофиловата флуоресценция се смята и дисулфидния мост, който е разположен в близост до индоловите ядра на Trp остатък в молекулата на Cu/Zn-HISOD 103. Включените в дисулфидната връзка два Cys остатъка на позиция 6 и 146 са разположени далеч от Trp32 остатък и следователно не оказват влияние върху емисията на индоловото му ядро (Dolashki et al., 2008a; Dolashka et al., 2011a).

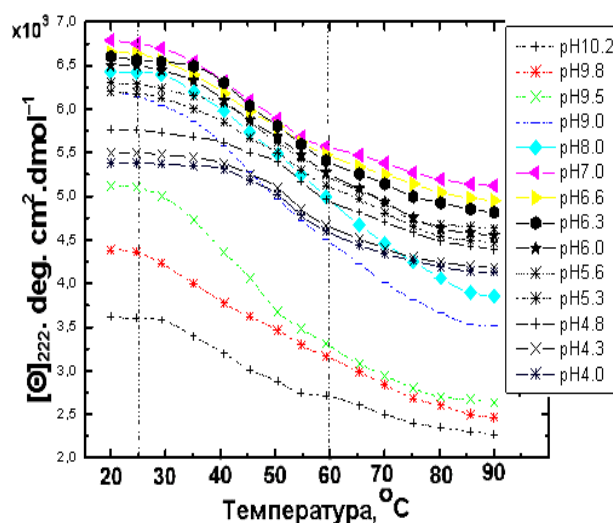
Комбинираното влияние на рН и температурата върху стабилността на два ензима, Cu/Zn-HISOD 103 и Cu/Zn-KmCOD NBIMCC 1984, също е проследено чрез КД, като подходящ метод за характеризиране на стабилността на гликопротеини. Представената на фигура 49А температурна зависимост на Cu/Zn-KmCOD, в буфери с рН4 до рН10, определя стойностите на  $T_m$ , които изразяват няколко температурни прехода. Разгъване на ензима се отчита в две рН области (рН 6.5-1.5 и 8.7-10), докато ензимът запазва своята стабилност в рН интервала 6.5 и 8.9 (Dolashka et al., 2011a; Nedeva et al., 2009). Преходът в киселата рН област протича в три етапа, като I-ви етап (рН 6.6-5.7) е свързан с дисоцииране на димерната форма на СОД до мономери, а II-ри (рН 5.7-5.0) и III-ти етап (рН 5.0-4.0) изразяват денатуриране на протеина (Nedeva et al., 2009).

По-задълбочен анализ на стабилността на Cu/Zn-HISOD 103 е постигнат след прилагане на термодинамичния подход и проследяване на ефекта на две независими променливи ( $T_m$  и рН) (Dolashka et al., 2011a). Сканираните КД спектри в температурния интервал 15-90°C представят  $T_m$  стойностите на ензима в буфери с рН 4-11 (Фиг. 50), които определят предполагаемите области на обратимост на процеса, представен на графичната зависимост рН/ $[\theta]_{222}$  на ензима, при различни температури (15-90°C) (Фиг. 50А).

Така представеното комбинирано действие във "фазова диаграма" (Фиг. 50Б) отчита влиянието на две променливи ( $T$ -рН) върху  $[\theta]_{222}$ , и очертава настъпилите рН-индуцирани конформационни промени в ензима. Еднаквата обратимост на разгъването на ензима е представена от линиите, които свързват  $T$ -рН точките : съответно линия 1 - 100%; линия 2 - 96%; линия 3 - 92% и линия 4 - 88% (Dolashka et al., 2011a).

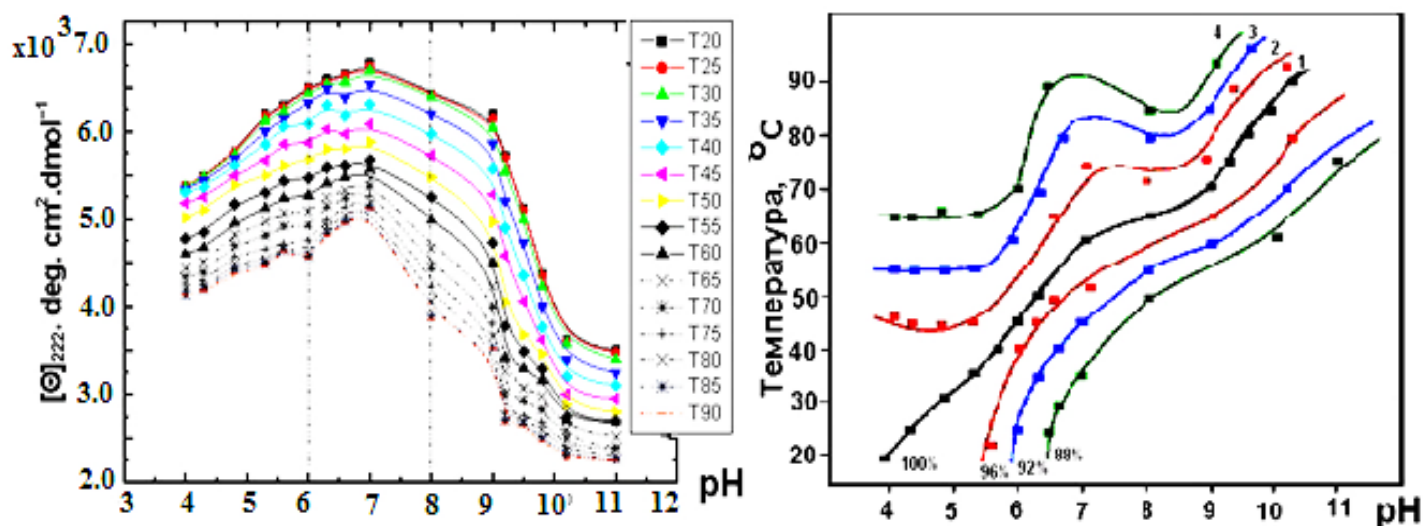


**Фиг. 49А)** Температурна зависимост на  $[\theta]_{222}$  на Cu/Zn-KmCOD при различни стойности на рН (4-10) на средата и  $T$  (20°C-88°C),  
**Б)** Зависимост  $-T_m$  на ензима от рН на разтвора.



**Фиг. 50.** Температурна зависимост на  $[\theta]_{222}$  на Cu/Zn-HISOD 103 при различни рН стойности на средата.  $T$ -индуцирани промени в интервал от 20 до 90°C.

Построената "фазова диаграма" позволява изчисляване на важни термодинамични параметри, като: специфичен температурен капацитет ( $\Delta C_p$ ), ефективна енталпия на денатурация (Van't Hoff's) при 25°C ( $\Delta H_{exp}$ ) и обратима денатурация ( $\Delta G_{exp}$ ).



**Фиг. 50А)** рН зависимост на  $[\theta]_{222}$  на Cu/Zn-NiCOD 103 от  $T = 20-90^{\circ}\text{C}$ . Предполагаема област на обратимост (пунктирани линии)

**Б)** "Т-рН фазова диаграма" на обратимост на ензима. Разстоянието между Т-рН линии очертава обратимостта (в %).

Също е установена много тясна област на висока обратимост на Cu/Zn-NiCOD 103 в рН интервал 6.0-8.0 и в температурния интервал от  $25^{\circ}\text{C}$  до  $60^{\circ}\text{C}$ , която включва две области на Т-прехода. Областта с висока обратимост (рН 6,0-8,0) на ензима Cu/Zn-NiCOD 103 е очертана от инфлексната точка на  $T_m$  (Фиг. 51А) и наклона на кривите  $\ln K_{\text{obs}}/R$  и  $1/T$  (Van't Hoff's), при рН 6.0 на средата. На база на тези данни са изчислени ефективните енталпии ( $\Delta H_{\text{VH}}$ ) за първи ( $\Delta H_m=8.5 \text{ kcal/M}$ ) и втори температурен преход ( $\Delta H_m=10.87 \text{ kcal/M}$ ) (Фиг. 51Б).

**Табл. 13.** Термодинамични характеристики на обратимо денатуриране на:

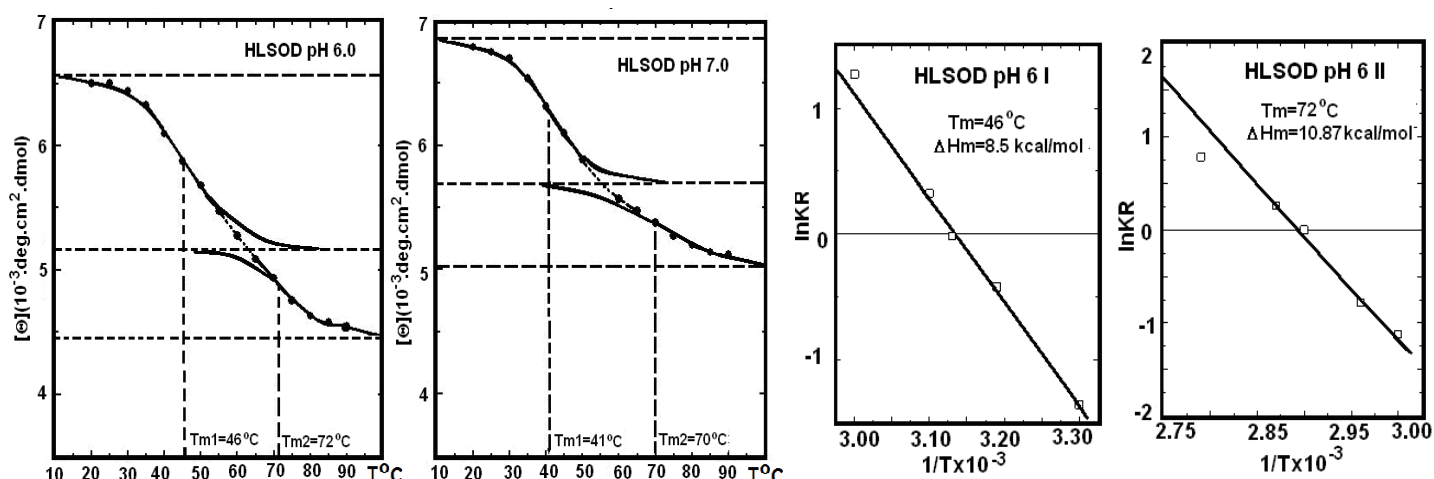
**А) Cu/Zn-NiCOD 103 и Б) СОД от говеда.**

СОД <i>H. Lutea</i> 103				СОД от говеда		
I преход				II преход		
рН	$\Delta H_o \text{ kcal/mol}$	$\Delta S_o \cdot 10^{-3} \text{ kcal/mol}$	$\Delta G_o \text{ kcal/mol}$	$\Delta H_o \text{ kcal/mol}$	$\Delta S_o \cdot 10^{-3} \text{ kcal/mol}$	$\Delta G_o \text{ kcal/mol}$
6.0	1.4	3.6	-13.48	2.8	-1.11	-25.55
6.6	1.3	3.6	-11.02	2.8	-1.11	-23.35
7.0	1.3	3.7	-10.40	2.8	-1.11	-23.85
8.0	1.3	3.7	-12.87	2.8	-1.14	-24.33
СОД от бивол				II преход		
I преход				II преход		
рН	$\Delta H_o \text{ kcal/mol}$	$\Delta S \cdot 10^{-3} \text{ kcal/mol}$	$\Delta G_o \text{ kcal/mol}$	$\Delta H_o \text{ kcal/mol}$	$\Delta S \cdot 10^{-3} \text{ kcal/mol}$	$\Delta G_o \text{ kcal/mol}$
5.6	1.2	3.72	6.34	1.2	3.48	7.59
6.0	1.2	4.00	4.96	1.2	3.35	7.31
7.0	1.3	4.16	5.91	1.3	3.72	6.57
8.0	1.2	3.57	5.44	1.2	3.33	5.06

Отразените в таблица 13 стойности за  $T_m$  и  $\Delta H_m$  показват всички преходи в областта на обратимост на ензима. Разположените на една права линия, експериментално определени стойности на  $\Delta H_m$ , доказват пълна обратимост на ензима Cu/Zn-NiCOD 103 в рН областта от 6.0 до 8.0 (фиг. 51Б).

Допълнителна характеристика е представена от правите линии, които определят ефективния топлинен капацитет при фиксирано налягане ( $\Delta C_p \approx \partial \Delta H_{\text{VH}} / \partial T$ ), както и изчислените средни стойности  $\Delta C_p(\text{I})=0.29 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{grad})$  за първия и  $\Delta C_p(\text{II})=0.34 \text{ kcal}/(\text{mol} \cdot \text{grad})$  и за втория температурен преход на разгъване на ензима (фиг. 51Б).

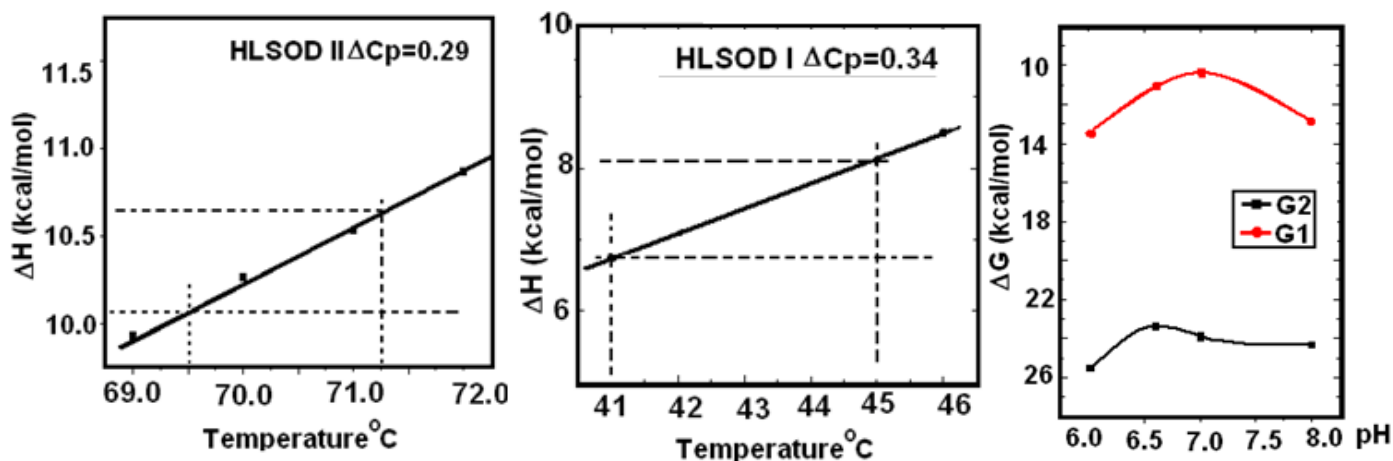
Стойностите на  $\Delta H_o$  за първия (1.3 kcal/mol) и втория (2.8 kcal/mol) преход доказват рН-независими процеси, настъпили в резултат на хидрофобно прегрупиране на четвъртичната структура на ензима (Фиг. 52) (Dolashka et al., 2011c).



**Фиг. 51А)** Криви на температурно разгъване на Cu/Zn-НСОД103, в 20 mM Tris буфер.

**Б)** Линеализирани криви на Van't Hoff's в координати  $\ln K_{obs}/R_{vs}$  и  $1/T$ . Определени са  $\Delta H_{VH}$  от наклона на линии с рН 6.0.

От експериментално изчислената обща стабилност  $\Delta G^{\circ}_{exp} = 33,4$  kcal/mol, която представя рН-зависимостта  $[\Delta G_{o,exp}(pH)]$ , е определено обратимото денатуриране на ензима. Докато сравнителният анализ на кривите G1 и G2 представя различно йонизиране на страничните вериги на АКО на Cu/Zn-НСОД 103 и при двата процеса (Фиг. 53) (Dolashka et al., 2011a).



**Фиг. 52.**  $H_m/T_m$  графична зависимост за всички рН стойности от областта на рН 6.0–8.0 на денатуриращия процес. Определяне на специфичния температурен капацитет ( $C_p$ ).

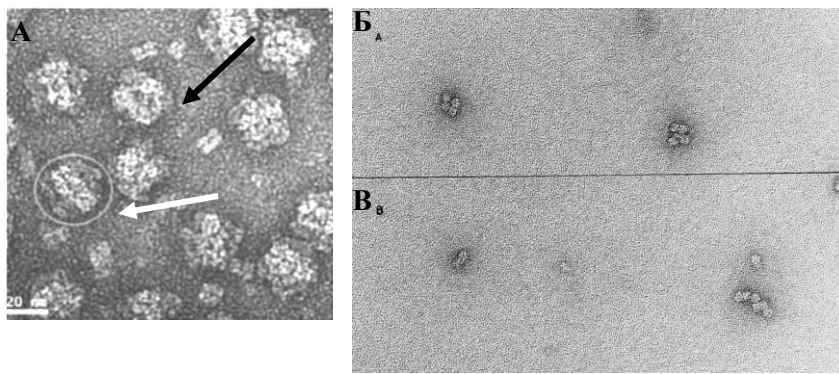
**Фиг. 53.** Зависимост на изчислената свободна енергия на денатурация (Gibbs) на Cu/Zn-НСОД 103, от рН 6.0 до рН 8.0.

Определените термодинамични параметри допълват характеристиката на рН и температурната стабилност на Cu/Zn-НСОД 103, които съответстват на публикуваните данни за други СОД-зи, но показват по-висока стабилност в сравнение с говежда СОД.

## IV.5.2. ФУНКЦИЯ НА ГЛИКАНИТЕ ПРИ ХЕМОЦИАНИНИ ОТ ВИД *ARTHROPODA*

### IV.5.2.1. Участие на гликаните в структурата на хемоцианини от вид *Arthropoda*

Представените ТЕМ анализи на нативната молекула на хемоцианин от *M. squinado* (Фиг. 54А) (Dolashka-Angelova et al., 2000a) и от *E. verrucosa* (Фиг. 54Б) потвърждават характерната хексамерна форма (пх6) за хемоцианини от ракообразни, която се разграничава съществено от структурата на хемоцианини от мекотели. Огромната олигомерна структура на хемоцианин от *M. squinado* се дисоциира на съставните субединици с Мм около 75 kDa след диализа срещу буфер с рН 9 (Фиг. 54В), което е характерно и за хемоцианини от *C. aestuarii*, *L. polyphemus* и *B. sindicus*.



**Фиг. 54.** ТЕМА на хемоцианини ( $0.1 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) в  $10 \text{ mM Tris:HCl}$  буфер,  $\text{pH } 7.0$ ,  $10 \text{ mM CaCl}_2$ ,  $10\% \text{ MgCl}_2$ :  
**А)** Хемоцианин от *E. verrucosa* – Хексамери (бяла стрелка), мултихексамери (черна).  
**Б)** Нативна форма на Msh.  
**В)** Дисоциирана форма на Msh. Оцветяване с  $1\% \text{ uranyl acetate}$ .

Процесът на по-бързото дисоцииране при диализа на хемоцианини от вид *Arthropoda* може да бъде обяснен със сравнително по-късите въглехидратни вериги, които се различават от представените въглехидратни структури при хемоцианини от вид *Mollusca*.

#### IV.5.2.2. Влияние на въглехидратната структура върху стабилността на хемоцианини от вид *Arthropoda*

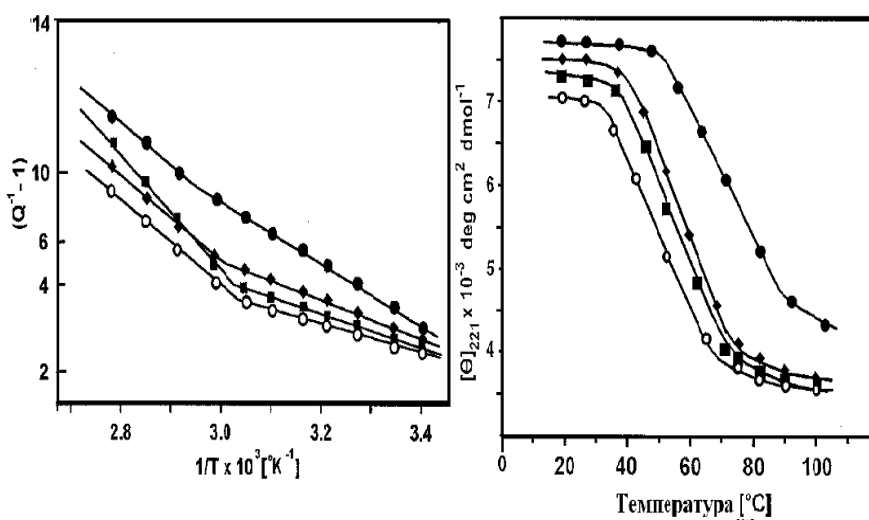
##### Температурна и рН стабилност на хемоцианини от вид *Arthropoda*

Резултатите от сравнителните анализи чрез флуоресцентна спектроскопия и кръгов дихроизъм определят хемоцианина от *H. americanus*, като значително по-термостабилен ( $T_c=87^\circ\text{C}$ ) протеин в сравнение с останалите хемоцианини от вид *Arthropoda* (Табл. 14).

**Табл. 14.** Термостабилност и свободна енергия на стабилизация на хемоцианини от *Arthropoda*

Хемоцианин	$T_c$ ( $^\circ\text{C}$ )	$T_m$ ( $^\circ\text{C}$ ) оку- аро-	$E_a$ $\text{kJ mol}^{-1}$	Въглехидратно съдържание %	$\Delta G_D^{\text{H}_2\text{O}}$ $\text{kJ mol}^{-1}$	$C_m$ (M)
<i>H. americanus</i>	87	80 76	50.5	0.9	13.50	
<i>C. maenas</i>	63	72 69	33.7		11.40	
<i>M. squinado</i>	76	72 67	48.3		12.60	
Bsin1	67		37.7		16.8	4.5
<i>P. vulgaris</i>				0.1	12.2	
<i>L. polyphemus</i>				0.1		4.0
<i>C. aestuarii</i>	63	72 69	19.62	4.9	2.80	4.7
CaSS2	57	55 58	7,7	6.3	1.80	3.4
<i>E. verrucosa</i>		72				
EvH1		60				
EvH4		57				

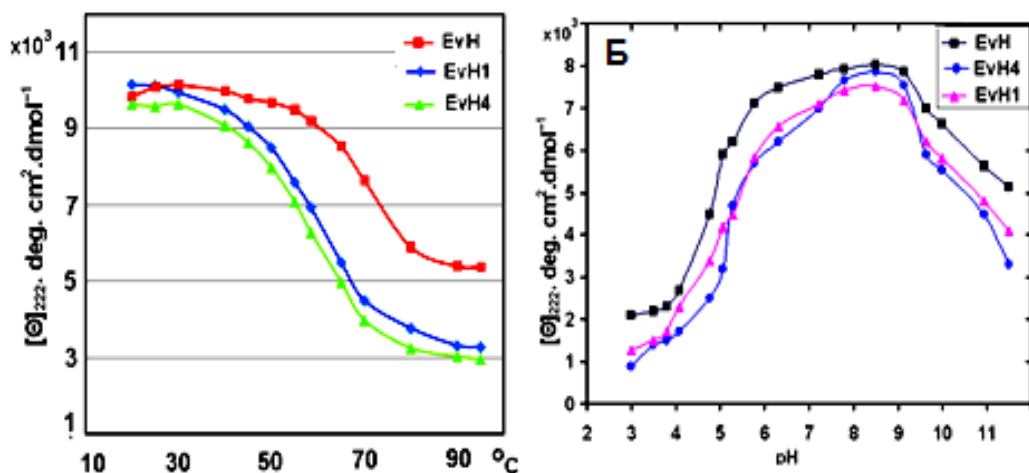
Представените  $T_c$  ( $52-59^\circ\text{C}$ ) на CaеН и субединиците са изчислени от отклонението на правата линия на Арениусовата зависимост  $\ln(Q^{-1}-1)$  vs.  $1/T$ , където протеинът претърпява денатурация. Определените стойности са близки с представените стойности чрез КД за  $T_m$  ( $49-55^\circ\text{C}$ ) (Фиг. 55Б), както и с публикуваните  $T_c$  стойности ( $50-60^\circ\text{C}$ ) за други хемоцианини (Dolashka-Angelova et al., 1999c).



**Фиг.55.** Температурна зависимост, определена чрез флуоресцентна спектроскопия на: **А)** триптофилова флуоресценция на апо-форми на хемоцианин от *C. aestuarii* (●-●), субединици CaеSS1 (◆-◆), CaеSS2, (■-■) CaеSS3 (○-○), в  $50 \text{ mM Tris/ HCl}$  буфер,  $\text{pH } 8.9$ , **Б)**  $[\theta]_{222}$  на апо-формите на CaеН (●-●); CaеSS1 (◆-◆), CaеSS2 (■-■) и CaеSS3 (○-○), проследена чрез КД.

Сравнителните анализи чрез КД също представят молекула на EvH ( $T_m = 72^\circ\text{C}$ ) като по-стабилна от двете субединици EvH1 ( $T_m=60^\circ\text{C}$ ) и EvH4 ( $T_m=57^\circ\text{C}$ ). Наблюдаваните относително малки изменения на  $[\theta]_{222}$  при високи температури (до  $75^\circ\text{C}$ ) предполага, че при неутрално pH много от елементите на вторичната структура на EvH се запазват. Началото на слабо T-зависимо разгъване е отчетено след температура  $>70^\circ\text{C}$ , където протеинът губи "глобуларното си състояние" и преминава в денатурирано (Dolashki et al., 2015).

Потвърждение на хипотезата за участие на олигозахаридните структури в стабилизиране на хемоцианини от вид *Arthropoda* са допълнителните данни, предоставени от сравнителни КД анализи на влиянието на pH върху  $[\theta]_{222}$  на нативната молекула EvH, върху гликозилирана (EvH1) (Фиг. 56А) и негликозилирана субединица (EvH4) (Фиг. 56Б).

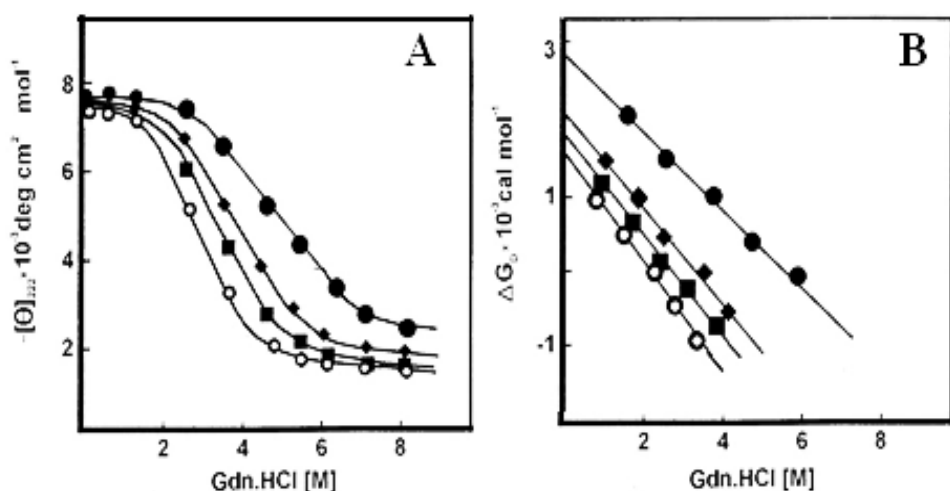


**Фиг. 56.А)** Зависимост на  $[\theta]_{222}$  на EvH и EvH1 и EvH4 след промяна на T. **Б)** Зависимост на  $[\theta]_{222}$  на EvH, EvH4 и EvH1 от промяната на pH на средата.

Представената на фигура 56В зависимост на  $[\theta]_{222}$  от pH на средата изразява и при трите протеина криви с формата на "камбана", които показват сходство на настъпилите промени в молекулите в алкалната и в киселата pH области, при  $T=25^\circ\text{C}$ . Констатираните различия в поведението на протеините, където не се наблюдава съществена промяна на  $[\theta]_{222}/\text{pH}$ , са в по-широко изразената pH областта за EvH (от pH 6.0 до 9.2), в сравнение със субединиците (от pH 7.5 до 9.0). Тези резултати са потвърждение на по-високата pH-стабилност на нативната молекула на EvH, в сравнение с двете субединици EvH1 и EvH4 (Dolashki et al., 2015).

### Стабилност на хемоцианини от *Arthropoda* към денатуриращия реагент Gdn-HCl

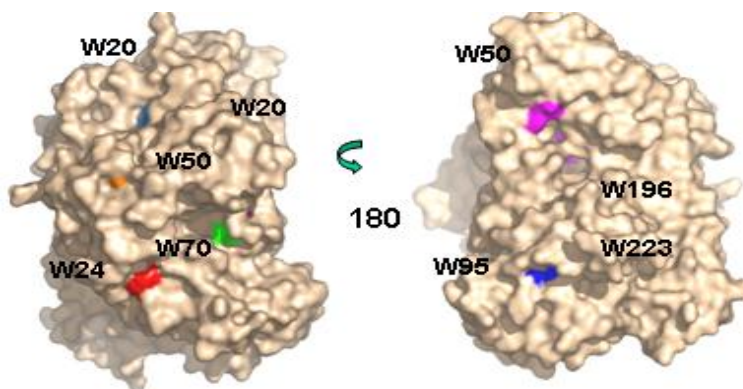
Други известни фактори с влиянието си върху стабилността на хемоцианините са денатуриращите реагенти урея и Gdn-HCl. Представените изменения на  $[\theta]_{222}$  при много ниски концентрации на Gdn.HCl (0.5 M) са свързани с дисоцииране на молекулата на CaеН до субединици, докато по-високата концентрация причинява разгъване на протеина.



**Фиг. 57А)** Промяна на  $[\theta]_{222}$  от концентрацията на Gdn.HCl за *Ca aestuarii* хемоцианин (●-●); субединици CaSS1 (◆-◆); CaSS2 (■-■) и CaSS3 (○-○), в 50 mM Tris/HCl буфер, pH 8.9 и **Б)** Зависимост на  $\Delta G_D \text{H}_2\text{O}$  от концентрацията на Gdn.HCl.

Процесът води до необратими конформационни промени на CaеН (4-5 М Gdn·HCl) и субединиците (3.5-4 М Gdn·HCl), което се дължи на не възстановяване на началната конформация на гликопротеините след отстраняване на денатуранта (Фиг. 57А) (Dolashka-Angelova et al., 1999c). По-стабилната форма на CaеН, в сравнение със субединиците, е установена след прилагане на различни концентрации на Gdn·HCl, от което е изчислена по-висока ~1.3 пъти свободна енергия на стабилизация във вода ( $\Delta G_D^{H_2O}$ ) за CaеН (Фиг.57Б) в сравнение с тези за субединиците. Интересно поведение демонстрират структурните субединици на CaеН, които показват по-висока стойност на  $\Delta G_D^{H_2O}$  за гликозилираната CaеSS2, в сравнение с останалите негликозилирани субединици (Dolashka-Angelova et al., 2001; 2005 b).

**Фиг.58.** 3D -модел на субединица CaеSS2. Триптофиловите остатъци са показани в червено, като погребаният Trp 483 не е отбелязан; N-гликозилиран център (Asn309) е показан в синьо.



Построеният 3D -модел на субединица CaеSS2 (Фиг. 58) предоставя обяснение на получените резултати за поведението на хемоцианини от вид *Arthropoda* и изоформите им. Представеният N-гликозилиран център на модела на CaеSS2 е изложен на повърхността на молекулата, което предполага възможност за участие на гликана във формиране на хексамерните форми на хемоцианина и следователно има значение за стабилизиране на нативната молекула на CaеН (Dolashka-Angelova et al., 2001; 2005 b).

#### IV.5.3. ФУНКЦИЯ НА ГЛИКАНИТЕ В ХЕМОЦИАНИНИ ОТ ВИД *MOLLUSCA*

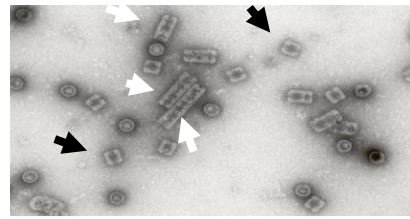
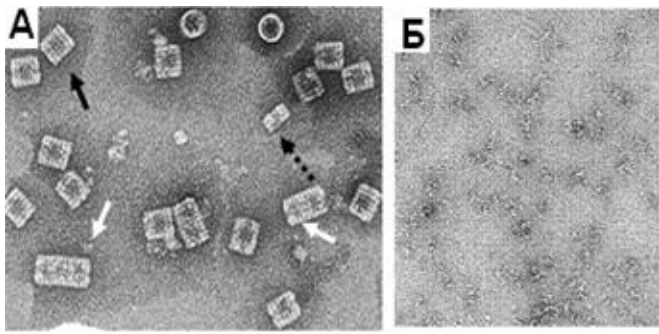
##### V.5.3.1. Участие на гликаните в изграждане на четвъртичната структурата на хемоцианини от вид *Mollusca*

Разположените гликани на ръба на цилиндричната стена на KLH1 представляват голям интерес, като се предполага, че пречат за формиране на мултидекамери. Такъв специфичен N-гликозилиран център е представен в HtH1-h и  $\beta_c$ -H1H-h, но липсва в RvH1-h, KLH2-h и HtH2-h. Отсъствието на гликани е доказано в две ФЕ-ци (RvH1-b и RvH2-c) след анализ на въглехидратните структури на 16 ФЕ-ци от RvH. На база на тази подробна информация е проследена ролята на въглехидратната структура върху формиране на олигомерните комплекси на хемоцианини от *R. venosa*, *H. lucorum* и *H. tuberculata* (Dolashka-Angelova et al., 2003a; 2003b; 2010a; Velkova et al., 2015).

##### **Влияние на гликаните върху поведението на дисоциация и реасоциация (фибрилизацията) на нативните молекули на H1H и RvH**

Функцията на разположените гликани на повърхността на нативната молекула на хемоцианини от вид *Mollusca* е проследена чрез ТЕМА, които представят различно поведение на хемоцианин от *R. venosa* и от *H. lucorum*, в сравнение със субединици RvH1, RvH2,  $\beta_c$ -H1H,  $\alpha_D$ -H1H и  $\alpha_N$ -H1H след промяна на рН на средата и на концентрациите на  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  йони. ТЕМ анализите на H1H в СБ (20 mM  $CaCl_2$  и 5 mM  $MgCl_2$ , рН 7,5) показват оформени дидекамери, декамери и много къси мултидекамери (фиг. 59А).



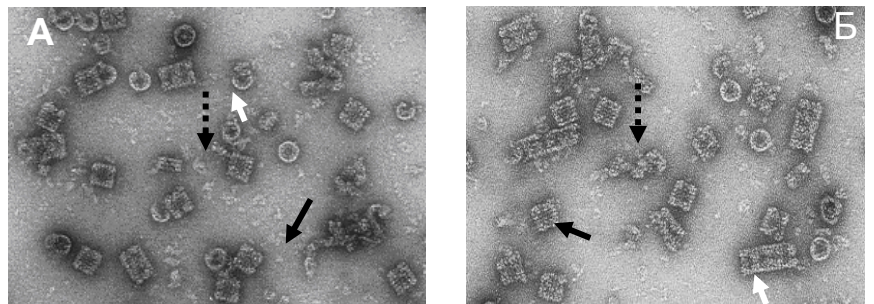


**Фиг. 60.** ТЕМА на реасоцииране в СБ, на дисоцииран RvH; Оформени дидекамери – черни стрелки и мултимери – бели стрелки.

**Фиг. 59.** ТЕМ анализ на H1H: **А)** Страничен изглед (правоъгълни форми); изглед отгоре (кръгли форми); мултидидекамери (бели стрелки); дидекамери (черна); декамери (пунктирна стрелка). **Б)** Дисоциирана H1H след диализа в буфер 0.13 M Gly/NaOH, при pH 9.6.

H1H демонстрира сходно поведение с RvH, HtH и KLH, като след 24 ч диализа срещу 0.13 M Gly/NaOH буфер с pH 9.6 протича дисоциация на агрегата до изграждащите го структурни субединици (Фиг. 59Б) (Velkova et al., 2010a). Голямо различие в поведение на дисоциираните RvH и H1H и изграждащите ги субединици е отбелязано от ТЕМ анализите (Фиг. 59, 60).

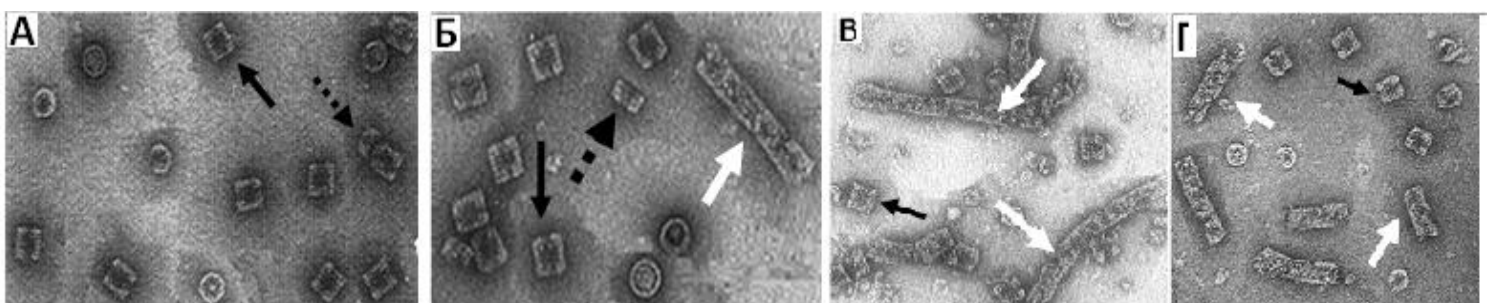
**Фиг. 61.** ТЕМА на реасоциация на H1H след 2 дни диализа в СБ, 50 mM Tris/HCl, pH 7.0, **(А)** 20 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub> и **(Б)** 100 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub>. Стрелките – дидекамери (черни); декамери – пунктирани; мулти-декамери-бяло. Оцветяване с 1% уранил ацетат. Мащаб x 52 000.



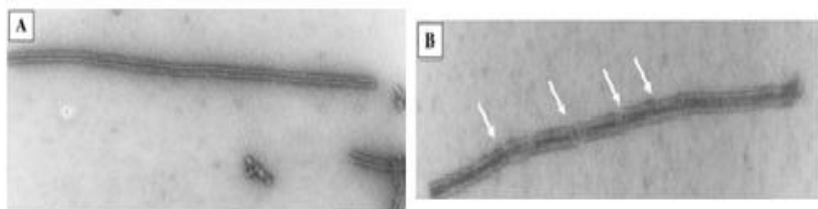
След реасоцииране на H1H в СБ, с повишена концентрация от 20 mM до 50 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub>, процесът на реасоциация се ускорява за субединиците на H1H (Фиг.61А), като пълната реасоциация достига след три дни диализа срещу СБ буфер, 100 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub> (Фиг.61Б) (Dolashka-Angelova et al., 2003b; Velkova et al., 2009a; 2010a).

### Стабилност и реасоциация на субединиците $\beta_c$ -H1H, RvH1 и RvH2

Установено е голямо различие при поведението в СБ на изоформите  $\beta_c$ -H1H,  $\alpha_D$ -H1H и  $\alpha_N$ -H1H, представени като декамери (пунктирни стрелки), субединици и предимно дидекамерни форми (черни стрелки) (Фиг. 62А) (Velkova et al., 2010a). Реасоциацията на  $\beta_c$ -H1H в СБ с 10 mM CaCl<sub>2</sub> води до формиране на къси тубули, изградени от прикрепени декамери към по-късите страни на другите декамери (Фиг. 62Б), които с повишаване на концентрацията на 20 mM CaCl<sub>2</sub> в СБ се групират в дълги тубули (Фиг. 62В). Подобен процес протича и при реасоцииране на  $\alpha$ -H1H в СБ с 20 mM CaCl<sub>2</sub>, които оформят дидекамери и тубули с различна дължина (Фиг. 62Г), но по-къси от формираните от нативната молекула  $\beta_c$ -H1H (Фиг. 62В) (Dolashka et al., 2003a).



**Фиг. 62.** ТЕМ анализ на  $\beta_c$ -H1H и  $\alpha_D$ -H1H: **А)** Пречистена  $\beta_c$ -H1H; **Б)** Реасоциация на  $\beta_c$ -H1H в СБ с 10 mM CaCl<sub>2</sub>; **В)** Реасоциация на  $\beta_c$ -H1H в СБ с 20 mM Ca<sup>2+</sup> и 10 Mg<sup>2+</sup>; **Г)** Реасоциация на  $\alpha$ -H1H в СБ с 20 mM CaCl<sub>2</sub>. Мащаб x 52 000 и оцветяване с 1% уранил ацетат.



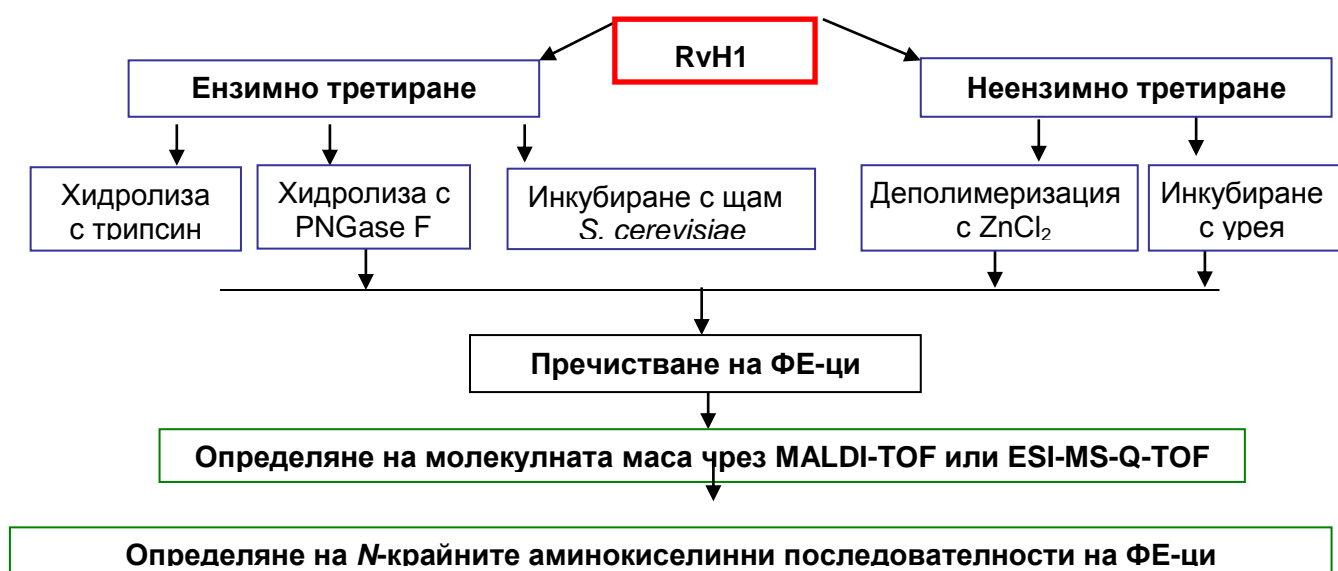
**Фиг. 63.** TEM анализ на реасоциация на субединица RvH1 след 3 дни диализа в:  
**А)** 50 mM Tris/HCl буфер, pH 7.0, с 50 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub>. **Б)** 50 mM Tris/HCl буфер, pH 7.0 и 100 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub>.

Интересно поведение показва субединица RvH1, което се различава от поведението на RvH2, но и спрямо други хемоцианини от вид *Mollusca*, като след 3 дни диализа на RvH1 в СБ, с 50 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub> образува дълги олигомери, мултидекамери и тубули (Фиг. 63А). Дължината на тези форми значително нараства с повишаване на йонната концентрация до 100 mM (Фиг. 63Б) (Dolashki et al., 2008a), което доказва зависимост на реасоциацията на RvH1 и KLH2 от концентрацията на CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub>.

Предположението за зависимост на стабилността на реасоциираните субединици на RvH и NH се потвърждава от представените данни след промяна на pH на средата, като дължината на образуваните тубули се скъсява след 1 и 3 дни диализа срещу СБ с pH 8.6, съдържащ 100 mM CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub> (Dolashka-Angelova et al., 2003a; Velkova., et al., 2010b).

#### IV.5.3.2. Участие на гликаните в изграждане на третичната структура на хемоцианини от вид *Mollusca*

Друго значение на олигозахаридната структура е свързано с изграждане на третичната структурата на RvH1, което е доказано след въздействие с различни фактори и сравнителен анализ на поведението на електрофоретично чистата и добре изучена олигозахаридна структура на субединица RvH1 (Фиг. 64) (Dolashka-Angelova et al., 2009).



**Фиг. 64.** Схема на проведените изследвания върху структурата на субединица RvH1.

Приложените два основни подхода за третиране на RvH1 включват : **1-ви подход** - Неензимно третиране (с урея и цинков двухлорид) и **2-ри подход** - Ензимно третиране (с трипсин, гликозидаза PNGase F и щам *Saccharomyces cerevisiae*), в резултат на което е представена хипотеза за участие на гликаните в изграждане на третичната структура на RvH1 (Dolashka-Angelova et al., 2007).

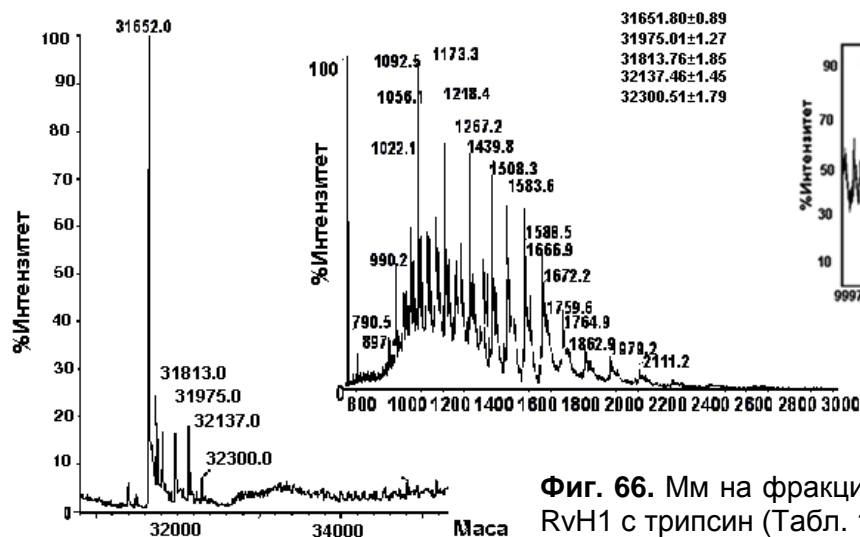
#### **Първи подход - Анализ на третичната структура на RvH1 след ензимно третиране**

Първият подход включва сравнителен анализ на третичната структура на RvH1 след ензимно третиране на субединицата с трипсин, PNGase F и щам *S. Cerevisiae*, който е продуцент на специфични гликозидази.

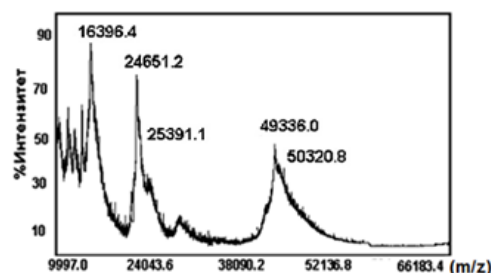
**Табл. 15.** Молекулни маси на изолирани фракции след третиране на RvH1 с <sup>a</sup> трипсин, <sup>b</sup> ZnCl<sub>2</sub>, и <sup>c</sup> *S. cerevisiae*, определени с MALDI-TOF/MS. A<sub>345</sub>/A<sub>280</sub> = 0.21 дава информация за ФЕ-ци.

№	Фракции	Молекулна маса (Да ± 100)				A <sub>345</sub> /A <sub>280</sub> <sup>d</sup>
1	<sup>a</sup> 1-Трипсин		47 581±50			0.0203
2	<sup>a</sup> 2-Трипсин	35415±50	50 014±50	99710±100	141476±150	0.0210
3	<sup>a</sup> 3-Трипсин		47 592±50	95078±100		0.0198
4	<sup>a</sup> 4-Трипсин		50 398±50	100053±100		0.025
5	<sup>a</sup> 5-Трипсин	31 652 ± 50		95 053 ± 100	126512±150	0.0208
6	<sup>a</sup> 6-Трипсин	16 396 ± 50	49 336 ± 50			0.0201
7	<sup>a</sup> 7-Трипсин		48 142 ± 50	95 393 ± 100		0.0198
8	<sup>a</sup> 8-Трипсин		46 739 ± 50			0.0204
9	<sup>b</sup> 1 - ZnCl <sub>2</sub>		48 631 ± 50		143211±150	0.0210
10	<sup>b</sup> 2 - ZnCl <sub>2</sub>		51 418 ± 50			0.0202
11	<sup>b</sup> 3 - ZnCl <sub>2</sub>		47 630 ± 50	95 043 ± 100	140930±150	0.0205
12	<sup>b</sup> 4 - ZnCl <sub>2</sub>		50 491±50			0.0201
13	<sup>b</sup> 5 - ZnCl <sub>2</sub>		49 736 ± 50	97 245 ± 100	144670±150	0.0202
14	<sup>c</sup> 1 - дрожди		47 277 ± 50	98 461 ± 100	146193±150	0.0199
15	<sup>c</sup> 2 - дрожди		47 560 ± 50			0.0203
16	<sup>c</sup> 3 - дрожди		48 078 ± 50			0.0207
17	<sup>c</sup> 4 - дрожди		50 316 ± 50			0.0211
18	<sup>c</sup> 5 - дрожди		45 659 ± 50	110 083±100		0.0202
19	<sup>c</sup> 6 - дрожди		51 418 ± 50			0.0193
20	<sup>c</sup> 7 - дрожди		49,726 § 50	97,847 ± 100	147,548± 150	0.0203

Резултати представят различия в *N*-крайните АКП и Мм (~ 45-50 kDa) на получените фракции след трипсинолиза на RvH1 и елуирани на колона Resource Q 6 ml фракции: 2, 5 и 6 (Табл. 15). Изолираната фракции 6 на Resource Q 6 ml е представена от един протеин с Мм 49336.0 Da, изразен на MS спектъра съответно от йони с *m/z* 49336.0 [M+2H]<sup>+</sup>, с *m/z* 24651.2 [M+2H]<sup>2+</sup> и *m/z* 16396.4 [M+H]<sup>3+</sup> (Фиг. 65).



**Фиг. 66.** Мм на фракция 5, изолирана след третиране на RvH1 с трипсин (Табл. 15).  
(вътрешна фигура) ESI-Q-TOFMS на фракция 5.



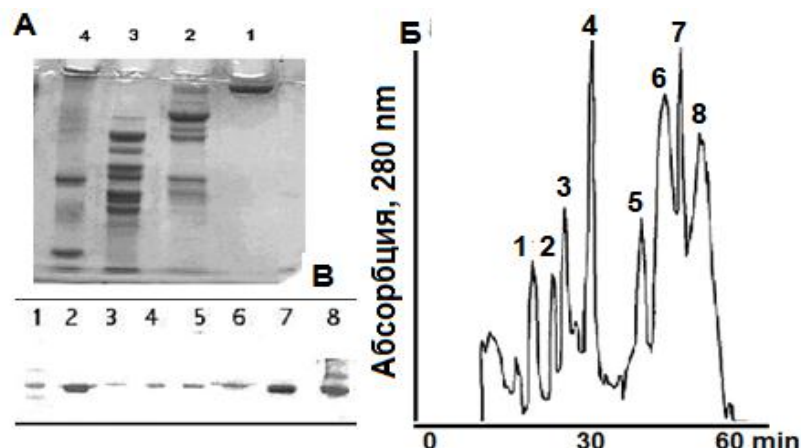
**Фиг. 65.** MALDI-MS на изолирана фракция след третиране на RvH1 с трипсин.

Една от измерените с MALDI-TOF Мм за протеин от фракция 5 (Фиг. 66) е 31652 Da и е представена в сканирания спектър на ESI-MS-Q-TOF от йони с *m/z* 31653, 31813, 31975, 32137 и 32300±2 kDa. Определената разлика с 162 Da между тези йони съответства на Мм на един Hex остатък, което е доказателство за гликозилирания характер на елуирания протеин във фракция 5. Данните от измерванията също са доказателство, че протеинът свързва гликопептид от високо манозен тип.

Добре обосновано потвърждение на изразеното предположение е проведеното разкъсване на връзката между гликана и полипептидната верига на RvH1 след третиране със специфичния ензим PNGase F. Електрофоретично доказаната промяна на Мм на RvH1 след 48 и 72 часа инкубиране на RvH1 с 75 mU PNGase F, при 37°C, също представя интересно поведение на

субединицата. Представената на 10% гел SDS-ПАГЕ субединица RvH1 с  $M_m \approx 420$  kDa (Фиг.67А, позиция 1) след третиране с PNGase F показва серия от фракции с по-ниски Мм (Dolashka-Angelova et al., 2007).

Друго доказателство в подкрепа на направената хипотеза е генериране на фрагменти с Мм  $\sim 50$  kDa след инкубиране на RvH1 в среда на дрожди *S. cerevisiae*, което е в основата на предположението, че дрождите продуцират специфични гликозидази, които разкъсват въглехидратните връзки на гликаните с ФЕ-ци (Табл. 15) (Фиг. 67В).



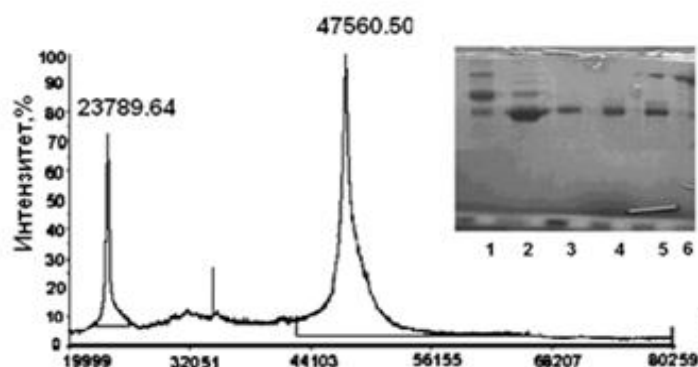
**Фиг. 67А.** 10% SDS-ПАГЕ на RvH1 преди и след третиране с PNGase F. **позиция 1** - RvH1 преди третиране ( $M_m=420$  kDa); **2 и 3** - след 2 и 3 дни третиране на RvH1 с ензима; **4** – (стандарт) 66 kDa и 14.4 kDa. **Б).** Разделяне на фракциите след инкубиране на RvH1 с щам *Saccharomyces* на колона Resource Q 6 ml, с 50 mM Tris/HCl буфер, pH 8.2, нелинеен градиент (0-0.5 M NaCl). **В).** 10% SDS-ПАГЕ на фракции.

### Втори подход - анализ на третичната структура на RvH1 след неензимно третиране

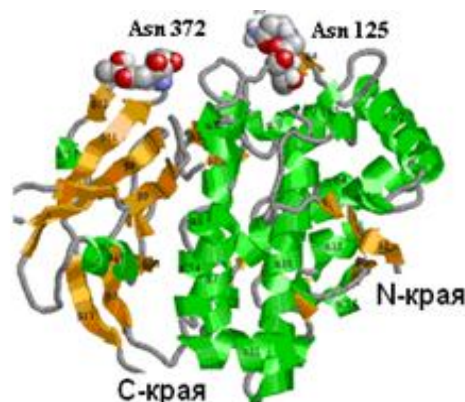
Изказаната хипотеза е потвърдена от представените резултати от Втори подход, който включва анализ на третичната структура на RvH1 след неензимно третиране с урея, или  $ZnCl_2$ . Получените ФЕ-ци са в резултат на прилагане на неензимния метод на диализа на субединицата RvH1 срещу буфер с 2 M урея (Фиг. 68). Този метод е базиран на причиненото разгъване на молекулата на протеина в разтвор на урея, в резултат на което се разграждат нековалентните връзки. Следователно, като причина за наблюдаваните резултати може да се посочи разграждане на нековалентни връзки между отделните функционални единици в RvH1, което настъпва след разгъване на молекулата (Dolashka-Angelova et al., 2007).

Друг аргумент в подкрепа на изказаната хипотеза са получените фрагменти с Мм около 45-50 kDa след 15 дневна диализа на RvH1 в буфер 0.13M Gly/NaOH, с pH=9.5 и 0.4 mM  $ZnCl_2$ . За някои от пречистените фракции на колона Resource Q са измерени Мм  $\sim 50$ , 100 и 150 kDa, които съответстват на Мм на 2 или 3 свързани ФЕ-ци (Фиг. 68, вътрешна фигура).

Интерес представляват получените фрагменти с Мм около 45-50 kDa след 15 дневна диализа на RvH1 в буфер 0.13M Gly/NaOH, с pH=9.5 и 0.4 mM  $ZnCl_2$ .



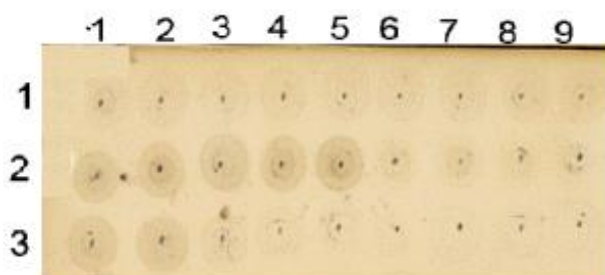
**Фиг. 68.** MS-спектър на изолирана фракция 3 с Мм 47560 Da, получена след неензимно третиране на RvH1 с  $ZnCl_2$ .



**Фиг. 69.** 3D -модел на ФЕ  $\beta$ -НИН-g, построен на базата на 3D -модел. Два домена-„централен” и „ $\beta$ -сандвич”

Изразените на MS спектъра йони с  $m/z$  23790  $[M+2H]^{2+}$  и с 47560  $[M+H]^+$  представляват пречистена функционална единица с Мм 47560 Da (Фиг. 68), което подкрепя информацията за нековалентно свързване на гликаните към протеина.

Допълнително моделите на  $\beta_c$ -NH-g (Фиг. 69) и подобрения 3D -модел на ФЕ RvH-e (Velkova et al., 2009) потвърждават разположението на гликаните на повърхността на ФЕ-ци, което ги прави по-достъпни за взаимодействие (Kostadinova et al., 2013).



**Фиг. 70.** Орсинол/ $H_2SO_4$  тест на получените ФЕ-ци от RvH1: **линия 1**, позиция 1-9 – след третиране на RvH1 с трипсин;  
**л. 2, п. 1-9** – след третиране на RvH1 с  $ZnCl_2$ ;  
**л. 3,**–след 1 и 2 ден от третиране (п. 1-4), и след 3 ден (п. 5-9) с щам *S. cerevisiae*

Този експеримент предоставя важна информация за гликозилираните форми на ФЕ-ци, получени след третиране на RvH1 с трипсин и деполимеризация с  $ZnCl_2$  (Фиг.70, линия 1 и 2, позиции 1-9). В подкрепа на изказаната хипотеза е наблюдаваният отрицателен тест за получените ФЕ-ци след 3 дни култивиране на RvH1 с щам *S. cerevisiae* (Фиг. 70, линия 3 и 2, позиция 5-9), за които се предполага, че са получени като резултат от разграждане на гликаните на RvH1 от продуцираните специфични ензими от щама.

#### IV.5.3.3. Влияние на гликаните върху стабилността на нативната молекула и изоформите на хемоцианини от вид *Mollusca*

Като много важно предимство, при проследяване и сравняване на влиянието на олигозахаридните структури върху стабилността на молекулите, трябва да се отбележи добре изучените въглехидратни структури на RvH и KLH. Също с проведените изследвания са определени важни характеристики, като критична температура ( $T_c$ ) и средна температура на термично денатуриране ( $T_m$ ), средна концентрация на денатурантите Gdn.HCl и урея ( $C_m$ ), свободна енергия на стабилизация ( $\Delta G_D$ ), области на денатурация и др. характеристики за интактните молекули на KLH, RvH и изоформите им (Табл. 16).

**Табл. 16.** Физико-химични характеристики на KLH, RvH и изграждащите ги субединици

Хемоцианин	$T_c$ (°C)	$T_m$ (°C) окси- апо-	$E_a$ kJ mol <sup>-1</sup>	Въглехидратно съдържание %	$\Delta G_D^{H_2O}$ kcal. mol <sup>-1</sup>	$C_m$ (M)
RvH	71	70 68	21.4	8.9	5.4	4.5
RvH1	54	55 50	14.8	12.8	3.9	3.8
RvH2	53	57 59	15.3	4.4	4.4	3.6
RvH1-a	49	51 49		4.19	7.4	3.2
KLH	63	67	24.36	~8%	6.2	
KLH1	53	56	16.80		4.2	
KLH2	51	52	18.90		5.4	
KLH-c	46	45		0.0		

Като съществен принос на проведените изследвания е предсказаното влияние на въглехидратните структури върху конформационната стабилност на хемоцианини от вид *Mollusca* след:

а) проследяване на поведението на нативната молекула на RvH и субединиците ѝ в много широк температурен диапазон и при различни рН стойности на средата;

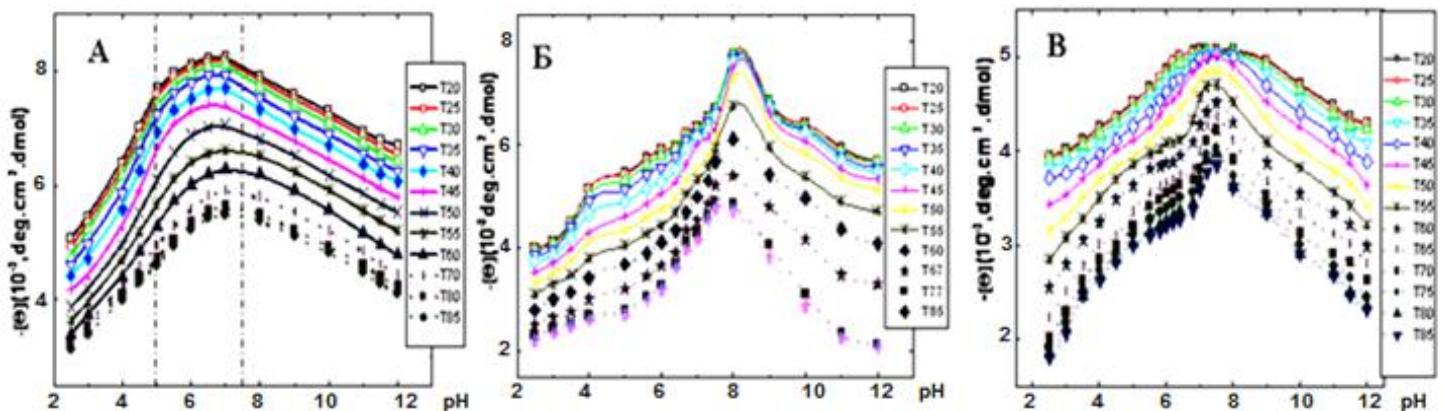
б) определяне на зоните и условията на обратимост и необратимост на процесите в гликопротеините при промяна на температурата и рН на средата.

## Температурна и pH стабилност на RvH и изоформите RvH1 и RvH2 – «pH-T фазови диаграми»

Представените на фигура 71 T-индуцирани промени очертават широк температурен интервал (20-85°C) в представената температура стабилност на RvH, RvH1 и RvH2, изразен с плавно намаляване на амплитудата ( $\Delta[\theta]_N - \Delta[\theta]_D$ ) на кривите при различни pH-стойности. "Крайните състояния" на промените се достигат след повишаване на температурата, където настъпва необратим процес и за трите протеина (Dolashki et al., 2008).

Интересно поведение демонстрира интактната RvH, като отсъствието на T-зависимо разгъване при  $T > 80^\circ\text{C}$  отразява запазване на «глобуларното състояние» на протеина. Наблюдаваните промени на  $[\theta]_{222}$  при стандартни условия определят RvH2 като по-стабилна на температурна денатурация в сравнение с RvH1 (Dolashki et al., 2008).

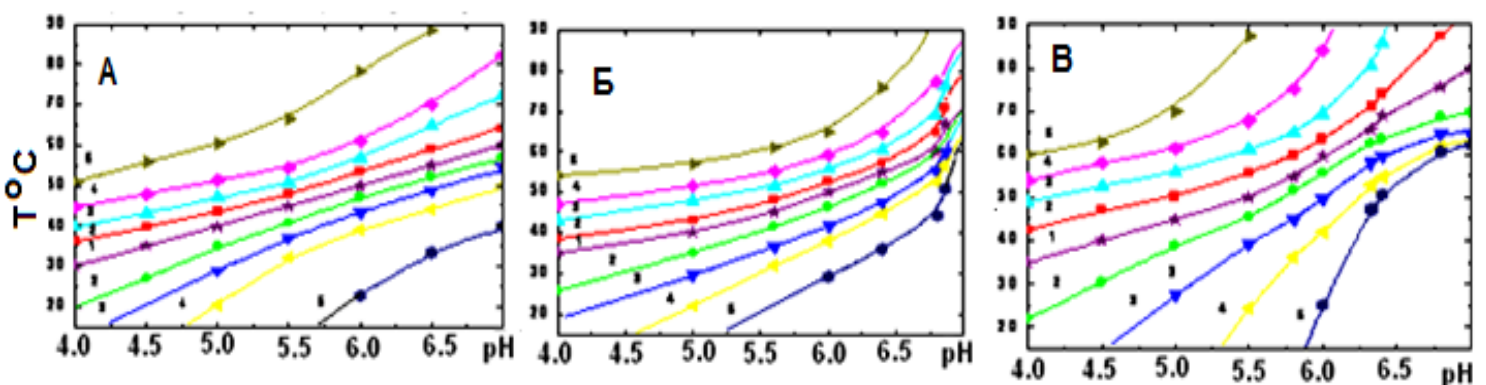
Представените зависимости на  $[\theta]_{222}$  (pH) на средата предоставят информация за различното поведение на RvH и субединиците RvH1 и RvH2. Те определят pH областта на алкална денатурация (pH<sub>d,b</sub>) на RvH2 в интервал от pH10 до pH12, както и различното поведение при кисела денатурация (pH<sub>d,a</sub>) в област от pH 2 до pH 4, от това на RvH1, което настъпва при pH 3.6 и  $T=25^\circ\text{C}$ . Нарастване на  $[\theta]_{222}$  в нативно състояние (при pH 5.3 и 7.0) може да е в резултат на протонния дефицит, като в тази област протича йонизация на карбоксилните и имидазолови групи. Зависимостите оформят два процеса на йонизация ( $pK_{a,L}$  7.8 и  $pK_{a,R}$  8.7) в pH интервал от 7.5 до pH 9.0, с противоположно влияние върху  $[\theta]_{222}$  (Фиг. 71Б,В).



**Фиг. 71** Влияние на pH (2-12) при различни температури (20-85°C) върху конформационната стабилност на: **А)** totalната молекула на RvH; **Б)** субединица RvH1 и **В)** субединица RvH2.

### Зони на обратимост на RvH, RvH1 и RvH2 – pH-T – "Фазови диаграми"

Едни от най-важните характеристики на промените в RvH, RvH1 и RvH2 са областите на обратимост, които са изразени чрез "фазови диаграми", построени след анализ на комбинираното влияние на температура и pH-средата върху  $[\theta]_{222}$  (Фиг.71).

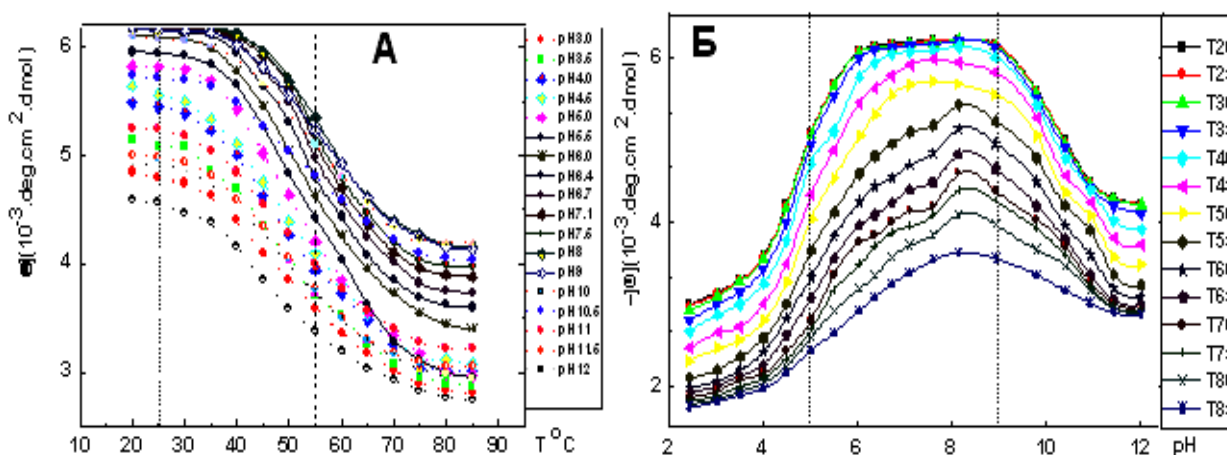


**Фиг. 72.** T-pH «Фазови диаграми»: **А)** RvH субединици **Б)** RvH1 и **В)** RvH2

Линии, които свързват T-pH точки с еднаква обратимост, са представени в % и изразяват зоните на обратимост за RvH, RvH1 и RvH2, чрез линия 1-100%, линия 2- 96%, линия 3-92%, линия 4- 88% и линия 5-80% (Фиг.72). Кривите очертават най-малкия интервал на частична обратимост на RvH (pH 4) и голямо смущение около pH 7 свързано с топлинната и pH-денатурация, придружени от дисоцииране на молекула на RvH до субединици (Фиг. 72A). Установената по-висока обратимост представя стабилните изоформи RvH1 (pH 4.1-4.7) и RvH2 (pH 4.2-5.3) в слабо кисела среда (T=25°C), като обратимостта на денатурация нараства с повишаване на T до 35-45°C и pH 4-6 (Фиг. 72,Б,В). Различното поведение на RvH2 при pH7 и T>50-60°C на по-висока степен на обратимост от RvH1, предоставя важни изводи за организацията и стабилността на RvH, RvH1 и RvH2.

### ***pH и температурна стабилност на функционалната единица RvH2-e - T-pH "Фазова диаграма"***

Прилагането на същия подход и построените зависимости на  $[\theta]_{222}/\text{pH}$  и  $[\theta]_{222}/T$  позволяват определяне на pH и топлинната стабилност на ФЕ RvH2-e. Графичните зависимости доказват сходни температурни промени на ФЕ RvH2-e и на RvH, RvH1 и RvH2, при фиксирани pH-стойности. Зависимостта на настъпилите промени на  $[\theta]_{222}/T$  отчита T-индуцирани промени в широк температурен интервал (20-85°C) и отсъствие на T-зависимо разгъване на протеина при T>80°C. Константите малки промени на  $[\theta]_{222}$  показват, че RvH2-e запазва "глобулното си състояние" при високи температури и при неутрално pH (Фиг. 73A).

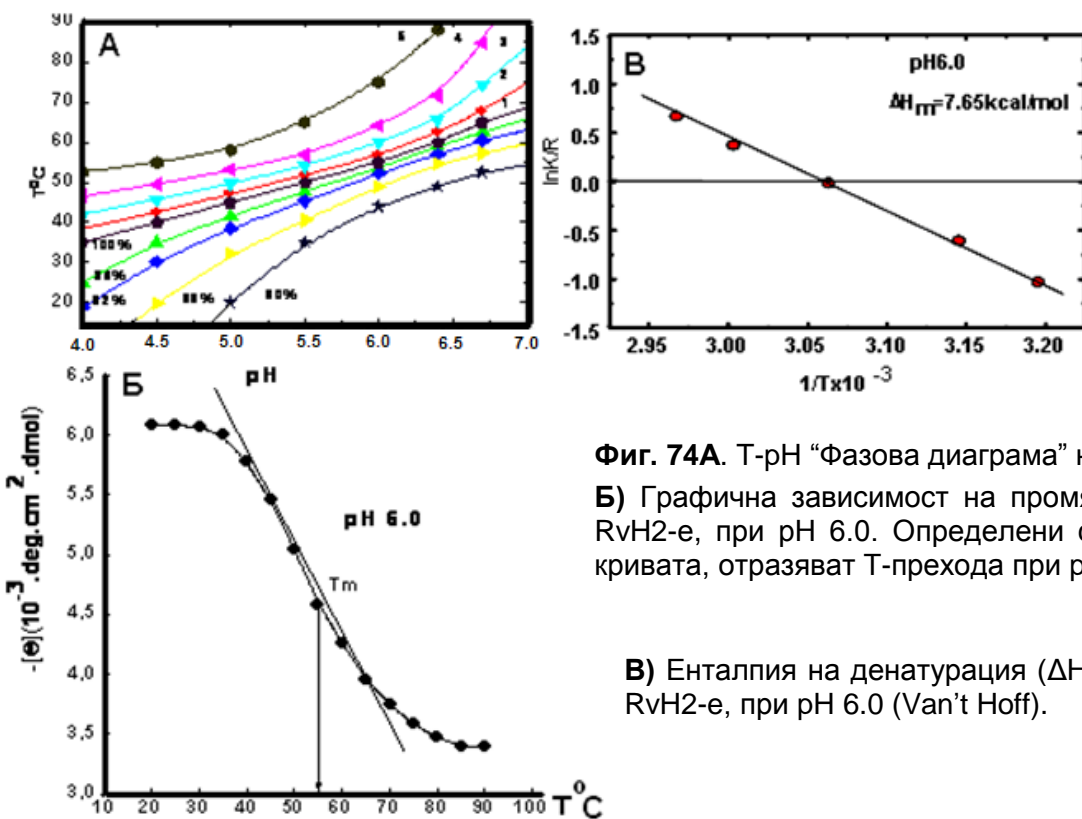


**Фиг. 73.** КД анализ на стабилността на RvH2-e. **А)** Зависимост на RvH2-e  $[\theta]_{222}(T)$  при фиксирани pH-стойности; **Б)** Зависимост на RvH2-e  $[\theta]_{222}(\text{pH})$  при фиксирани температури.

Подобно поведението в алкалната област (pH 8-12), с малките промени на кривите  $[\theta]_{222}(\text{pH})$  за RvH2-e и RvH, потвърждава алкалната денатурация, като необратим процес (Фиг. 73Б) (Velkova et al., 2009a; 2010b).

Установената разлика в поведението между ФЕ RvH2-e и дидекамерните форми на RvH, RvH1 и RvH2 е изразена в pH-преходите на графичната зависимост  $[\theta]_{222}(\text{pH})$ , която очертава по-широко оформено плато за RvH2-e в температурния интервал между 20-40°C и pH-областта 6.5 - 8.5 (Фиг. 73Б) в сравнение с RvH, RvH1 и RvH2.

Констатираната широка област на обратимост за RvH2-e в T-pH «фазова диаграма» (100-80%) обхваща pH интервала 5.5-7.0 (Фиг.74A), което позволява изчисляване на термодинамичните параметри  $\Delta G$ ,  $\Delta H_m$ ,  $\Delta H_o$ ,  $\Delta S_o$  за RvH2-e в тази област. От изчислените  $T_m$  стойностите от представената крива T/ $[\theta]_{222}$  (Фиг.74Б), за всяко pH от равновесния интервал е определена  $T_m = 56^\circ\text{C}$  при pH 6.0 (Velkova et al., 2010b).



**Фиг. 74А.** Т-рН “Фазова диаграма” на ФЕ RvH2-е.

**Б)** Графична зависимост на промяната на  $[\theta]_{222}/T$  за RvH2-е, при рН 6.0. Определени стойности на  $T_m$  от кривата, отразяват Т-прехода при рН6.0.

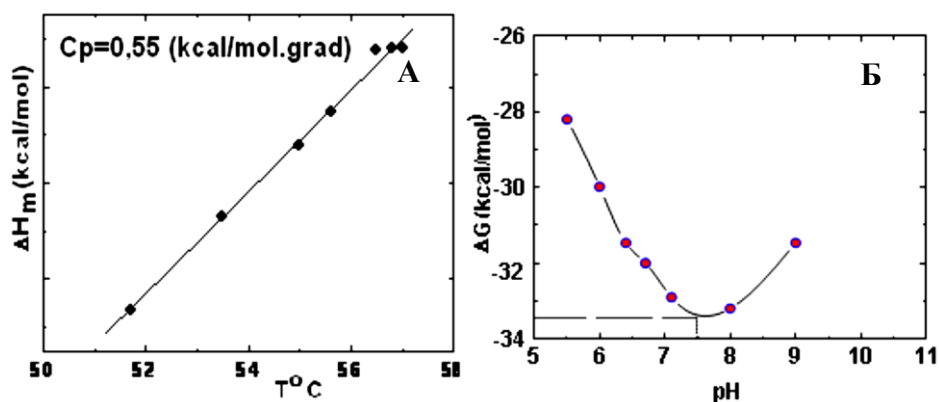
**В)** Енталпия на денатурация ( $\Delta H_m$ ) на RvH2-е, при рН 6.0 (Van't Hoff).

Друг термодинамичен параметър, изчислен от наклона на построената права на Van't Hoff  $\partial(\ln K/R)$  към  $\partial(1/T)$  в този интервал, е ефективната енталпия на денатурация  $\Delta H_{VH}$  за всяко рН и енталпията на денатурация  $\Delta H_m = 7.65 \text{ kcal/mol}$  при рН 6 (Фиг.74В). Така представените резултати очертават по-широка област на обратимост (до рН 9.0) на RvH2-е от определената област от Т-рН фазовата диаграма (рН 5.5-7.0) (Фиг. 74А).

Друг важен термодинамичен параметър е средният топлинен капацитет ( $C_p = 0.55 \text{ kcal/mol.grad}$ ), който е представен от графичната зависимост за RvH2-е, в равновесния интервал рН 5,5-9,0 (фиг.75А). Доказателство за пълна обратимост на процеса на денатурация на RvH2-е в този интервал са разположените на една права експериментални стойности за енталпията на денатурация  $\Delta H_m$  ( $\Delta H_{VH}$ ), като наклонът на правата определя ефективния температурен капацитет при постоянно налягане ( $\Delta C_p = \partial \Delta H_{VH} / \partial T$ ) (Фиг.75А)

От термодинамичните параметри, за всяко рН от интервала на обратимост (рН 5,5-9,0) на RvH2-е, е построена рН-зависима крива на свободната енергия на Гибс ( $\Delta G_o$ ), със сложна форма и изразен екстремум при рН 7.5 ( $T = 25^\circ\text{C}$ ), която определя общата стабилност  $\Delta G_{o\text{exp}} = 33,4 \text{ kcal/mol}$  на ФЕ RvH2-е (Фиг.75Б). В потвърждение на стабилността на RvH2-е, в условия на доказана обратимост, са представените термодинамични параметри  $T_m$ ,  $\Delta H_m$ ,  $\Delta G_o$  и изчислените стойности на  $\Delta S_m$ , и промяната на  $\Delta C_p$  в областта на равновесие при  $T = 25^\circ\text{C}$  ( $\Delta H_o$  и  $\Delta S_o$ ) (Табл. 17) (Velkova et al., 2010b).

Друг важен фактор, който може да влияе върху стабилността на хемоцианините от вид *Mollusca*, са образуваните дисулфидни връзки.



**Фиг. 75А).** Графична зависимост на  $\Delta H_m$  на RvH2-е от температурата.

$C_p$  на процеса на денатурация за равновесния интервал рН 5.5-9.0

**Б).** Крива на  $\Delta G_o$ , изчислена за рН-интервала 5.5-9.0.



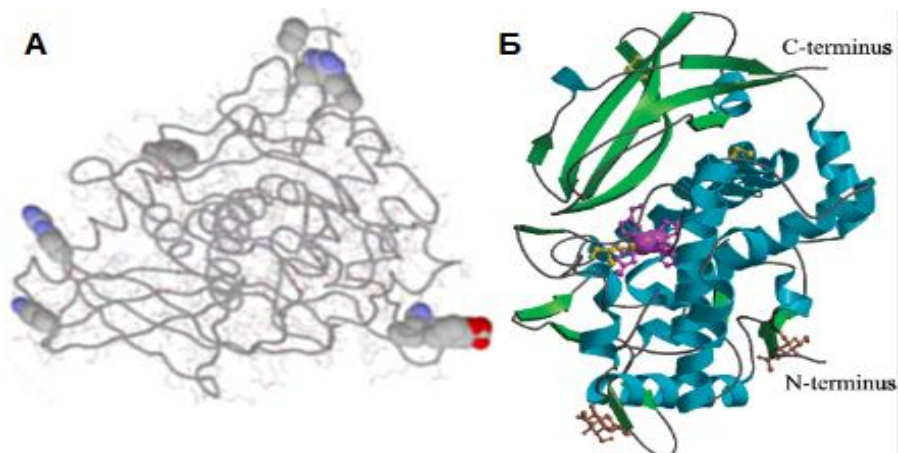
От определената първична структура на H1H и разположението на дисулфидните връзки се предполага, че ролята им е да стабилизират централния домен на молекулата, което се потвърждава след редуциране на дисулфидните връзки на H1H, при което се наблюдава промяна на функцията на хемоцианина и загуба на способността да свързва молекула кислород.

pH	Tm (K)	Tm (°C)	$\Delta H_m$ (kcal/mol)	$\Delta H_o$ (kcal/mol)	$\Delta G_o$ (kcal/mol)
5,5	324,7	51,7	6,68	-8 006	-28 199
6,0	326,5	53,5	7,65	-8 030	-29 979
6,4	328,0	55,0	8,39	-8 111	-31 460
6,7	328,6	55,6	8,74	-8 031	-31 994
7,1	329,5	56,5	9,38	-7 950	-32 901
7,5	330,0	57,0	9,40	-8 196	-33 406
8,0	329,8	56,8	9,40	-7 925	-33 194
9,0	328,0	55,0	8,38	-8 119	-31 460

**Табл. 17.** Термодинамични параметри Tm,  $\Delta H_m$  и  $\Delta G_o$ , изчислени от графичната зависимост в зоната на обратимост на RvH2-e:

Третият дисулфиден мост, разположен в областта на  $\beta_c$ -сандвич домена между Cys313 и Cys319 остатъци (OdH-g), не е открит при ФЕ-b от другите хемоцианини от вид *Mollusca*. Това се потвърждава от определената АКП на H1H, като в областта за ФЕ-b не се наблюдава дисулфиден мост. Също отсъствие на дисулфиден мост е констатирано и при ФЕ-h от  $\beta_c$ -H1H и  $\alpha_D$ -H1H, което съответства на публикуваните данни за ФЕ-h от субединица HtH1 на хемоцианин от *H. tuberculata*.

**Фиг. 76.А)** Коригиран 3-Д модел на RvH2-e след добавяне на 9 АКО  
**Б)** 3.38 Å кристалографска структура на RvH2-e.



Представен е много важен резултат с направената корекция на кристалографския модел на RvH2-e, с резолюция 3.30Å, което допълва характеристиката за хемоцианините и позволява по-прецизно обяснение на термодинамичните им свойства. Попълненият модел с Ala остатъка на 9 позиции в предложения PDB file 1LNL, дава възможност за по-прецизен електростатичен анализ на RvH2-e и потвърждава разположението на въглехидратните вериги на повърхността на молекулата (Фиг.76) (Velkova et al., 2009a).

#### IV.5.4. ФЕНОЛОКСИДАЗНА АКТИВНОСТ НА ХЕМОЦИАНИНИ ОТ ОХЛЮВИ *R. venosa* и *H. vulgaris* (*H. lucorum*)

В дисертационния труд е представена и друга важна характеристика на H1H, RvH и изоформите им, като ензимната активност, която проявяват, в сравняване с данни за други хемоцианини и тирозинази (Hristova et al., 2001; Dolashki et al. 2011) (Табл. 18). Афинитетът на изследваните форми спрямо различни субстрати е изразен чрез константата  $K_M$  (mM), а ензимната активност и ензимна ефективност са представени от  $k_{cat}/K_M$  (mM<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>).

**Табл. 18.** Кинетични параметри на ОДФОА на нативни форми, изоформи и SDS-активирани форми (означени с **A**) на хемоцианини, сравнени с ОДФОА на тирозинази.

Хемоцианини	Субстрати							
	Допамин				L-Доба			
	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mM.min <sup>-1</sup> )	$K_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$K_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mM.min <sup>-1</sup> )	$K_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$K_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
<i>R. venosa</i>	28.57	0.08	2.66	0.093				
RvH1-a	0.02	0.01	1.12		0.01	0.01	1.1	11
ARvH1-a	6.53	0.011	48.5	7.42	2.0	0.01	205.2	102.1
<i>H. lucorum</i> <sup>a</sup>	2.86	0.137	4.48	1.57	0.77	0.018	1.8	2.32
<i>AH. aspersa</i> max. <sup>x</sup>	0.53	-	31.95	60.28	15.26	-	9.58	0.62
<i>H. pomatia</i> <sup>b</sup>	3.1	0.01	0.21	0.068				
<i>C. aestuarii</i> <sup>e</sup>	142	0.023	1.7	0.012				
<i>C. magister</i>	0.02	0.16			1.70	0.236		
CpH <sup>e</sup>	0.01	0,00944	0.71	70.8	2.14	0,0089	0.67	0.31
ACpH <sup>e</sup>	0.03	0.027	2.04	68.0	3.44	0.0244	1.83	0.53
<b>Тирозинази от:</b>								
<i>L. sacchari</i>	0.5		11.5	23	7.5		1177.5	157
<i>I. argentinus</i> ST94 <sup>f</sup>	9.3 <sup>g</sup>		2000	215				
<i>Ipomoea batatas</i> <sup>A</sup>	2.5 <sup>A</sup>		138.0	55.0	7,8		1263	157

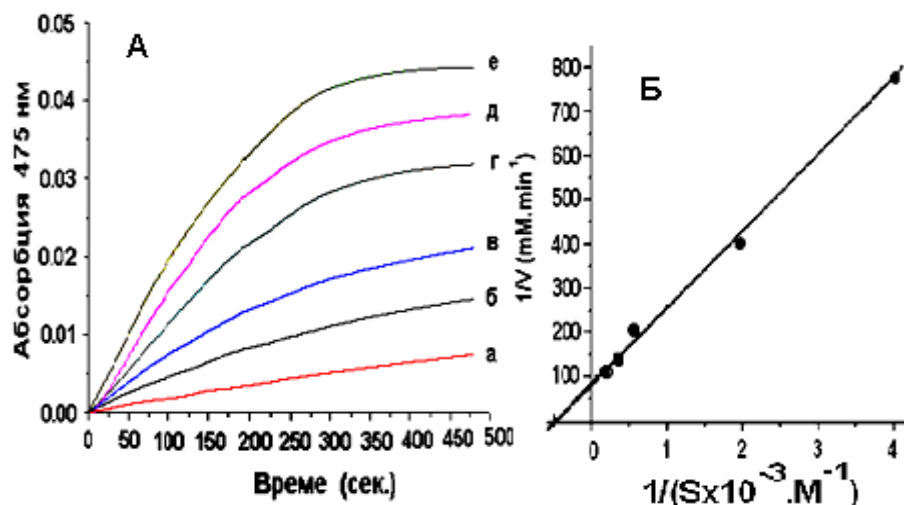
Проведените кинетични анализи на ОДФОА представят различно сродство за хемоцианините от *R. venosa* и *H. vulgaris* (преименуван в НН) към двата субстрата, о-дифенол и L-Дора. Докато изчислената константа на Михаелис-Ментен за RvH е  $K_m=28.57$  mM, то интерес заслужава димерната форма на НН, която проявява висока активност към о-дифенол ( $K_m=2.86$  mM и  $k_{cat}=4.48$ ) и L-Дора ( $K_M = 0.77$  mM,  $k_{cat} = 1.8$  min<sup>-1</sup>), което предполага по-добър достъп и на двата субстрата до активния център. Проследяването на резултатите показва по-силно изразен афинитет и ОДФОА за НН ( $k_{cat}/K_m=1.57$  mM<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>) в сравнение с тези на *R. venosa*, *O. vulgaris*, *H. pomatia* и *S. officinalis* ( $k_{cat}/K_m = 0.093$ ; 0,28; 0.068 и 0.26, съответно) (Hristova et al., 2008).

Проведените изследвания също представят интересно поведение на ФЕ RvH1-a, със сложна въглехидратна структура - 4,19% от Мм на протеина. Кинетичната реакция отчита много слаба активност на ФЕ RvH1-a със субстрат допамин, като при 10 mM допамин реакционната скорост нараства до 0.7 nM/min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> (Dolashki et al. 2011). За проследяване на ОДФОА и влиянието на въглехидратните структури са използвани два познати подход за превръщане на хемоцианините в ензими.

Приложените два подхода се оказаха подходящи за превръщане на RvH1-a в активирани форма (ARvH1-a) и за проследяване на ОДФОА на двете получени форми след:

- 1) Активиране на ФЕ чрез неензимно третиране: след промяна на рН на средата и в присъствие на денатуриращи реагенти, като SDS;
- 2) Активиране на ФЕ след ензимно третиране с трипсин.

Ефективността на тези подходи е доказана след проследяване на ОДФОА на нативната (RvH1-a) и активирани-ФЕ (ARvH1-a), които проявяват различно сродство към двата субстрата, L-Дора и допамин. Интересно поведение е установено за RvH1-a след третиране с трипсин (E/C=1/500) в 50 mM Tris/HCl буфер, рН 8.2 и T=25<sup>0</sup>C, където ФЕ повишава ОДФОА, като при концентрация на субстрата L-Дора от 5 mM абсорбция при 475 nm достига максимална стойност, в резултат на образувания допахром ( $\epsilon_{475}=3600$  M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>). Разликата в поведението на нативната RvH1-a е изразена с високо сродство към субстрата L-Дора и по-слабо към допамина, в сравнение с активирани-ФЕ ARvH1-a.



**Фиг. 77. А).** ОДФОА на ARvH1-a в 20 mM фосфатен буфер, pH 6.8, 25°C, със субстрат *L*-Допа: (а) 0.25 mM, (б) 0.5 mM (в) 2 M (г) 5 M (д) 7 M, (е) 10 M.

**Б).** Права на Lineweaver–Burk при различни концентрации на субстрата *L*-Допа, проследена при 475 nm.

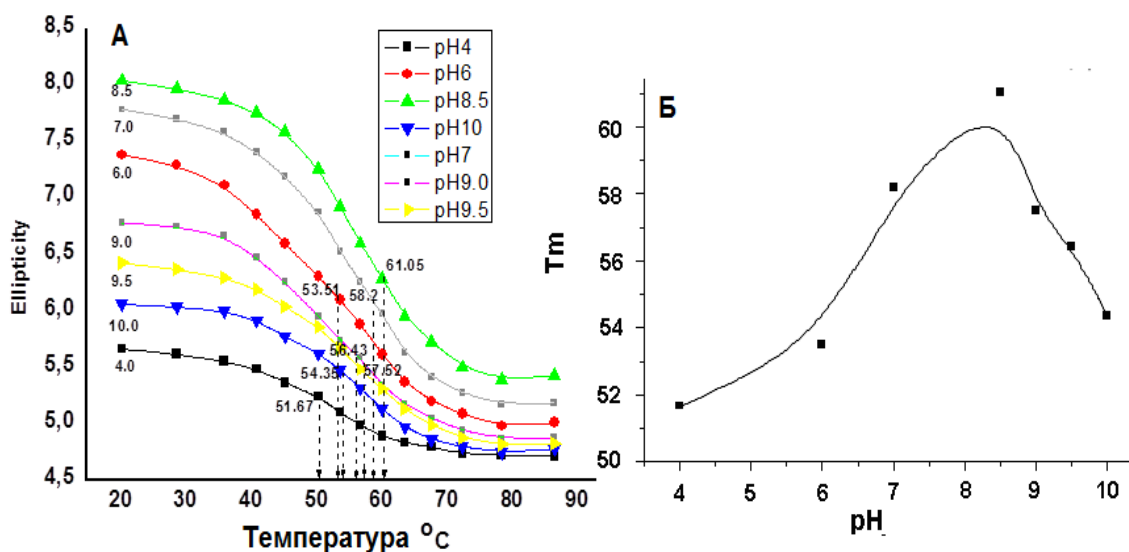
Индуцирана специфичност към двата субстрата (5 mM *L*-Допа и 20 mM допамин) е отчетена също след инкубиране на RvH1-a в буфери с различно pH, като тя е по-ниска от специфичността на активираната с SDS и трипсин ФЕ (Dolashki et al., 2011). Като важна характеристика трябва да се отбележи определената значително по-високо индуцирана ОДФОА на RvH1-a след третиране на гликопротеина с SDS, което е свързано с промяна на концентрацията на SDS (4.0-3.3 mM) (Табл. 18).

Обяснението за наблюдавания ефект на SDS при концентрация >1mM, в 100 mM натриево-фосфатен буфер и pH 7.5 се предполага настъпилото по-голямо разгъване на полипептидната верига на RvH1-a при по-високи концентрации на SDS, което може да доведе до пълно разгъване на молекулата. Механизмът на активиране на RvH1-a е свързан с индуцирани оптимални конформационни преходи, в резултат на които се отваря каналът, който осигурява достъп на фенолните субстрати до активния център. Афинитетът спрямо различни субстрати, както и ензимната активност и ензимна ефективност, са представени за нативните и SDS-активирани форми.

Най-висока ОДФОА към субстратите допамин ( $K_M = 6.53$  mM,  $k_{cat}/K_M = 1.29$ ) и *L*-Допа ( $K_M = 2.0$  mM,  $k_{cat}/K_M = 2.1$ ) е представена след активиране на RvH1-a за 2-3 min с 3.0 mM SDS (Фиг. 77). Сравнителните анализи показват сходство на кинетичните параметри за ОДФОА на RvH1-a и ARvH1-a с публикуваните данни за други медни протеини. Изчислената стойност за  $K_M$ , която отразява сродството между RvH1-a и субстрата допамин ( $K_M = 0.02$  mM), е по-ниска от публикуваните стойности за хемоцианин HpH ( $K_M = 3.1$  mM), HvH ( $K_M = 2.86$ ) и тирозиназа от *Illex argentinus* (ST94) ( $K_M = 9.3$  mM).

Определените по-високи кинетични параметри също представляват важна информация за ARvH1-a ( $k_{cat} = 8.48$ ), в сравнение с публикуваните стойности за *H. pomatia* Hc ( $k_{cat} = 0.21$ ) и *H. vulgaris* Hc ( $k_{cat} = 4.48$ ). Те са много по-ниски от стойности за хемоцианин от *S. aestuarii* (вид *Arthropoda*) и за тирозиназа от *S. albus* (Табл. 18) (Dolashki et al., 2011).

Друг ефективен субстрат е катехол, който предизвиква по-високата ОДФОА на хемоцианина от *H. vulgaris* ( $k_{cat} = 4.48$  min<sup>-1</sup>). Обяснение на констатираната по-висока ензимна ефективност на хемоцианините към субстрат катехол е отсъствието на полярни функционални групи в структурата на субстрата. Важна характеристика за субстрата е, че той е най-малкият дифенол, което го прави по-достъпен до активния център на хемоцианина, в сравнение със субстратите допамин и *L*-Допа, които притежават заредени полярни функционални групи. Тези групи затрудняват придвижването им до напълно „погребания“ активен център на ФЕ, както е показано от кристалографската структура на ФЕ RtH2-e (Фиг. 76) (Hristova et al., 2008).



**Фиг. 78А)** Фазова диаграма  $T_d(\Delta G)$ -pH на pH/ $T_m$  зависи-мост за SDS-активираната ФЕ RvH1-a; **Б)** Сигмоïдални криви на  $[\theta]_{222}(T)$  зависимост на ARvH1-a при различни стойности на pH.

Влиянието на ензимното активиране върху стабилността на нативната форма на RvH1-a и активираната форма ARvH1-a е представено от сравнителния КД анализ на термичната стабилност на RvH1-a и ARvH1-a, който отчита по-високи стойности на средните температури на термично денатуриране за ARvH1-a в сравнение с RvH1-a ( $T_m = 51^\circ\text{C}$ ).

Също е установено, че стойностите за ARvH1-a в киселата pH област ( $T_m = 51,6^\circ\text{C} - 58,2^\circ\text{C}$ ) се различават от изчислените стойности в алкалната област ( $T_m = 54,3^\circ\text{C} - 61,0^\circ\text{C}$ ) (Фиг. 78А) (Dolashki et al., 2011). Потвърждение на стабилността на ARvH1-a са данните от „фазовата диаграма”, които отразяват зависимост на  $T_m$ /pH в pH интервала от (4.0 – 10) (Фиг. 78Б). Получените резултати показват, че процесът на разгъване на протеина в двете области е причинен от Td, а пълна денатурация настъпва при pH 4 и pH 10,  $T = 25^\circ\text{C}$  (Dolashki et al., 2011).

Обобщените резултати от тези експерименти представят специфична характеристика на хемоцианините, които въпреки че не са класифицирани като ензими, проявяват ОДФОА. Реакциите на окисление на фенолните съединения от хемоцианините протичат по общ механизъм, който в литературата е представен за тирозинази, катехол оксидази и лакази, със съпътстваща редукция на молекула  $\text{O}_2$  до  $\text{H}_2\text{O}$ .

Протеините проявяват съществено различие в субстратната им специфичност, като е установено наличие на много слаба или отсъствие на ОДФОА за тоталната молекула, структурните субединици и ФЕ-ци на RvH към субстрати L-Допа и допамин.

Доказана е промяна в субстратната специфичност на RvH1-a след прилагане на методите на ензимно активиране.

## **ГЛАВА IV.6. УЧАСТИЕТО НА ГЛИКАНИТЕ В ТЕРАПЕВТИЧНИЯ ЕФЕКТ НА Cu/Zn-СОД И ХЕМОЦИАНИНИ**

Клиничните изследвания в последните години доказват сериозни нарушения в оксидант/антиоксидантния баланс в процеса на онкогенезата. Това се свързва с пониженото ниво на антиоксидантната защита при хора и животни с различни видове туморни образувания. Антиоксидантната защита обосновава една нова концепция в превенцията и лечението на туморни заболявания, в която важно участие имат антиоксидантите.

### **IV.6.1. Участие на гликаните в терапевтичния ефект на Cu/Zn-СОД от *H. lutea* 103**

Участието на изолираните и характеризирани нови супероксид дисмутази е проследено след анализ на чистия ензим Cu/Zn-НСОД 103 върху хамстери с трансплантиран миелоиден тумор на Graffi (ЗТХ) и антивирусен ефект върху мишки с грипен вирус A/Aichi (H3N2).

#### **Антитуморен ефект на Cu/Zn-СОД от *H. lutea* 103 (Cu/Zn-НСОД)**

Проведените изследвания за проследяване на антитуморния ефект на СОД-зи върху тумор на Graffi показват, че инжектирането на Cu/Zn-НСОД 103 затруднява трансплантируемостта на тумора в хамстери. Протективният ефект, който ензимът оказва върху хамстерите с трансплантиран миелоиден тумор на Graffi (ЗТХ), е доказан чрез два подхода. Те включват сравнителен анализ на определените средни стойности на латентното време на поява на тумора и средно време на преживяемост на третираните с ензима ЗТХ, с нетретираните хамстери (Angelova et al., 2001).

Обобщените резултати в тази серия експерименти демонстрират инхибиращ ефект на получения нов продукт Cu/Zn-СОД от гъбичен щам *H. lutea* 103 и възможност за успешното му приложение в антитуморната терапия срещу появата и развитието на тумора на Graffi. Той може да бъде използван като допълнително средство за минимизиране на неблагоприятните странични ефекти на конвенционалните антитуморни препарати, които предизвикват генериране на свободни окси-радикали. Констатираният протективен ефект на ензима Cu/Zn-НСОД 103 потвърждава предимствата на антиоксидантите при лечението на туморните заболявания.

Представените данни потвърждават изказаното предположение за възможността на СОД да обезврежда супероксидните радикали, концентрацията на които се повишава в тъканите с развитието на туморните клетки. Това е потвърждение на публикуваната и от други автори информация за ефекта на някои антиоксиданти върху туморния растеж *in vivo* и *in vitro* чрез обезвреждане на  $\cdot\text{O}_2^-$  радикали.

#### **Антивирусен ефект на Cu/Zn-СОД, изолирана от гъбичен щам *H. lutea* 103**

Проведените изследвания представят и друга важна информация за Cu/Zn-НСОД 103, като ефективността на ензима при заразяване на мишки с грипен вирус A/Aichi (H3N2), който причинява инфекциозно заболяване и смърт. Най-силно изразен антивирусен ефект е доказан след 4-кратно дневно венозно третиране на опитните животни с 500 ед, като при инжектиране след 4-7 дни след вирусната инфекция, ефектът на Cu/Zn-НСОД се повишава и преживяемостта на заразените с вируса мишки нараства от 86% до 100%.

В обобщение на представените резултатите може да се каже, че полученият нов, природно гликозилиран антиоксидантен ензим Cu/Zn-СОД от гъбичен щам *H. lutea* 103 притежава инхибиращ ефект срещу експериментална грипна инфекция, причинена от грипен вирус A/Aichi

(H3N2) и антитуморен ефект срещу миелоиден тумор на Graffi. Влияние върху този ефект вероятно оказва и гликозидния характер на ензима Cu/Zn-НСОД, като удължава времето на полуживот на ензима в организма (Angelova et al., 2001).

#### **IV.6.2. УЧАСТИЕТО НА ГЛИКАНИТЕ В ТЕРАПЕВТИЧНИЯ ЕФЕКТ НА ИЗОЛИРАНИТЕ ХЕМОЦИАНИНИ**

Ефектът от прилагане на хемоцианини в медицината и фармацевтичната индустрия са известни от години, като голяма значимост се отдава на различните аспекти на структурно-функционалните им особености. Това ги прави подходящи за изследване на процеси, свързани със структурата и функцията на гликопротеините.

##### **IV.6.2.1. Хемоцианини от вид *Mollusca*, като носители на хаптени**

Едни от най-важните публикувани приложения за хемоцианините са свързани с функцията им като имуностимулатори и молекули-носители на хаптени. На база на тези изследвания са създадени антивирусни, антибактериални или антитуморни ваксини, преминали клинични изпитания. Проследяването на хаптен-специфичната продукция на интерферон-гама (IFN- $\gamma$ ) в експериментални животни, инжектирани с пречистените хемоцианини ННН и RvH, както и говежди серумен албумин и KLH, потвърждават възможността хемоцианините да функционират като носители на неимуногенни молекули. Проведените сравнителни анализи определят като най-подходящ адювант хемоцианинът от *H. lucorum* (Dolashka-Angelova et al., 2008).

##### **IV.6.2.2. Антитуморен ефект на хемоцианини от вид *Mollusca***

###### **Ефект на хемоцианини върху имунотерапия и имунопрофилактика на тумор на Graffi и асцитен тумор на Guerin**

Един от здравните проблеми в световен мащаб е свързан с туморните заболявания и като потенциално противодействие се смятат имунотерапията и имунопрофилактиката. Доказано е, че мултифункционалните гликозилирани хемоцианини оказват многостранно въздействие върху имунната система. В тази насока са проследени имунологичните свойства и ефекта на хемоцианини от вид *Mollusca*, като RvH, ННН, KLH и изоформите им върху трансплантиран миелоиден тумор на Graffi в хамстери и асцитен тумор на Guerin в плъхове (Dolashka et al., 2011a).

Получените данни представляват нова информация за имуногенните свойства на гликопротеините от *H. lucorum* и *R. venosa*, които стимулират паралелно клетъчния и хуморалния имунитет и са подходящи за използване като молекулни носители и адюванти при профилактични и терапевтични имунологични препарати. Като важна характеристика за тези два хемоцианина е високата ефективност, която проявяват при имунотерапия на асцитен тумор на Guerin. Те обаче не оказват инхибиращ ефект при третиране на животни със солиден миелоиден тумор на Graffi.

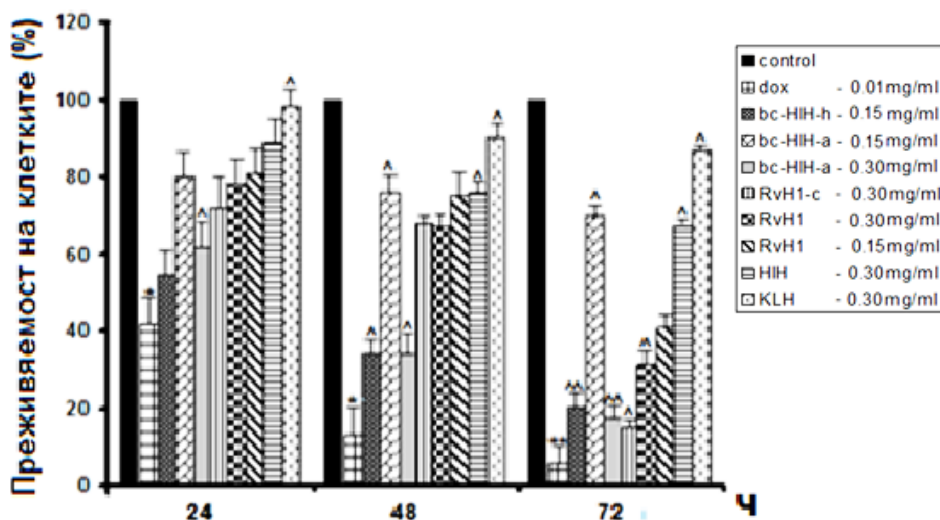
###### ***Ефект на хемоцианините при терапия на тумор на пикочния мехур***

Научният интерес към антитуморния ефект на хемоцианини срещу рак на пикочния мехур се повишава поради констатираното нарастване на заболяемостта. Потвърждение на антитуморния ефект на хемоцианините срещу различни злокачествени образувания на пикочния мехур е получено от проведените изследвания на новите хемоцианини от хемолимфата на охлюви *R. venosa*, *H. lucorum* и *H. aspersa*. След проследяване на

терапевтичния ефект на НН, НnH и RvH върху 647-V, CAL-29 и T-24 туморни клетъчни линии, в сравнение с ефекта на доказаните активни химиотерапевтици Doxorubicin hydrochlorid (Dox), Mitomycin-C (MIT-C) и KLH при лечение на злокачествени заболявания на пикочния мехур, е допълнена информацията за значението на хемоцианините.

Представените резултати отчитат интересно поведение на двете субединици (RvH1 и RvH2) след 24 ч култивиране, които причиняват слаб инхибиращ ефект на клетъчния растеж на туморната клетъчна линия CAL-29. Интерес представлява инхибиращият ефект на ФЕ RvH1-с, който нараства с времето и след 72 ч третиране при изследваните дози надвишава ефекта на Dox. Получените данни предоставят нова информация, доказваща най-силен инхибиращ ефект на RvH1-с в сравнение с изследваните хемоцианини и изоформи им (Stenzl et al., 2016; Dolashki et al., 2018).

Сравнителният анализ показва, че клетъчната жизнеспособност на туморните клетки CAL-29 намалява след 72 ч инкубиране с 0.06  $\mu\text{M}$  НН (67%), с 0.33  $\mu\text{M}$  RvH1 (41%) и с 6,0  $\mu\text{M}$   $\beta\text{c-HIH-a}$  (17,47%). Резултатите доказват НН и RvH1, като по-ефективни инхибитори на туморните клетки CAL-29, в сравнение с KLH (87%) (Фиг. 79) (Dolashki et al., 2018). Те представят и друга важна информация за двете ФЕ-ци,  $\beta\text{c-HIH-h}$  и  $\beta\text{c-HIH-a}$ , които демонстрират по-силно изразен инхибиращ ефект в сравнение с НН и структурната субединица RvH1.



**Фиг. 79** Ефект на: 150  $\mu\text{g/ml}$  НН (0,03 $\mu\text{M}$ ), 150 и 300  $\mu\text{g/ml}$  RvH1 (0,33 $\mu\text{M}$  и 0,66 $\mu\text{M}$ ) и ФЕ-ци 150 $\mu\text{g/ml}$  от  $\beta\text{c-HIH-h}$  (3,0 $\mu\text{M}$ ); 150 и 300  $\mu\text{g/ml}$   $\beta\text{c-HIH-a}$  (3,0 $\mu\text{M}$  и 6,0  $\mu\text{M}$ ), 300 $\mu\text{g/ml}$  от RvH1-с (6,0 $\mu\text{M}$ ) и 150 $\mu\text{g/ml}$  KLH (6,0 $\mu\text{M}$ ), при 500 mg/ml върху CAL-29 след 24, 48 и 72 часа инкубация, \*  $P < 0,05$  и \*\*  $P < 0,01$  сравнен с отрицателна и контрола 0,1  $\mu\text{g/ml}$  (DOX 18,3  $\mu\text{M}$ ).

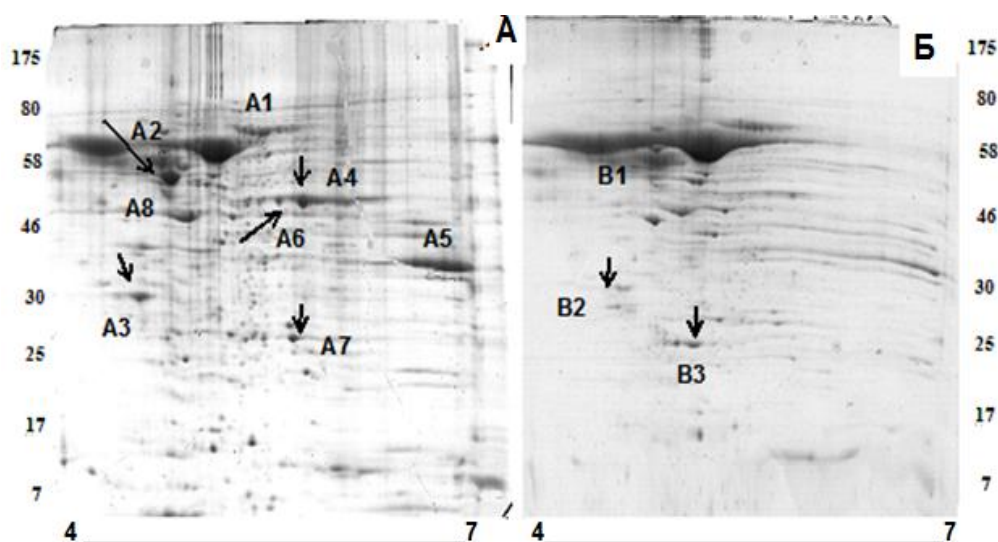
Разграничаване на настъпилите промени на туморните клетки CAL-29 е постигнато след установяване на апоптичните клетки със зелен филтър Анексин-V-FLUOS Kit и некротичните клетки чрез пропиониев йодид (PI) след 24 часова инкубиране в среда Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (контролни клетки), в присъствие на Doxorubicin hydrochlorid (Dox, 0.1 mg/ml) или на субединица RvH1 (1.5 mg/ml), или ФЕ RvH1-с (1.0 mg/ml) (Dolashki et al., 2018). Отчетените промени в морфологията на инкубираните туморни клетки CAL-29 с НН са свързани с появата предимно на апоптични и по-малко на некротични клетки. Проведеният анализ след инкубиране на туморни клетки CAL-29 с ФЕ  $\beta\text{c-HIH-h}$  показва преобладаващи флуоресциращи в зелено апоптични клетки, като впоследствие са отчетени и некротични клетки с ярки червени ядра. Тази ФЕ е добре изучена, като е доказана Мм 66347.7 Da и олигозахаридната ѝ структура. В резултат на проведените изследвания е изказано предположение за участието на глиганите в антитуморния ефект на  $\beta\text{c-HIH-h}$  (Dolashki et al., 2018). Подобни резултати са наблюдавани и след инкубиране на туморни клетки T-24 с RvH1 (Dolashka et al., 2015b).

На база на литературните данни за KLH, както и от получените резултати за антитуморния потенциал на RvH, НnH и НН, се предполага връзка между антитуморната активност и въглехидратните структури на изследваните хемоцианини. Добре обосновано потвърждение на изказаната хипотеза са представените резултати, изразяващи силно инхибиращ ефект на ФЕ

RvH1-c,  $\beta$ c-NIH-h и  $\beta$ c-NIH-a, който може да се дължи на по-достъпните олигозахаридни структури, изложени на повърхността на молекулата. Тези въглехидратни вериги взаимодействат със специфични региони от гликопротеините или чрез Ван дер Ваалсови взаимодействия с някои аминокиселинни остатъци на протеините от туморната клетка (Stenzel et al., 2016; Dolashki et al., 2018).

### Протеомен анализ на ефекта на третирана туморна клетъчна линия CAL-29 с НИН

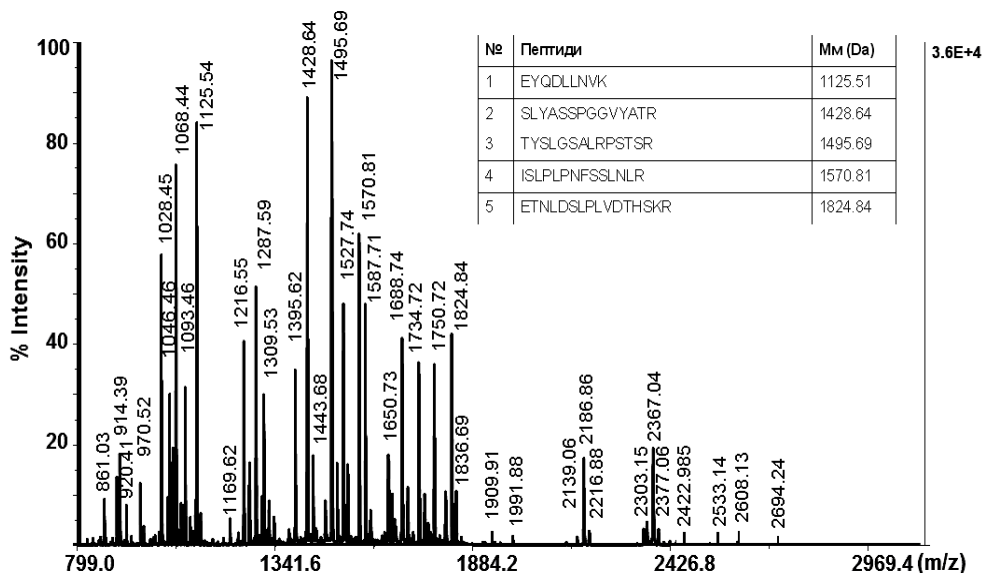
Представените резултати на фигура 80 отчитат намаляване до 67% на клетъчната жизнениост на човешки туморни клетки CAL-29 след 72 часа инкубиране с 300  $\mu$ g/ml (0,03  $\mu$ M) хемоцианин от *H. lucorum*. За изясняване на този механизъм много по-точна и прецизна информация предоставя протеомният анализ. Сравнителният анализ на отчетените чрез 2Д-ПАГЕ при рI 4–7 промени на експресиранияте протеини от туморна клетъчна линия CAL-29 преди третиране (Фиг. 80А) и след третиране с НИН (Фиг. 80Б) показва промяна в редица позиции, като А1, А2, А4, А5, А8, В2 и В3.



**Фиг. 80.** 2Д-ПАГЕ (рI 4–7) на продуцирани от CAL-29 туморни клетъчни протеини:

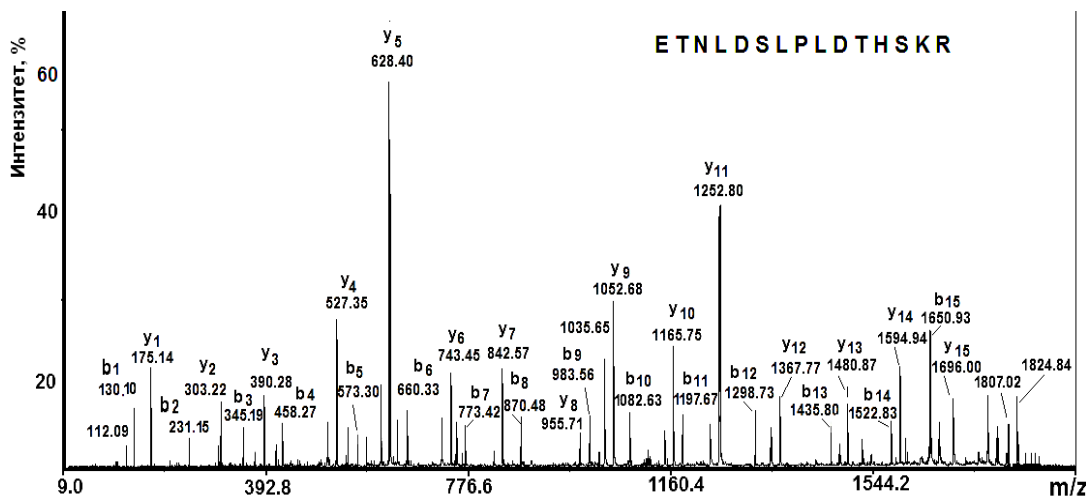
- А)** преди третиране;
- Б)** след третиране с НИН.

По-пълна информация за промяната в експресията на протеините е постигната след масспектрометричен анализ на някои от отчетените промени в 2Д-ПАГЕ. На фигура 81 е представен MS спектър, на който са показани получените пептиди след трипсинолиза на елуирания протеин на позиция А2 от 2Д-ПАГЕ. Интерпретирането на протеина е представено на база на резултатите от проведените MS/MS анализи и определените АКП на всеки пептид от MS спектъра (Фиг. 81).



**Фиг.81.** MS анализ на получените пептиди след трипсинолиза на позиция А2 от 2Д-ПАГЕ; (Таблица) Мм и АКП на пептидите определени от MS/MS анализа на протеин от позиция А8  
Протеин с Мм 53676 Da Vimentin (VIME\_HUMAN).





**Фиг. 82.** MS/MS на пептид с m/z 1824.84 [M+H]<sup>+</sup> от позиция A2, анализиран с MALDI-TOF/TOF.

Елуираният протеин на позиция A2 от 2Д-ПАГЕ е доказан чрез биоинформатичен подход и прилагане на програмите MASCOT, FASTS, NCBI/BLAST и др., като е доказано, че е хомоложен и съответства на протеин Vimentin (VIME\_HUMAN) с Мм 53676 Da.

Приложеният подход се оказва подходящ за анализ на АКП и на получените пептиди след трипсинолиза на избраните позиции A1, A2, A4, A5, A8, B2, B3 (Табл. 19). Обобщените резултати от протеомния анализ представят протеиновата карта на човешки туморни клетки CAL-29 преди и след третирането с НИН, с което се доказва, че хемоцианинът предизвиква промяна в експресията на редица протеини в CAL-29, представени в таблица 19. Тези протеини играят важна роля за наблюдавания антитуморен ефект на хемоцианина (Stenzel et al., 2018).

**Табл. 19.** Протеини със значителни промени в експресията на 2Д-ПАГЕ преди и след 48 часа третиране на CAL-29 клетки с НИН. Съответен номер от 2Д-ПАГЕ.

Номер	Протеини	UniProtKB	UniGene	Mass(kDa)
A1	Serum albumin (ALBU_HUMAN)	P02768	Hs.418167	69,367
A2	Vimentin [Homo sapiens (Human)] (VIME_HUMAN)	P08670	Hs.455493	53,6
A3	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial (ATPG_HUMAN)	P36542	Hs.271135	32,996
A4	Alpha-enolase [Homo sapiens (Human)]	P067331	Hs.517145	47,169
A5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Homo sapiens (Human)) (G3P_HUMAN, GAPDH)	P04406	Hs.544577 Hs.592355	36,053
A6	Alpha-1-antitrypsin (A1AT_HUMAN)	P01009	Hs.525557	46,737
A7	Carbonic anhydrase 1 (CAH1_HUMAN)	P00915	Hs.23118	28,870
A8	Human alpha 2-HS-glycoprotein (Alpha-2-Z-globulin) AHSG	P02765	Hs.324746	49,0
B2	Apolipoprotein A-I [Homo sapiens(human)] (APOA1_HUMAN)	P02647	Hs.93194	30,778
B3	Glutathione S-transferase P (GSTP1_HUMAN)	P09211	Hs.523836	23,36

Механизмът на установената антитуморна активност на хемоцианините НИН, β-НИН-h и RvH2-c включва индукция на апоптоза. Представените резултати показват за първи път влиянието на хемоцианина от *H. lucorum* върху експресията на протеини в човешки туморни клетки CAL-29.

Данните предоставят протеомната карта, която е необходима за по-задълбочено изследване на механизма на действие на тези гликопротеини, като по този начин потвърждават възможността за тяхното приложение като потенциални терапевтични средства срещу рак на пикочния мехур.

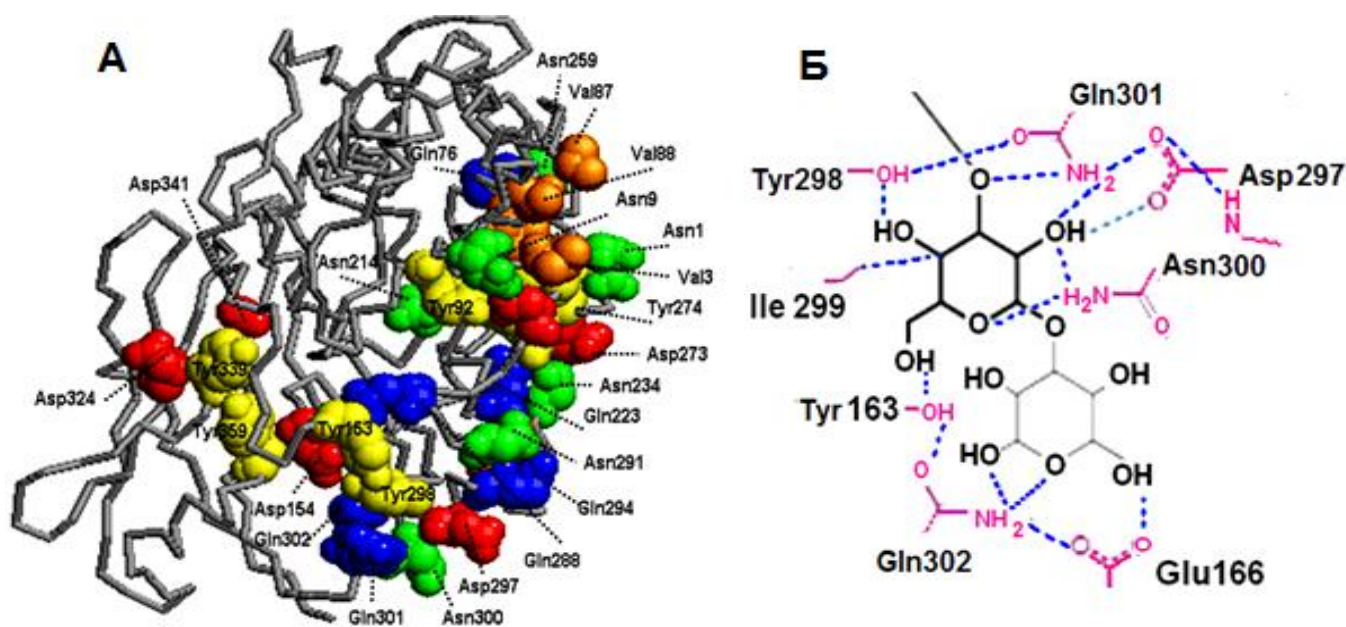
#### IV.6.3.3. АНТИВИРУСЕН ЕФЕКТ НА ИЗОЛИРАНИТЕ ХЕМОЦИАНИНИ

Проведените изследвания също дават ясен отговор за възможността изолираните хемоцианини от вид *Mollusca R. venosa*, *H. lucorum* и KLH и изоформите им да бъдат използвани като терапевтични средства с антивирусен ефект. Проследената зависимост на

антивирусния ефект на добре изследваната структура на RvH, както и ФЕ-ци RvH-c (гликозилирана) и RvH-b (негликозилирана) върху репликацията на Полиовирус тип 1 (LSc-2ab), CV-B1 и RSV доказва изразен инхибиращ ефект единствено от гликозилираната ФЕ RvH-c срещу RSV, размножен в HEp- клетки.

Потвърждение за участие на гликаните е и по-силно изразеният инхибиращ ефект при третиране на Epstein-Barr вируса с ФЕ RvH1-a, за която е доказано по-високо въглехидратно съдържание (7%) в сравнение с RvH2-e (Dolashka-Angelova et al., 2009).

На база на получените резултати е представен важен извод, като за първи път е изказано предположение за Ван-дер-Ваалсови или хидрофобни взаимодействия между АКО на RvH2-e и гликаните на гликопротеините от вирусната обвивка на HSV-тип 1, които се смятат отговорни за неговата репликация (Dolashka et al., 2010a). Обяснение на механизма на потискане на растежа на HSV-1 вируса от гликозилираната ФЕ RvH2-e е направено на база на изказаното предположение за взаимодействие на въглехидратните вериги с АКО на гликопротеини от вирусната обвивка, отговорни за репликацията, или обратно (Фиг. 83А).



**Фиг. 83А)** 3D -модел на ФЕ RvH2-e и включени АКО в луповете (синьо и зелено).

**Б).** Схема на свързване на RvH2-e и gG-2 от HSV-тип 1 чрез Ван дер-Ваалсови взаимодействия и водородни връзки.

Допълнителната информация от построения 3D -модела на RvH2-e спомага за изясняване на механизма на инхибиране, като представя 6 Trp, 18 Tyr и His остатъка, разположени на повърхността на ФЕ. Предполага се, че е възможно те да взаимодействат със страничните вериги на протеини от вирусната обвивка на HSV-тип 1 (Фиг. 83Б) (Dolashka et al., 2010a).

Получените резултати са основа на изказаната за първи път хипотеза за механизма и антивирусния ефект на RvH2-e. Предполага се, че инхибиращият ефект на RvH2-e е в резултат на Ван-дер-Ваалсови взаимодействия между въглехидратните вериги и някои АКО на ФЕ RvH2-e и gG-2 от HSV-тип 1, както и обратно. Изказаната хипотеза за механизма на антивирусния ефект на гликозилирани ФЕ-ци на хемоцианин от *R. venosa* предизвиква голям научен интерес и е основа при проследяване на антивирусния ефект на хемоцианин от охлюви *Haliothis* и от други автори.

Предложеният механизъм за антивирусната активност на хемоцианина срещу HSV-тип 1 предполага, че хемоцианинът влияе върху прикрепването и селективно свързване с гликопротеини GD, GB и GC от вирусната обвивка, вероятно чрез имитиране на съответните

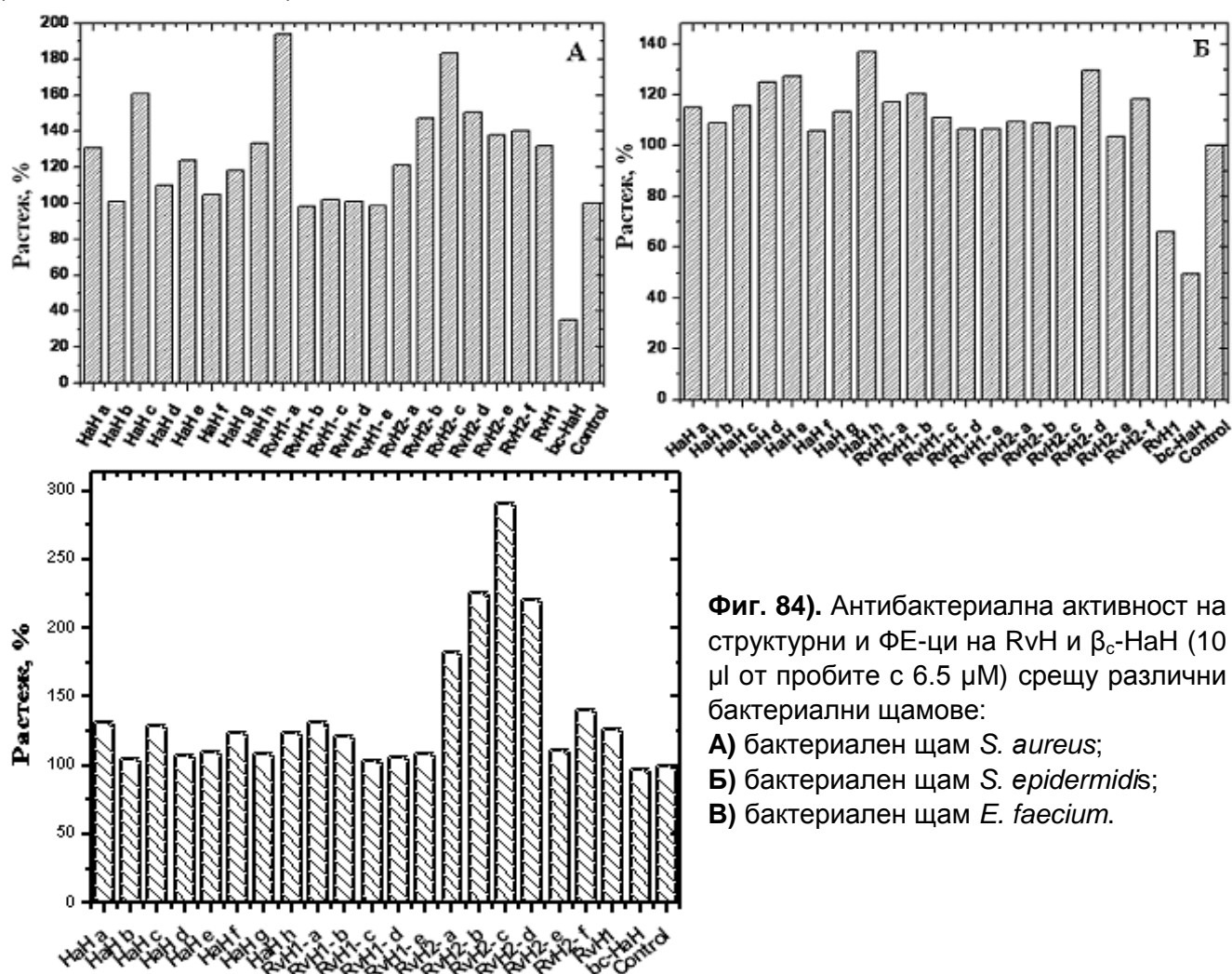
рецептори. Тези резултати потвърждават възможността за свързване на различни мотиви от хемоцианините към всеки от вирусните гликопротеини в HSV-тип1.

#### IV.6.4. АНТИБАКТЕРИАЛЕН ЕФЕКТ НА ИЗОЛИРАНИТЕ ХЕМОЦИАНИНИ

Резултатите от проведените изследвания доказват не само антитуморна и антивирусна активност на хемоцианините от *Rapana* и *Helix*, но и друга важна характеристика - антибактериална активност (Dolashka et al., 2016). За първи път е представена информация за антибактериална активност на RvH и HaH, субединици ( $\beta_c$ -HaH, RvH1, RvH2) и функционалните им единици срещу Грам<sup>+</sup> (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus epidermidis*, *S. pyogenes*) и Грам<sup>-</sup> бактериални щамове (*Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*) (Dolashka et al., 2016).

Данните от антибактериалните тестове на горепосочените хемоцианини и ФЕ-ци от  $\beta_c$ -HaH (-a,b,c,d,e,f,g,h), RvH1 (-a,b,c,d,e) и от RvH2 (-a,b,c,d,e) отчитат слабо потискане на растежа на бактериалния щам *S. aureus* в присъствието на ФЕ-ци RvH1-b и RvH1-e (Фиг. 84А). Голям интерес представлява ефектът на субединица  $\beta_c$ -HaH, която силно потиска растежа на двата бактериални щам, *S. aureus* и *S. epidermidis*. Определеният инхибиращ ефект на хемоцианина върху щам *S. aureus* достига над 65% (Фиг. 84А) и 51% срещу бактериален щам *S. pyogenes* (Фиг. 84Б). Изследваните хемоцианини и изоформите им демонстрират сходно поведение, като не оказват влияние върху развитието на бактериалния щам *E. faecium* (Фиг. 84В).

Получените резултати представят важна характеристика за субединица  $\beta_c$ -HaH, която демонстрира два пъти по-силно изразен антимикробен ефект спрямо бактериалния щам *S. pyogenes*, в сравнение с RvH1 (31,5%), както и срещу Грам<sup>-</sup> бактериален щам *E. coli* (~60%) (Dolashka et al., 2016).



**Фиг. 84).** Антибактериална активност на структурни и ФЕ-ци на RvH и  $\beta_c$ -HaH (10  $\mu$ l от пробите с 6.5  $\mu$ M) срещу различни бактериални щамове:  
**А)** бактериален щам *S. aureus*;  
**Б)** бактериален щам *S. epidermidis*;  
**В)** бактериален щам *E. faecium*.

На база на представената информация за субединица  $\beta_c$ -НаН може да се обясни антибактериалната ѝ активност, която е свързана с високото съдържание на Мап във въглехидратните структури. Изказаното предположение противоречи на получените резултати за другите гликозилирани форми на хемоцианините, за които е доказано отсъствие на активност спрямо тестваните бактериални щамове.

Получени данни след проследяване на антибактериалната активност на НаН и RvH, на изграждащите ги структурни субединици и ФЕ-ци открояват субединица  $\beta_c$ -НаН, в концентрация от 6.5  $\mu\text{M}$ , като един от най-обещаващите и ефективни инхибитори на развитието на Грам<sup>+</sup> (*S. aureus* и *S. epidermidis*) и Грам<sup>-</sup> бактериални щамове (*E. coli*). Проведените изследвания представят нови данни, с които допълват информацията за защитната функция на хемоцианини от вид *Mollusca*, като за първи път е предположено участието на изоформи от RvH и НаН в защитната система на организма. Тези изоформи осигуряват ефективен първоначален отговор срещу патогени, като се предполага инхибиращата активност на НаН и RvH срещу развитието на някои бактериални щамове, за което са отговорни разположените пептиди с антибактериална активност на повърхността на молекулата в хемоцианините.

Публикуваната информация съобщава за резистентността на често използваните антибиотици, пеницилини, тетрациклини и др. към повечето щамове *Staphylococcus*. Доказаната антибактериална активност на  $\beta_c$ -НаН я прави много перспективна за включване, като активен компонент в нови фармацевтични антибактериални препарати.

## V. ИЗВОДИ

На база на получените резултати и тяхното обсъждане, могат да бъдат направени следните изводи:

- 1.** Разработените лабораторни технологии позволяват пречистване с висок добив и висока степен на чистота на нови Cu-съдържащи супероксид дисмутази от гъбични щамове *Humicola lutea* 110 (Cu/Zn-HICOD 110), *Humicola lutea* 103 (Cu/Zn-HICOD 103), *Aspergillus niger* 26 (Cu/Zn-AnCOD 26) и от дрождеви щам *Kluyveromyces marxianus* NBIMCC 1984 (Cu/Zn-KmCOD NBIMCC 1984), както и на хемоцианини от *Carcinus aestuarii* (CaeH), *Eriphia verrucosa* (EvH), *Buthus indicus* (BsH), *Rapana venosa* (RvH), *Helix aspersa* (HaH) и *Helix lucorum* (HlH), със сходни физико-химични свойства с получени от други източници сродни протеини.
- 2.** Новите СОД-зи притежават различни въглехидратни структури, като Cu/Zn-HICOD 103 свързва само един GlcNAc остатък, докато Cu/Zn-KmCOD NBIMCC 1984 притежава комплексна олигозахаридна структура. Въглехидратните вериги са разположени на повърхността на молекулата и не влияят съществено върху структурата и свойствата на ензимите.
- 3.** Филогенетичните анализи, базирани на първичните структури на субединиците CaeSS2, EvH5 и Bsin1 и на N-крайните АКП на субединици на HaH, MsH, PvH, CaeH, EvH, LpH и BsH от вид *Arthropoda*, потвърждават хипотезата за общ артроподен прародител на хемоцианините от клас *Crustacea*.
- 4.** Хемоцианините CaeH, EvH и Bsin са гликопротеини с къси O-гликозилирани структури, а полипептидната верига на CaeSS2 свързва в N-гликозилирания център сложна въглехидратна структура. Олигозахаридната структурна вероятно влияе върху конформационната стабилност на хемоцианините MsH, LpH и CaeH от артроподи, при въздействие на различни денатуранти (температура, pH и Gdn-HCl), която вероятно се дължи на олигомеризацията на структурните субединици.
- 5.** Хемоцианините от молюски имат сходни третични и четвъртични структури, в изграждането на които участват осем функционални единици (от „a” до „h”) с молекулна маса 45 - 60 kDa. Тоталните молекули показват някои структурни различия, като RvH и KLH са изградени от по две различни структурни субединици, а комплексната молекула на HaH и HlH - от три субединици ( $\beta_c$ -,  $\alpha_D$ - и  $\alpha_N$ -).
- 6.** Нуклеотидните последователности на гените на трите субединици на хемоцианина от *H. lucorum* показват висока степен на хомоложност с тези на други хемоцианини от вид *Mollusca*. Размерите на кодиращите последователности (кДНК) са съответно 10 929 дб за  $\beta_c$ -HlH (изградена от 3412  $\alpha$ -АК, Мм ~ 389 kDa) и 10 473 дб за  $\alpha_D$ -HlH (3374  $\alpha$ -АК, Мм ~ 386 kDa). От кДНК на на  $\alpha_N$ -HlH са секвенирани около 88%, което съответства на 3031  $\alpha$ -АК.
- 7.** С помощта на новите методи за амидиране, перметилиране, титруване на гликопротеина с комплекса o-BBV и др. е потвърдено, че хемоцианините RvH, HlH и HtH са гликопротеини. Тези методи са подходящи за изучаване на сложни структури на смеси от гликани в малки концентрации.

**8.** Потенциалните центрове за *N*-гликозилиране при хемоцианините са разположени предимно на повърхността на молекулата, като за трите изоформи на хемоцианин от *H. lucorum* те са: 13 в  $\beta$ -NH, 14 в  $\alpha$ -NH и 7 в  $\alpha$ -NH. Разпределението на центрoвете във функционалните единици варира от един до три, докато в  $\beta$ -NH-b, -c;  $\alpha$ -NH-b, -f;  $\alpha$ -NH-c и  $\alpha$ -NH--f такива центрове липсват.

**9.** Определените 25 въглехидратни структури за RvH1 и 28 за RvH2 са от високоманозен и комплексен тип, а предимно метилирани гликани влизат в състава на NH и HtH. Новооткритите структури, съставени от свързани хексуронова киселина и GlcNAc към вътрешен фукозен остатък, са нов важен клас *N*-гликани, неоткрит в други хемоцианини.

**10.** Хемоцианините NH, RvH, KLH и HtH демонстрират различно поведение след дисоциация и реасоциация, което е свързано със специфичното разположение на въглехидратните вериги на повърхността на декамерите. Вероятно гликаните от ФЕ-h възпрепятстват образуването на дълги мултидекамери от субединици RvH2,  $\beta$ -NH, KLH1 и HtH1, каквито са открити при RvH1, KLH2 и HtH2.

**11.** Процесът на денатурация на молекулата на хемоцианините протича в два етапа: дисоциация на тоталната молекула на хемоцианина до изграждащите я структурни субединици и денатурация на структурните субединици. Определените рН-Т интервали на обратимост чрез кръгов дихроизъм и термодинамичния подход са в много тесни граници за тоталната молекула RvH и структурните субединици. Различията в стабилността им отразяват влиянието на четвъртичната и въглехидратна структури, като резултат от силни заряд-диполни взаимодействия. Установеният по-широк интервал на обратимост и термодинамични характеристики на ФЕ RvH2-е не са свързани с въглехидратната структура, която се намира на повърхността на молекулата.

**12.** Сложните въглехидратни структури участват в изграждането на третичната структура на хемоцианина, което вероятно се дължи на взаимодействие на His остатъци от повърхността на ФЕ от RvH1 и гликаните от друга ФЕ при изграждане на субединицата.

**13.** Хемоцианините не са класифицирани като ензими, но те проявяват ОДФОА (о-дифенолоксидазна активност), сходна с тази на катехол оксидазите, но с по-ниска специфичност от тази на тирозиназите към монофеноли и о-дифеноли. След въздействие с различни ензимни и неензимни реагенти молекулата на ФЕ RvH1-а се превръща от протеин с «транспортна» функция в ензим с ОДФОА.

**14.** Cu/Zn-NiCOD 103 проявява антивирусен и антитуморен ефект, като потиска развитието на грипния вирус A/Aichi (H3N2) и трансплантиран миелоиден тумор на Graffi в хамстери. Това се обяснява с неутрализация на супероксидните радикали, концентрацията на които е повишена в туморните клетки.

**15.** Показаният за първи път инхибиращ ефект на RvH2-е върху репликацията на HSV тип 1 е свързан с Ван-дер-Ваалсови взаимодействия и образуване на водородни връзки между въглехидратната верига на RvH2-е и вируса. Предполага се също, че гликаните са причина и за по-силно изразения инхибиращ ефект на ФЕ RvH1-а (чието въглехидратното съдържание е по-високо в сравнение с RvH2-е) срещу репликацията на Epstein-Barr вируса.

**16.** Представената за първи път инхибираща активност на HtH и RvH срещу развитието на някои бактериални щамове е указание за защитната им функция, която вероятно се дължи на присъствието на разположени пептиди с антибактериална активност на повърхността на

молекулата.  $\beta$ -НаН ясно се откроява като най-обещаващ и ефективен инхибитор срещу развитието на Грам-положителни (*S. aureus* и *S. epidermidis*) и Грам-отрицателни бактерии (*E. coli*).

17. Пречистените хемоцианини са високо ефективни имуностимулатори при имунотерапията на асцитен тумор на Guerin, но не и при солиден миелоиден тумор на Graffi. Доказаният инхибиращ ефект на НН,  $\beta$ с-НН-h и RvH2-с, спрямо Т-24 и CAL-29 човешки клетъчни линии от рак на пикочния мехур е значително по-висок в сравнение с интактните молекули и субединици, което потвърждава предположението за участие на олигозахаридните структури в противотуморния ефект.

## VI. НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Научните приноси на дисертационния труд са в областта на биоорганичната химия и по-конкретно в областта на химия на протеини. Получени са нови данни за структурата и биологичната активност на важна група медни, реагиращи с кислорода гликопротеини.

### I. Приноси, съдържащи нова и оригинална за науката информация

1. Получени са нови природно-гликозилирани, реагиращи с кислорода протеини, с един меден йон в активния център - ензимите Cu/Zn-СОД-зи, от гъбични щамове и от дрожди. Предоставена е информация за структурата и физико-химичните им свойства. За първи път са представени въглехидратните структури на природно гликозилирани СОД-зи.

2. Получени са нови природно-гликозилирани кислород-свързващи протеини с два медни йона в активния център 'хемоцианини', изолирани от различни организми от типа *Arthropoda* и *Mollusca*. Представена е информация за първичните и сложни комплексни въглехидратни структури, както и физико-химични свойства на хемоцианините.

3. За първи път са представени нуклеотидните, аминокиселинни последователности и потенциалните центрове на гликозилиране на три изоформи на хемоцианин от тип *Mollusca*.

4. Разработена е високо ефективна методика за определяне и идентифициране на въглехидратната структура на хемоцианини с неизвестна или частично известна първична структура. За първи път е определена пълната въглехидратна структура на хемоцианини от *Mollusca*, която представен нов важен клас N-гликани за хемоцианините и обогатява базата данни за въглехидратни структури на гликопротеини.

5. За първи път се съобщава за участие на гликаните при сформирание на третичната структура на хемоцианина, като за изграждане на субединицата е изказано предположение за взаимодействие на His остатъци от повърхността на ФЕ от RvH1 и гликаните от друга ФЕ.

6. Установено е влиянието на въглехидратната структура върху стабилитетните характеристики на интактната молекула, структурните субединици и една функционална единица от RvH след оценка чрез термодинамични подходи на стабилността на протеина.

7. За първи път е представено участието на хемоцианини от тип *Mollusca* в защитната функция на организма, като осигуряват първоначална защита срещу инфекциозни патогени. Субединица  $\beta$ с-НаН е доказана, като много перспективна за включване във фармацевтични препарати срещу по-устойчиви инфекции *Staphylococcus*.

**8.** Получени са нови доказателства за по-силно изразен инхибиращ ефект на ФЕ-ци срещу репликацията на вируси, туморни клетъчни линии и бактерии, което вероятно е свързано с неговите специфични олигозахаридни структури.

**9.** Доказана е антитуморната активност на RvH, H1H, HaH и изоформите им върху клетъчни линии T-24 и CAL-29 от рак на пикочния мехур, който е изразен най-силно при ФЕ  $\beta$ c-H1H-h. За първи път е предоставена протеомна карта за цитостатичното действие на хемоцианина от *H. lucorum* върху човешката клетъчна линия CAL-29. Изказано е предположение за специфичната роля на олигозахаридните структури на протеините за тяхното биологично действие срещу рак на пикочния мехур.

## **II. Приноси с потвърдителен характер**

**1.** Потвърдена е информацията за структурата и свойствата на Cu/Zn-СОД от различни източници. Доказана е висока степен на хомоложност между Cu/Zn-СОД-зи, което потвърждава еволюционната стабилност на ензима.

**2.** Потвърдена е информацията за сложна пространствена структура на хемоцианини от *Mollusca*, както и различното поведение на нативните молекули на хемоцианини и изоформите им при промяна на условията на средата.

**3.** Потвърдена е способността на организми от вид *Mollusca* да продуцират хемоцианини със сложни въглехидратни структури, предимно *N*-гликозилирани, за разлика от организми от вид *Arthropoda*.

**4.** Потвърдено е участието на въглехидратната структура в стабилизирането на четвъртичната структура на тоталната молекула на хемоцианините, като е доказана взаимосвързаност между въглехидратната структура и формиране на четвъртичната структура на хемоцианини от вид *Mollusca*.

**5.** Получени са потвърдителни данни относно значението на СОД-зи и хемоцианините при създаване на нови подходи в превенцията и лечението на вирусни, бактериални и туморни заболявания.

## **III. Приноси с методичен характер**

**1.** Предложени са различни методи и условията за пречистване на свързващи кислородни форми гликопротеини с един и два медни йони в активния център.

**2.** Предложен е нов метод за анализ на гликани в смеси и нов подход за определяне на сложни въглехидратни структури и центъра на свързване на гликаните в гликопротеините.

## **IV. Приноси с приложен характер**

**1.** Предложени са лабораторни технологии, както и пречистени Cu/Zn-СОД-зи и хемоцианини от различни източници, които могат да се използват в лечението на вирусни, бактериални и туморни заболявания.

**2.** Създадена е генна банка (ДНК и РНК) и база от структури на гликани, които може да послужат за бъдещи изследвания по тези тематики.



## VIII. ВКЛЮЧЕНИ НАУЧНИ ТРУДОВЕ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Dolashka-Angelova**, P., Angelova, M., Genova, L., Stoeva, S., Voelter, W. (1999a). A novel Cu,Zn superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 110: Isolation and physico-chemical characterization. *Spectrochimica Acta-Part A*: 55, 2249-2260 – **ИФ=1.012**  
*Цитирана 9 пъти.*
2. **Dolashka-Angelova**, P., Genova, L., Stoeva, S., Stefanov, B., Angelova, M., Hristova, R., Pashova, S., Voelter, W. (1999b). Isolation and characterization of a novel superoxide dismutase from fungal strain *Humicola lutea* 110. *Journal of Peptide Research* 54, 279-289 – **ИФ=1.638**  
*Цитирана 6 пъти.*
3. **Dolashka-Angelova**, P., Hristova, R., Stoeva, S., Voelter, W. (1999c). Spectroscopic properties of *Carcinus aestuarii* hemocyanin and its structural subunits. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 55, 2927-2934 – **ИФ=1.012**  
*Цитирана 6 пъти.*
4. **Dolashka-Angelova**, P., Hristova, R., Schuetz, J., Stoeva, S., Schwarz, H., Voelter, W. (2000a). Structural and spectroscopic studies of the native hemocyanin from *Maia squinado* and its structural subunits. *Spectrochimica Acta, Part A* 56, 1985-1999. – **ИФ=1.023**  
*Цитирана 4 пъти.*
5. **Dolashka-Angelova**, P., Schick, M., Stoeva, S., Voelter, W. (2000b). Isolation and partial characterization of the N-terminal functional unit of subunit Rth1 from *Rapana thomasiana* grosse hemocyanin. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 32, 529-538.
6. *Цитирана 4 пъти.* – **ИФ=2.846**
7. Ali, S. A., Abbasi, A., Stoeva, S., Kayed, R., **Dolashka-Angelova**, P., Schwarz, H., Voelter, W. (2000). Oxygen transport proteins: III. Structural studies of the scorpion (*Buthus indicus*) hemocyanin, partial primary structure of its subunit Bsin1. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B Biochemistry and Molecular Biology* 126, 361-376. – **ИФ=1.015**  
*Цитирана 2 пъти.*
8. **Dolashka-Angelova**, P., Beltramini, M., Dolashki, A., Salvato, B., Hristova, R., Voelter, W. (2001). Carbohydrate composition of *Carcinus aestuarii* hemocyanin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 389, 2, 153-158. – **ИФ=2.674**  
*Цитирана 12 пъти.*
9. Angelova, M., **Dolashka-Angelova**, P., Ivanova, E., Serkedjieva, J., Slokoska, L., Pashova, S., Toshkova, R., Vassilev, S., Simeonov, I., Hartmann, H. J., Stoeva, S., Weser, U., Voelter, W. (2001). A novel glycosylated Cu/Zn-containing superoxide dismutase: production and potential therapeutic effect. *Microbiology* 147, 1641-1650. – **ИФ=2.846**  
*Цитирана 32 пъти.*
10. Schütz, J., **Dolashka-Angelova**, P., Abrashev, R., Nicolov, P., Voelter, W. (2001). Isolation and spectroscopic characterization of the structural subunits of keyhole limpet hemocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1546, 325-336 *Цитирана 9 пъти.* – **ИФ=2.112**
11. **Dolashka-Angelova**, P., Schwarz, H., Dolashki, A., Stevanovic, S., Fecker, M., Saeed, M., Voelter, W. (2003a). Oligomeric stability of *Rapana venosa* hemocyanin (RvH) and its structural subunits. *Biochimica et Biophysica Acta—Prot. and Proteomic* 1646, 77- 85 – **ИФ=2.674**  
*Цитирана 6 пъти.*
12. **Dolashka-Angelova**, P., Beck, A., Dolashki, A., Beltramini, M., Stevanovic, S., Salvato, B., Voelter, W. (2003b). Characterization of the carbohydrate moieties of the functional unit RvH1-a of *Rapana venosa* hemocyanin using HPLC/electrospray ionization MS and glycosidase digestion. *Biochemical Journal* 374, 185-192 – **ИФ=4.101**  
*Цитирана 17 пъти.*

13. **Dolashka-Angelova, P.**, Stevanovic, S., Dolashki, A., Angelova, M., Serkedjieva, J., Krumova, E., Pashova, S., Zacharieva, S., Voelter, W. (2004a). Structural and functional analysis of glycosylated Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103. Biochemical and Biophysical Research Communications 317, 1006-1016. - ИФ=2.904  
Цитирана 13 пъти.
14. **Dolashka-Angelova, P.**, Beck, A., Dolashki, A., Stevanovic, S., Beltramini, M., Salvato, B., Hristova, R., Velkova, L., Voelter, W. (2004b). Carbohydrate moieties of molluscan *Rapana venosa* hemocyanin. Micron 35, 101-104. - ИФ=1.464  
Цитирана 6 пъти.
15. Stefanov, R., Angelova, M., Stefanova, T., Subev, M., **Dolashka, P.**, Voelter, W., Zachariev, Z. (2004). Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103 improves ram spermatozoa functions *in vitro*. Andrologia 36, 51-56. - ИФ=1.000  
Цитирана 11 пъти.
16. **Dolashka-Angelova, P.**, Dolashki, A., Stevanovic, S., Hristova, R., Atanasov, B., Nicolov, P., Voelter, W. (2005a). Structure and stability of arthropodan hemocyanin *Limulus polyphemus*. Spectrochimical Acta - Part A 61, 1207-1217. - ИФ=1.188  
Цитирана 11 пъти.
17. **Dolashka-Angelova, P.**, Dolashki, A., Savvides, S.N., Hristova, R., Van Beeumen, J., Voelter, W., Devreese, B., Weser, U., Di Muro, P., Salvato, B., Stevanovic, S. (2005b). Structure of hemocyanin subunit CaεSS2 of the crustacean mediterranean crab *Carcinus aestuarii*. Journal of Biochemistry 138, 303-312. - ИФ=1.827  
Цитирана 10 пъти.
18. Abrashev, R., **Dolashka, P.**, Christova, R., Stefanova, L., Angelova, M. (2005). Role of antioxidant enzymes in survival of conidiospores of *Aspergillus niger* 26 under conditions of temperature stress. Journal of Applied Microbiology 99, 902-909. - ИФ=2.127  
Цитирана 27 пъти.
19. Beck, A., Hillen, N., Dolashki, A., Stevanovic, S., Salvato, B., Voelter, W., **Dolashka-Angelova, P.** (2007). Oligosaccharide structure of a functional unit RvH1-b of *Rapana venosa* hemocyanin using HPLC/electrospray ionization mass spectrometry. Biochimie 89, 938-949. - ИФ=2.899  
Цитирана 5 пъти.
20. **Dolashka-Angelova, P.**, Stevanovic, S., Dolashki, A., Devreese, B., Tzvetkova, B., Voelter, W., Van Beeumen, J., Salvato, B. (2007). A challenging insight on the structural unit 1 of molluscan *Rapana venosa* hemocyanin. Archives of Biochemistry and Biophysics 459, 50-58. - ИФ=2.578  
Цитирана 5 пъти.
21. Krumova, E., **Dolashka-Angelova, P.**, Pashova, S., Stefanova, L., Van Beeumen, J., Vassilev, S., Angelova, M. (2007). Improved production by fed-batch cultivation and some properties of Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103. Enzyme and Microbial Technology 40, 524-532. - ИФ=1.969  
Цитирана 8 пъти.
22. Sandra, K., **Dolashka-Angelova, P.**, Devreese, B., Van Beeumen, J. (2007). New insights in *Rapana venosa* hemocyanin N-glycosylation resulting from on-line mass spectrometric analyses. Glycobiology 17, 2, 141-156 - ИФ=3.886  
Цитирана 12 пъти.
23. Hristova, R., Dolashki, A., Voelter, W., Stevanovic, S., **Dolashka-Angelova, P.** (2008). O-Diphenol oxidase activity of molluscan hemocyanins. Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry and Molecular Biology 149, 439-446 - ИФ=1.468  
Цитирана 19 пъти.
24. Krumova, E., Dolashki, A., Pashova, S., **Dolashka-Angelova, P.**, Stevanovic, S., Hristova, R., Stefanova, L., Voelter, W., Angelova, M. (2008). Unusual location and characterization of Cu/Zn-containing superoxide dismutase from filamentous fungus *Humicola lutea*. Archives of Microbiology 189, 121-130. - ИФ=1.975

Цитирана 9 пъти.

25. Abrashev, R.I., Pashova, S.B., Stefanova, L. N., Vassilev, S.V., **Dolashka-Angelova, P.A., Angelova, M.B.** (2008). Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. Canadian Journal of Microbiology 54, 12, 977-983. – ИФ=1.102

Цитирана 38 пъти.

26. **Dolashka-Angelova, P.**, Stefanova, T., Livaniou, E., Velkova, L., Klimentzou, P., Stevanovic, S., Salvato, B., Neychev, H., Voelter, W. (2008). Immunological potential of *Helix vulgaris* and *Rapana venosa* hemocyanins. Immunological Investigations 37, 822-840. – ИФ=1.754

Цитирана 11 пъти.

27. Dolashki, A., Abrashev, R., Stevanovic, S., Stefanova, L., Ali, S. A., Velkova, L., Hristova, R., Angelova, M., Voelter, W., Devreese, B., Van Beeumen, J., **Dolashka-Angelova, P.** (2008a). Biochemical properties of Cu/Zn-superoxide dismutase from fungal strain *Aspergillus niger* 26. Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 71, 975-983.

Цитирана 14 пъти.

– ИФ=1.510

28. Dolashki, A., Velkova, L., Atanasov, B., Voelter, W., Stevanovic, S., Schwarz, H., Di Muro, P., **Dolashka-Angelova, P.** (2008b). Reversibility and "pH-T phase diagrams" of *Rapana venosa* hemocyanin and its structural subunits. Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics 1784, 1617-1624. – ИФ=2.233

Цитирана 4 пъти.

29. Krumova, E. Z., Pashova, S. B., Dolashka-Angelova, P. A., Stefanova, T., Angelova, M. B. (2009). Biomarkers of oxidative stress in the fungal strain *Humicola lutea* under copper exposure. Process Biochemistry 44, 288-295. – ИФ=2.444

Цитирана 20 пъти.

30. Nedeva, T., **Dolashka-Angelova, P.**, Moshtanska, V., Voelter, W., Petrova, V., Kujumdzieva, A. (2009). Purification and partial characterization of Cu/Zn superoxide dismutase from *Kluyveromyces marxianus* yeast. Journal of Chromatography B 877, 3529-3536 – ИФ=2,777

Цитирана 16 пъти.

31. **Dolashka-Angelova, P.**, Lieb, B., Velkova, L., Heilen, N., Sandra, K., Nikolaeva-Glomb, L., Dolashki, A., Galabov, A. S., Van Beeumen, J., Stevanovic, S., Voelter, W., Devreese, B. (2009). Identification of glycosylated sites in *Rapana* hemocyanin by mass spectrometry and gene sequence and their antiviral effect. Bioconjugate Chemistry 20, 1315-1322. – ИФ=4.350

Цитирана 16 пъти.

32. **Dolashka, P.**, Velkova, L., Shishkov, S., Kostova, K., Dolashki, A., Dimitrov, I., Atanasov, B., Devreese, B., Voelter, W., Van Beeumen, J. (2010a). Glycan structures and antiviral effect of the structural subunit RvH2 of *Rapana* hemocyanin. Carbohydrate Research 345, 2361-2367.

Цитирана 25 пъти.

– ИФ=1.898

33. **Dolashka-Angelova, P.**, Moshtanska, V., Kujumdzieva, A., Atanasov, B., Petrova, V., Voelter, W., Beeumen, J.V. (2010b). Structure of glycosylated Cu/Zn-superoxide dismutase from *Kluyveromyces yeast* NBIMCC 1984. Journal of Molecular Structure 980, 18-23. – ИФ=1.599

Цитирана 4 пъти.

34. Velkova, L., Dimitrov, I., Schwarz, H., Stevanovic, S., Voelter, W., Salvato, B., **Dolashka-Angelova, P.** (2010a). Structure of hemocyanin from garden snail *Helix lucorum*. Comparative Biochemistry and Physiology—Part B: Biochemical and Molecular Biology 157, 16-25 – ИФ=1,989

Цитирана 14 пъти.

35. Velkova, L., **Dolashka, P.**, Dolashki, A., Voelter, W., Atanasov, B. (2010b). Structural analysis and molecular modeling of the RvH2-e functional unit of *Rapana venosa* hemocyanin. Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics 1804, 2177-2182. – ИФ=2.773

Цитирана 2 пъти

36. **Dolashka, P.**, Moshtanska, V., Dolashki, A., Velkova, L., Rao, G. S., Angelova, M., Betzel, C., Voelter, W., Atanasov, B. (2011a). Structural analysis and molecular modelling of the Cu/Zn-SOD

from fungal strain *Humicola lutea* 103. Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 83, 67-73. – ИФ=2.098

Цитирана 5 пъти.

37. **Dolashka, P.**, Velkova, L., Iliev, I., Beck, A., Dolashki, A., Yossifova, L., Toshkova, R., Voelter, W., Zacharieva, S. (2011a). Antitumor activity of glycosylated molluscan hemocyanins via Guerin ascites tumor. Immunological Investigations 40, 130-149. – ИФ=1.164

Цитирана 12 пъти.

38. De Smet, L., Dimitrov, I., Debyser, G., **Dolashka-Angelova, P.**, Dolashki, A., Van Beeumen, J., Devreese, B. (2011). The cDNA sequence of three hemocyanin subunits from the garden snail *Helix lucorum*. Gene 487, 118-128. – ИФ=2.341

Цитирана 7 пъти.

39. Dolashki, A., Voelter, W., **Dolashka, P.** (2011). Phenoloxidase activity of intact and chemically modified functional unit RvH1-a from molluscan *Rapana venosa* hemocyanin. Comparative Biochemistry and Physiology – B: Biochemistry and Molecular Biology 160, 1-7 – ИФ=1.923

Цитирана 10 пъти.

40. Velkova, L., **Dolashka, P.**, Lieb, B., Dolashki, A., Voelter, W., Van Beeumen, J., Devreese, B. (2011). Glycan structures of the structural subunit (HtH1) of *Haliothis tuberculata* hemocyanin. Glycoscience Journal 28, 385-395. – ИФ=2.117

Цитирана 15 пъти.

41. **Dolashka, P.**, Zal, F., Dolashki, A., Molin, L., Traldi, P., Salvato, B. (2012a). ESI-MS and MALLS analysis of quaternary structure of molluscan hemocyanins. Journal of Mass Spectrometry 47, 940-947. – ИФ=3.214

Цитирана 3 пъти.

42. **Dolashka, P.** (2012b). Tandem Mass Spectrometry and Glycoproteins. Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles. Edited by Jeevan K. Prasain. 123-144.

Цитирана 1 път.

43. **Dolashka, P.**, Voelter, W. (2013). Antiviral activity of hemocyanins. Review. Invertebrate Survival Journal 10, 120-127. – ИФ=1.81

Цитирана 10 пъти.

44. Kostadinova, E., **Dolashka, P.**, Velkova, L., Dolashki, A., Stevanovic, S., Voelter, W. (2013). Positions of the glycans in molluscan hemocyanin, determined by fluorescence spectroscopy. Journal of Fluorescence 23, 753-760. – ИФ=1.667

Цитирана 2 пъти.

45. Abrashev, R., Stoitsova, S., Krumova, E., Pashova, S., Paunova-Krasteva, T., Vassilev, S., **Dolashka-Angelova, P.**, Angelova, M. (2014). Temperature-stress tolerance of the fungal strain *Aspergillus niger* 26: Physiological and ultrastructural changes. World Journal of Microbiology and Biotechnology 30, 1661-1668. – ИФ=1,779

Цитирана 4 пъти.

46. Dolashki, A., Radkova, M., Todorovska, E., Ivanov, M., Stevanovic, S., Molin, L., Traldi, P., Voelter, W., **Dolashka, P.** (2015). Structure and Characterization of *Eriphia verrucosa* Hemocyanin. Marine Biotechnology 17, 743-752. – ИФ=3,062

Цитирана 2 пъти.

47. **Dolashka, P.**, Dolashki, A., Velkova, L., Stevanovic, S., Molin, L., Traldi, P., Velikova, R., Voelter, W. (2015). Bioactive compounds isolated from garden snails. Journal of BioScience & Biotechnology, 147-155. SE/ ONLINE

Цитирана 4 пъти.

48. **Dolashka, P.**, Dolashki, A., Van Beeumen, J., Floetenmeyer, M., Velkova, L., Stevanovic, S., Voelter, W. (2016). Antimicrobial activity of molluscan hemocyanins from *Helix* and *Rapana* snails. Current Pharmaceutical Biotechnology 17, 263-270. – ИФ=2,459

Цитирана 14 пъти.

49. Stenzl, A., Dolashki, A., Stevanovic, S., Voelter, W., Aicher, W., **Dolashka, P.** (2016) Cytotoxic effects of *Rapana venosa* hemocyanin on bladder cancer permanent cell lines. Journal of US-China Medical Science 13, 179-188. **– ИФ= 0.84**  
Цитирана 3 пъти.
50. Velkova L., Dolashka P., Van Beeumen J., Devreese B. (2017) N-glycan structures of  $\beta$ -HIH subunit of *Helix lucorum* hemocyanin. Carbohydrate Research 449 (2017) 1-10 - **ИФ=2.096**  
Цитирана 1 пъти.
51. Dolashki, A., **Dolashka, P.**, Stenzl, A., Stevanovic, S., Aicher, W.K., Velkova, L., Velikova, R., and Voelter, W. (2017) Antitumor activity of Helix hemocyanin against bladder carcinoma permanent cell lines. Biotechnology & Biotechnol. Equipment. ONLINE (2018) **– ИФ=1.059**

**ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР 98,359**

### **КРАТКИ СЪОБЩЕНИЯ, ПУБЛИКУВАНИ В НАУЧНИ СПИСАНИЯ**

1. Ivanov, M., Radkova, M., Todorovska, E., Dolashki, A., and **Dolashka, P.** (2014). Isolation of two partial hemocyanin gene transcripts from *Eriphia verrucosa* (class Malacostraca). Journal of Peptide Science, 215. **ИФ=1.546** Цитирана 1 пъти
2. Velkova, L., Dolashki, A., and **Dolashka, P.** (2014). Analysis of a glycopeptide from structural subunit ( $\beta$ c-HIH) of *Helix lucorum* hemocyanin by mass spectrometry. Journal of Peptide science, 288-289. **ИФ=1.546** Цитирана 1 пъти
3. Zagorodnya, Svitlana, **Dolashka, Pavlina**, Baranova, Galina Golovan, Anna Kurova, Nesterova, Nadiya, (2011) Anti-EBV Activity of Hemocyanin Isolated from *Helix lucorum*. Antiviral Research, 90 (2), A66, **ИФ-4.301** Цитирана 9 пъти
4. Nesterova N., Zagorodnya, S., Moshtanska, V., **Dolashka, P.**, Baranova, G., Golovan, A. K. (2011) Antiviral Activity of Hemocyanin Isolated from Marine Snail *Rapana venosa*. Antiviral Research, 90 (2), A38, **ИФ-4.301** Цитирана 10 пъти

### **IX. СПИСЪК НА ПРЕДСТАВЕНИ РЕЗУЛТАТИ ОТ ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД НА КОНФЕРЕНЦИИ**

1. R. Abrashev, A. Dolashki, S. Stevanovic, P. Dolashka, W. Voelter, L. Stefanova, S. Pashova, R. Hristova, M. Angelova. Corelation between heat shock and oxidative stress resposes of *Aspergillus niger*. FEMS Congress of Eurpian Microbiologists, 4-8 July 2006, Madrid, Spain.
2. E. Krumova, Y. Gocheva, A. Dolashki, P. Dolashka, S. Stefanovic, W. Voelter, M. Angelova, Adaptive stress response of *Humicola lutea*103 to copper exposure. GAM47. Eleventh Congress of the Bulgarian Microbiologists with International Participation International House of Scientists Frederic Joliot-Curie St. Constantine, 5-7 October 2006, Varna, Bulgaria.
3. R. Abrashev, A. Dolashki, S. Stevanovic, P. Dolashka, W. Voelter, L. Stefanova, S. Pashova, R. Hristova, M. Angelova, Cellular response and antioxidants enzymes in *Aspergillus niger* strain against temperature stress. GAM49. Eleventh Congress of the Bulgarian Microbiologists with International Participation International House of Scientists Frederic Joliot-Curie St. Constantine, 5-7 October 2006, Varna, Bulgaria.
4. R. Toshkova, E. Ivanova, M.-D. Nastke, L. Velkova, S. Stevanovic, R. Hristova, A. Dolashki, M. Gardeva, I. Dimitrov, W. Voelter, P. Dolashka - Angelova. Hemocyanins as immunostimulators.

- II16. Eleventh Congress of the Bulgarian Microbiologists with International Participation International House of Scientists Frederic Joliot-Curie St. Constantine, 5-7 October 2006, Varna, Bulgaria.
5. P. Dolashka - Angelova. Complete oligosaccharide structure of *Rapana venosa* hemocyanin. 9th International symposium on "Protein Structure Function Relationship" 11-14 January 2007, Karachi, Pakistan.
  6. P. Dolashka - Angelova, L. Velkova, K. Sandra, A. Beck, A. Dolashki, B. Devreese, S. Stevanovic, J. Van Beeumen. Complete oligosaccharide structure of *Rapana venosa* hemocyanin. P21. Sofia School of Protein Science - 2007, For Students and Young Researchers, Institut Curie & Institute of Organic Chemistry with Center of Phytochemistry-BAS, 3-5 October 2007, Sofia, Bulgaria
  7. P. Dolashka - Angelova, L. De Smit, I. Dimitrov, T. Stefanova, E. Livaniou, L. Velkova, S. Stevanovic, B. Salvato, W. Voelter. Gene sequence and immunological properties of *Helix vulgaris* hemocyanin, isolated garden snails, in comparison with other molluscan hemocyanins. P26. Sofia School of Protein Science-2007, For Students and Young Researchers, Institut Curie & Institute of Organic Chemistry with Center of Phytochemistry-BAS, Sofia, 3-5 October 2007, Sofia, Bulgaria.
  8. V. Moshtanska, P. Dolashka - Angelova, L. Velkova, M. Angelova, W. Voelter, B. Atanasov. Electrostatic analysis of *Humicola lutea* 103 superoxide dismutase in comparison with bovine enzyme. P14. Technical Digest FEBS 2009, Sofia school of protein science from basic research to drug design, FEBS Practical & Lecture Course, 21-26 September 2009, Sofia, Bulgaria.
  9. I. Dimitrov, L. De Smit., L. Velkova, S. Shishkov, K. Kostova, B. Devreese, J. van Beeumen, P. Dolashka - Angelova. *Helix vulgaris* hemocyanin: Gene sequence and antiviral properties. P9. Technical Digest FEBS 2009, Sofia school of protein science from basic research to drug design, FEBS Practical & Lecture Course, 21-26 September 2009, Sofia, Bulgaria.
  10. I. Iliev, L. Yossifova, R. Toshkova, P. Dolashka-Angelova, J. Yaneva, S. Zacharieva. Antitumor Activity of Hemocyanins from *Rapana venosa* and *Helix vulgaris* in Experimental Models. XI ASC "Biology – traditions and challenges", 27 – 29 May 2009, Sofia, Bulgaria.
  11. L. Velkova, D. Todorov, I. Dimitrov, S. Shishkov, B. Atanasov, P. Dolashka-Angelova. *Rapana venosa* hemocyanin with antiviral activity. XI ASC "Biology – traditions and challenges", 27–29 May 2009, Sofia, Bulgaria
  12. V. Moshtanska, A. Kujumdzieva, B. Atanasov, V. Petrova, J. Van Beeumen, P. Dolashka-Angelova. Glycosylated Cu/Zn-superoxide dismutase from *Kluyveromyces* yeast, determined by mass spectrometry. XI ASC "Biology – traditions and challenges" 27–29 May 2009, Sofia, Bulgaria.
  13. R. Abrashev, S. Pashova, L. Stefanova, S. Vassilev, P. Dolashka, M. Angelova. Temperature-stress tolerance of the fungus strain *Aspergillus niger* 26. XI Anniversary Scientific Conference "Biology –Traditions and challenges" 27–29 May 2009, Sofia, Bulgaria.
  14. L. Velkova, P. Dolashka-Angelova, W. Voelter, B. Atanasov. Thermodynamic and Electrostatic analysis of Functional unit RvH2-e of *Rapana* Hemocyanin. XI ASC "Biology–traditions and challenges", 27 – 29 May 2009, Sofia, Bulgaria.
  15. L. Velkova, I. Iliev, L. Yossifova, I. Dimitrov, V. Moshtanska, S. Zacharieva, P. Dolashka-Angelova. Isolation of molluscan hemocyanin *Helix vulgaris* with antitumor effect on Guerin ascites tumor-bearing animals XI ASC "Biology–traditions and challenges", 27 – 29 May 2009, Sofia, Bulgaria.
  16. V. Moshtanska, P. Dolashka - Angelova, L. Velkova, M. Angelova, W. Voelter, B. Atanasov. Electrostatic analysis of *Humicola Lutea* 103 superoxide dismutase in comparison with bovine enzyme. XI ASC "Biology – traditions and challenges", 27 – 29 May 2009, Sofia, Bulgaria.

17. L. Yossifova, I. Iliev, S. Petkova, P. Dolashka-Angelova, L. Mihov and S. Zacharieva. Immunological research on the protective properties of hemocyanin derived from *Helix vulgaris* and its conjugates against infection with *Trichinella spiralis*. MB P 90, XI Anniversary Scientific Conference "Biology – Traditions and challenges" 27–29 May 2009, Sofia, Bulgaria.
18. L. Yossifova, I. Iliev, S. Petkova, P. Dolashka-Angelova, L. Mihov and S. Zacharieva. Immunological research on the protective properties of hemocyanin derived from *Helix vulgaris* and its conjugates against infection with *Trichinella spiralis*. Bulgarian Society for Parasitology Eighth National Conference of Parasitology, 23-26 September 2009, Varna, Bulgaria.
19. I. Iliev, L. Yossifova, R. Toshkova, P. Dolashka-Angelova, J. Yaneva, S. Zacharieva. Hemocyanins from *Rapana venosa* and *Helix vulgaris* Display an Antitumor Activity via Specific Activation of Certain Immune Cells. P2.2. Bulgarian-Japanese Symposium "Genomics and Proteomics in Personalized Medicine" 19–20 March 2009, Sofia, Bulgaria.
20. L. Yossifova, L. Velkova, I. Iliev, I. Dimitrov, V. Moshtanska, S. Zacharieva, P. Dolashka-Angelova. *Helix vulgaris* hemocyanin: structure and anticancer activity. P2.9. Bulgarian-Japanese Symposium "Genomics and Proteomics in Personalized Medicine" 19–20 March 2009, Sofia, Bulgaria
21. L. Velkova, D. Todorov, I. Dimitrov, S. Shishkov, B. Atanasov, P. Dolashka-Angelova. *Rapana venosa* hemocyanin with antiviral activity. P2.11. Bulgarian-Japanese Symposium "Genomics and Proteomics in Personalized Medicine" 19–20 March 2009, Sofia, Bulgaria.
22. V. Moshtanska, P. Dolashka-Angelova, L. Velkova, M. Angelova, W. Voelter, B. Atanasov. Antiviral and electrostatic analysis of *Humicola lutea* 103 superoxide dismutase in comparison with bovine enzyme. P2.12. Bulgarian-Japanese Symposium "Genomics and Proteomics in Personalized Medicine" 19–20 March 2009, Sofia, Bulgaria.
23. D. Toncheva, I. Dimova, D. Nikolova, P. Dolashka, M. Polenakovic, S. Stefanovic. Uroepithelial tumors associated with Balkan endemic nephropathy-specific and common molecular pathways. ERUKUP, COST meeting, 16.11.2009, Sheffield, UK.
24. И. Димитров, Л. Де Смет, Л. Велкова, Б. Девреезе, Ж. Ван Бимен, П. Долашка – Ангелова. Генна секвенция на структурна субединица  $\beta$  на хемоцианина от градинскиохлюв *Helix lucorum*. IX Национална конференция по химия за студенти и докторанти 18-19.05.2010, София, България.
25. O. S. Boyanova, P. Dolashka - Angelova, L. Yossifova, S. Zacharieva, L. Velkova, I. Dimitrov, D. Toncheva; P06.015 Testing the antitumor effect of hemocyanins on genomics and proteomics level European Human Genetics Conference 2010 Gothenburg, Sweden June 12 - 15, 2010.
26. N. Nesterova, P. Dolashka - Angelova, S. Zagorodnya, V. Moshtanska, G. Baranova, A. Golovan, A. Kurova. *In vitro* Investigation of Cytotoxic Action of Hemocyanins on Cell Cultures. The International Society For Antiviral Research Hyatt Regency San Francisco 25–28 April 2010, San Francisco, California, USA.
27. L. Yossifova, I. Iliev, E. Gardeva, P. Dolashka - Angelova, V. Moshtanska, L. Velkova, S. Zacharieva. Research on the protective properties of haemocyanin from *Helix vulgaris* (HvH) and its derivatives against infection with *Trichinella spiralis*. P45. British Society for Parasitology Spring Meeting and Trypanosomiasis & Leishmaniasis Seminar Cardiff University, March 29th–April 1st 2010, Wales, UK.
28. I. Iliev, L. Yossifova, E. Gardeva, P. Dolashka – Angelova, S. Zacharieva. Study on the immune properties of *Rapana venosa* hemocyanin and its application as experimental anti-parasitic vaccine. P46. British Society for Parasitology Spring Meeting and Trypanosomiasis & Leishmaniasis Seminar Cardiff University, March 29th–April 1st 2010, Wales, UK.

29. A. Dolashki, A. Gushterova, B. Tchorbanov, W. Voelter, P. Dolashka - Angelova. O-Diphenoloxidase activity of copper-containing proteins. P-75. VIII Научна конференция по химия, 18-19 юни 2010г., гр. Копривщица, България
30. I. Dimitrov, L. DeSmet, B. Devreese, J. Van Beeumen, P. Dolashka - Angelova. Gene sequence of *Helix lucorum* hemocyanin. P-76. VIII Научна конференция по химия, 18-19 юни 2010 г., гр. Копривщица, Българи
31. L. Velkova, A. Dolashki, S. Shishkov, P. Dolashka - Angelova. Complete oligosaccharide structure of *Rapana venosa* hemocyanin. P-77. VIII Научна конференция по химия, 18-19 юни 2010 г., гр. Копривщица, България.
32. V. Moshtanska, V. Borisova, A. Dolashki, T. Dimanov, W. Voelter, P. Dolashka - Angelova. Purification, characterization and molecular indentification of antimicrobial peptides from the hemolymph of marine snail *Rapana venosa*. P-78. VIII Научна конференция по химия, 18-19 юни 2010 г., гр. Копривщица, България.
33. P. Dolashka. Potential application of molluscan hemocyanins in bladder cancer therapy. EuroKUP COST Meeting 17-19 June 2011, Madrid, Spain.
34. P. Dolashka, L. Velkova, A. Dolashki, F. Zal, L. Francois, S. Stevanovic, W. Voelter L. Molin, P. Traldi, B. Salvato. Oligosaccharide structures of hemocyanins determined by mass spectrometry. Lecture, W2. 29<sup>th</sup> Informal Meeting on Mass Spectrometry, 15-19 May2011, Fiera di Primiero, Italy.
35. O. Bojanova, L. Yossifova, S. Stevanovic, G. Feil, A. Stenzl, W. Voelter, D. Toncheva, P. Dolashka. Potential usage of *Helix lucorum* and *Rapana venosa* hemocyanins in bladder cancer therapy. European Human Genetics Conference, 27-31.05.2011, Amsterdam, Netherlands.
36. L. Velkova, L. Nikolaeva-Glomb, L. Mukova, A. Dolashki, P. Dolashka, A. Galabov. [Antiviral effect of molluscan maemocyanines](#). 24-th ICAR Sofia, Bulgaria, 8 -11 May 2011.
37. E. Kostadinova, P. Dolashka, S. Kaloyanova, L. Velkova, T. Deligeorgiev, W. Voelter, I. Petkov. Method for analysis of different oligosacchiride structures. XVII International meeting "Oxygen binding and sensing proteins", 29th August - 1st September 2012, Parma, Italy.
38. O. Boyanova, P. Dolashka, L. Velkova, B. Rukova, I. Dimova, S. Hadjidekova, D.Toncheva. Expression profile of bladder cancer cell lines after treatment with potential new drug- HIH" European Human Genetics Conference, 23 – 26 June 2012, Nürnberg, Germany
39. A. Dolashki, W. Voelter, B. Tchorbanov, P. Dolashka - Angelova. Conversion of hemocyanin from *Rapana* into enzyme. P13. XVI International conference on oxygen binding and sensing proteins, 22-26 August, 2010, Antwerp, Belgium.
40. V. Moshtanska, V. Borisova, A. Dolashki, S. Stevanovic, T. Dimanov, W. Voelter, P. Dolashka-Angelova. Antimicrobial peptides from the hemolymph of molluscs. P12. XVI International conference on oxygen binding and sensing proteins, 22-26 August, 2010, Antwerp, Belgium.
41. V. Moshtanska, P. Dolashka, V. Borisova, A. Dolashki, S. Stevanovic, T. Dimanov, W. Voelter. Mass spectrometric analyses of antimicrobial peptides isolated from haemolymph of molluscs. P26. 29-th Informal Meeting on Mass Spectrometry, 15-19 May2011, Fiera di Primiero, Italy
42. П. Долашка: Биологично активни компоненти в градинския охлюв и приложението им. Научна конференция РУ & ДНТ & СУ'2012 Посвещава се на Деня на народните будители. 02.11-03.11.2012 г. Разград, България.
43. P. Dolashka, F. Zal, A. Dolashki, L. Molin, P. Traldi, B. Salvato. ESI-MS and MALLS analysis of quaternary structure of molluscan and arthropodan hemocyanins. XVII International meeting "Oxygen binding and sensing proteins". 29th August - 1st September 2012, Parma, Italy
44. O. Boyanova, P. Dolashka, L. Velkova, B. Rukova, D. Toncheva: Presenting the results of experiments with *Helix lucorum* hemocyanin (HIH)-potential new agent in bladder cancer



- treatment. 8th Management Committee and Working Group meeting of the COST Action Kidney and Urine Proteomics EuroKUP, 29.03-1.04.2012, Sounion, Greece.
45. П. Долашка пленарен доклад „От науката към бизнеса” научна конференция на Русенски университет "Ангел Кънчев" филиал Разград 31.10 – 01.11.2014
  46. L. Velkova, P. Dolashka, A. Dolashki, S. Stevanovic, W. Voelter, J. Van Beeumen, B. Devreese. Analysis of glycoprotein from hemolymph of *Helix lucorum* garden snail. 33-rd European Peptide Symposium, 31.08-05.09.2014, Sofia, Bulgaria.
  47. M. Ivanov, E. Todorovska, P. Dolashka, A. Dolashki, M. Radkova, O. Georgiev. Cloning, characterization and phylogenetic analysis of actin coding cDNA from *Rapana venosa*. 33-rd European Peptide Symposium, 31.08-05.09.2014, Sofia, Bulgaria.
  48. A. Dolashki, P. Dolashka, S. Stevanovic, L. Molin, P. Traldi, L. Velkova, J. Van Beeumen, B. Devreese, W. Voelter. Antimicrobial activity of peptides isolated from the hemolymph of *Helix lucorum* snails. 33-rd European Peptide Symposium, 31.08-05.09.2014, Sofia, Bulgaria.
  49. P. Dolashka, A. Dolashki, L. Velkova, S. Stevanovic, L. Molin, P. Traldi R. Velikova, W. Voelter. "Bioactive compounds isolated from garden snails". Пленарен доклад. Втора Национална младежка конференция „[Биологически науки за по-добро бъдеще](#)” 30-31.10.2015, Пловдив
  50. P. Dolashka, A. Dolashki, L. Velkova, S. Stevanovic, L. Molin, P. Traldi R. Velikova, W. Voelter. Poster P80. Bioactive compounds isolated from garden snails. Втора Национална младежка конференция „Биологически науки за по-добро бъдеще” 30-31.10.2015, Пловдив.
  51. L. Velkova, P. Dolashka - Angelova., A. Dolashki., B. Devreese J. Van Beeumen. Carbohydrate structures of molluscan hemocyanins from snails *Helix lucorum* and *Rapana venosa*, determined by mass spectrometry. Втора Национална младежка конференция „[Биологически науки за по-добро бъдеще](#)” 30-31.10.2015, Пловдив.
  52. L. Velkova, P. Dolashka-Angelova, A. Dolashki, B. Devreese, J. Van Beeumen. Carbohydrate structures of the  $\beta$ c-H1H structural subunit of *Helix lucorum* hemocyanin. P100. Втора Национална младежка конференция „Биологически науки за по-добро бъдеще” 30-31.10.2015, Пловдив.
  53. P. Dolashka, A. Dolashki, O. Antonowa, L. Velkova, R. Velikova, J. Van Beeumen, S. Stevanovic, W. Voelter, H.-G. Rammensee, B. Devreese. Proteomic analysis of antitumor activity of molluscan hemocyanin. 10th Central and Eastern European Proteomic Conference (11-15.10.2016) Budapest, Hungary.
  54. L. Velkova, P. Dolashka, B. Lieb, J. Van Beeumen, B. Devreese. Glycan structures of the structural subunit HtH2 of *haliotis tuberculata* hemoc. 10th Central and Eastern European Proteomic Conference. 11-15.10.2016, Budapest, Hungary.
  55. P. Dolashka, A. Dolashki, L. Velkova, S. Stevanovic, L. Molin, P. Traldi R. Velikova, W. Voelter. BO3. Bioactive compounds isolated from garden snails. XIth работна среща с международно електронно участие “Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти” 14-16.12.2016 г.
  56. L. Velkova, A. Dolashki, P. Dolashka. BO4. N- Linked carbohydrate structures of molluscan hemocyanins from snails. XIth работна среща с международно участие “Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти” 14-16.12.2016г.
  57. A. Dolashki, P. Dolashka, A. Stenzl, S. Stevanovic, W.K. Aicher, L. Velkova, R. Velikova, W. Voelter. Poster Proteomics analysis of antitumor activity of *Helix* and *Rapana* hemocyanins. First Balkan Conference on Personalized Medicine 26-27.10.2017, Sofia, Bulgaria.
  58. R. Velikova, L. Velkova, A. Dolashki, P. Dolashka. Structure and conformational stability of hemocyanin from garden snail *Cornu aspersum*. XV Национална конференция с

международно участие „Природни науки 2017“ (NCNS2017) 29.09.2017 - 01.10.2017, Варна, България.

59. P. Dolashka, D. Kowalewski, A. Dolashki, S. Stevanovic, P. Hristova and W. Voelter. Bioactive peptides isolated from the hemolymph of arthropodan crab *Eriphia verrucosa*. 7-th Bulgarian Peptide Symposium 10 – 12.06. 2016, Blagoevgrad, Bulgaria.
60. A. Dolashki, W. Voelter, P. Dolashka and B. Lieb. Intact and chemically modified functional unit-e of molluscan *Helix* hemocyanin. 7-th Bulgarian Peptide Symposium 10 – 12.06.2016, Blagoevgrad, Bulgaria.
61. R. Velikova, P. Dolashka, A. Dolashki, Tch. Vasilev, A. Pashov. Mass spectrometry analysis of immunoglobulin at different conditions. 7-th Bulgarian Peptide Symposium 10-12.06.2016, Blagoevgrad, Bulgaria.
62. L. Velkova, P. Dolashka. Identification of glycosylated sites in  $\beta$ c-structural subunit of *Helix lucorum* hemocyanin ( $\beta$ c-HIH) using analysis of glycopeptides by mass spectrometry. P 55. 7-th Bulgarian Peptide Symposium. 10-12.06.2016, Blagoevgrad, Bulgaria.
63. A. Dolashki, L. Velkova, P. Dolashka. Mass spectrometric analyses of bio-antioxidants:peptides and glycoproteins”, “First International Conference on Bio-antioxidants” 25-29.07.2017, Sofia, Bulgaria.
64. A. Nissimova, A. Dolashki, L. Velkova, P. Dolashka. Structure and antibacterial activity of glycopeptide, isolated from snail *Cornu aspersum*. “First International Conference on Bio-antioxidants” 25-29.06.2017, Sofia, Bulgaria.
65. R. Velikova, L. Velkova, A. Dolashki, P. Dolashka. Structure and stability of peptides and hemocyanin from garden snail *Cornu aspersum* „First International Conference on Bio-antioxidants (ICBA2017) 25-29.07.2017, Sofia, Bulgaria.
66. Y. Voynikov, R. Abrashev, N. Kostadinova, E. Krumova, A. Dolashki, L. Velkova, P. Dolashka. Antioxidant Screening of Peptides Isolated from the Hemolymph of Garden Snail *Cornu aspersum*. “Biomedicine and Quality of Life” Conference 26-26.07.2017, Sofia, Bulgaria.
67. A. Nissimova, A. Dolashki, L. Velkova, P. Dolashka. Antibacterial Activity of Peptides from Snail *Cornu aspersum*. “Biomedicine and Quality of Life” Conference 26-26.07.2017, Sofia, Bulgaria.
68. R. Velikova, L. Velkova, A. Dolashki, P. Dolashka. Structure and Stability of Hemocyanin and Peptides from Garden Snail *Cornu aspersum*. “Biomedicine and Quality of Life” Conference 26-26.07.2017, Sofia, Bulgaria.
69. P. Dolashka, A. Dolashki. Successful collaboration for more than 25 years. Bioactive peptides and glycoproteins. Bioactive Peptides and Proteins. Tübingen, Germany 14-16.07. 2017 г.
70. Y. Voynikov, A. Dolashki, P. Hristova, S. Stevanovic, E. Krumova, J. Miteva-Staleva, M. Angelova, P. Dolashka. Antimicrobial activities of fractions from the mucus of garden snail *Cornu aspersum*. 10th Balkan Congress of Microbiology, Microbiologia Balkanica’ 2017 Sofia, Park Hotel Moskva, November 16th – 18th, 2017, Sofia, Bulgaria.
71. L. Velkova, A. Dolashki, L. Molin, P. Traldi, Y. Voinikov, R. Velikova, W. Voelter, P. Dolashka. Antimicrobial activity of proteins and peptides isolated from extract of the garden snail *Cornu aspersum*. 10th Balkan Congress of Microbiology, Microbiologia Balkanica’ 2017, Sofia, Park Hotel Moskva, November 16th – 18th, 2017, Sofia, Bulgaria.
72. R. Velikova, L. Velkova, A. Dolashki, P. Dolashka. AntM-39 Antimicrobial properties of molluscan hemocyanins. 10th Balkan Congress of Microbiology, Microbiologia Balkanica’ 2017 Sofia, Park Hotel Moskva, November 16th – 18th, 2017, Sofia, Bulgaria.
73. R. Velikova, A. Dolashki, A. Stenzl, S. Stevanovic, W.K. Aicher, J. Van Beeumen, L. Velkova, W. Voelter, P. Dolashka. Proteomics analysis of antitumoractivity of *Helix* and *Rapana* hemocyanins.

9th International Conference and Expo on Molecular Medicine Proteomics & Bioinformatics  
November 13 - 15, 2017 Paris, France.

74. L. Velkova, A. Dolashki, Y. Voinikov, R. Velikova, E. Daskalova, Y. Topalova, P. Hristova, E. Krumova, J. Miteva-Staleva, M. Angelova, P. Dolashka. Antibacterial and antifungal activity of mucus extracts from garden snail *Cornu aspersum*. (Lecture) "Ecology and health" XVII-the National Scientific conference with international participation, 7 June 2018, Plovdiv, Bulgaria.
75. P. Dolashka, L. Velkova, A. Dolashki, Y. Voynikov, R. Velikova, E. Daskalova, Y. Topalova, P. Hristova. Proteomic assay of *Propionibacterium acnes* treatment with mucus extract from garden snail *Cornu aspersum*. (Poster) "Ecology and health" XVII-th National Scientific conference with international participation, 7 June 2018, Plovdiv, Bulgaria.
76. L. Velkova, Y. Voynikov, A. Dolashki, L. Tancheva, L. Alova, W. Voelter, P. Dolashka. Proteomic analyses of brain homogenate and cerebrospinal fluid of an experimental animal model (rat). (Poster) "Ecology and health" XVII-the National Scientific conference with international participation, 7 June 2018, Plovdiv, Bulgaria.
77. Y. Topalova, E. Daskalova, N. Zheleva, M. Belouhova, P. Dolashka. Effects of peptide fraction (MW 10), isolated from *Cornu aspersum* mucus, on *Escherichia coli* with the participation of nanodiamonds. (Lecture) XVII-th National Scientific conference with international participation, 7 June 2018, Plovdiv, Bulgaria.
78. P. Dolashka, A. Dolashki, L. Velkova. From science to business. Opening Lecture, 2nd International Conference on Bio-antioxidants, 07 – 10 September 2018, Varna, Bulgaria.
79. P. Dolashka, A. Dolashki, L. Velkova, B., Devreese Y. Topalova, P. Hristova, J. Van Beeumen, W. Voelter. Food supplements with novel bioactive extracts from garden snails. (Lecture), 2-nd International Conference on Bio-antioxidants, 07 – 10 September 2018, Varna, Bulgaria.
80. L. Velkova, A. Dolashki, R. Velikova, P. Dolashka. Identification of peptides and glycopeptides with antimicrobial activity from garden snail *C. aspersum* using mass spectrometry. (Lecture), 4-th Glycobiology World Congress, 17-19 September 2018, Rome, Italy.
81. R. Abrashev, E. Krumova, A. Dolashki, N. Kostadinova, J. Miteva-Staleva, L. Velkova, B. Spasova, M. Angelova, P. Dolashka. *Cornu aspersum* - derived peptides with biological activity. (Poster), 4-th Glycobiology World Congress, 17-19 September 2018, Rome, Italy.
82. N. Kostadinova, P. Dolashka, E. Krumova, L. Velkova, A. Dolashki, R. Abrashev, J. Miteva-Staleva, B. Spasova, M. Angelova. Mucus from *Cornu aspersum* – a perspective resource of antioxidant substances. 14th Congress of Microbiologists in Bulgaria with International Participation, October 10th – 13th, 2018, Hisarya, Bulgaria.
83. E. Daskalova, N. Zheleva, M. Belouhova, I. Schneider, Y. Topalova, P. Dolashka. Effects of the peptide fraction (MW-10), isolated from mucus of *Cornu aspersum*, against *Escherichia coli*. (Poster). International Scientific Conference Kliment's Days 2018, Sofia, Bulgaria.

## **X. СПИСЪК НА ЗАБЕЛЯЗАНИТЕ ЦИТАТИ, СВЪРЗАНИ С МАТЕРИАЛА ПО ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

1. Dolashka-Angelova, P., Angelova, M., Genova, L., Stoeva, S., Voelter, W. Novel Cu,Zn superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 110: Isolation and physico-chemical characterization. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 55, 1999a, 2249-2260.

Цитирани са в:

1. E. Ivanova, B. Ivanov. *Experimental Pathology and Parasitology* 4, 49–59, **2000**.
2. G.F. Drevon, J. Hartleib, E. Scharff, H. Ruterjans, A.J. Russell. *Biomacrom.* 2 (3), 664-671, **2001**.
3. Z. Wang, Z. He, Q. Shen, Y. Gu, S. Li, Q. Yuan. *J. Chromat. B* 826 (1-2), 114-121, **2005**.
4. Z. Wang, Z. He, S. Li, Q. Yuan. *Enzyme Microb. Tech.* 36 (7), 862-869, **2005**.

5. S.H. Brown, O. Yarden, N. Gollop, S. Chen, A. Zveibel, E. Belausov, S. Freeman. *Molec. Plant Pathol.* 9 (2), 171-190, **2008**.
6. S. Wang, B. Shao, S. Liu, Pingfan R. *Food Research International* 47 (2), 374-379, **2012**.
7. G.Y. Cheng, J. Liu, M. X. Tao, C. M. Lu, G. Rong Wu. *J. Food Compos. and Analysis* 26, 136-143, **2012**.
8. W. Moon-ai, P. Niyomploy, R. Boonsombat, P. Sangvanich, A. Karnchanatat. *Applied biochemistry and biotechnology* 166 (8), 2138-55, **2012**.
9. M. Kanteev, M. Goldfeder, M. Chojnacki, N. Adir, A. Fishman. *J. of Biol. Inorg. Chemistry* 8, 895-903, **2013**.

**2. Dolashka-Angelova, P., Genova, L., Stoeva, S., Stefanov, B., Angelova, M., Hristova, R., Pashova, S., Voelter, W. Isolation and characterization of a superoxide dismutase from fungal strain *Humicola lutea* 110. *The J. Peptide Res.*, **54**, 4, 1999b, 279-289.**

Цитира се е:

1. I. Ślesak, Z. Miszalski. *Plant Science* 164 (4), 497-505, **2003**.
2. E. Frealle, C. Noel, E. Viscogliosi, D. Camus, E. Dei-Cas, L. Delhaes. *Immunology and Medical Microbiology* 45 (3), 411-422, **2005**.
3. S.H. Brown, O. Yarden, N. Gollop, S. Chen, A. Zveibil, E. Belausov, S. Freeman. *Mol. Plant Path.* 9 (2), 171-190, 2008.
4. S. Wang, B. Shao, S. Liu, Pingfan R. *Food Research International* 47 (2), 374-379, **2012**.
5. F.S. Chambergo, E.Y. Valencia, J.R. Ferreira-Júnior, C.M. Camilo, P.T. Campana. *Int. J. of Biological Macromolecules* 50 (1), 19-24, **2012**.
6. G.Y. Cheng, J. Liu, M. X. Tao, C. M. Lu, G.R. Wu. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26 (1), 136-143, **2012**.

**3. Dolashka-Angelova, P., Hristova, R., Stoeva, S., Voelter, W. Spectroscopic properties of *Carcinus aestuarii* hemocyanin and its structural subunits. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*, **55A**, 14, 1999c, 2927-2934.**

Цитира се в:

1. A.W.J.W. Tepper, L. Bubacco, G.W. Canters. *J. Biol. Chem.* 279 (14), 13425-13434, **2004**.
2. B. Tang, Y. Wang, D. Zhang, H. Zhang. *J. of Mol. Structure* 920 (1-3), 454-458, **2009**.
3. N. Fujieda, A. Yakiyama, S. Itoh. *BBA* 1804 (11), 2128-2135, **2010**.
4. H. Zhang, B. Tang, Y. Wang, D. Zhang, H. Zhang. *Analytical Letters* 14 (12), 2094-2106, **2011**.
5. N.H. Andersen, G. Zoppellaro, L. Bubacco, L. Casella, K.K. Andersson. *Chemistry Letters* 40 (12), 1360-1362, **2011**.
6. M. Khalil, Z. Boubegtiten-Fezoua, N. Hellmann, P. Hellwig. *Phys Chem Chem Phys.* 18 (41), 28732-28739, **2016**.

**4. Dolashka-Angelova, P., Hristova, R., Schuetz, J., Stoeva, S., Schwarz, H., Voelter, W. Structural and spectroscopic studies of the native hemocyanin from *Maia squinado* and its structural subunits. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **56**, 10, 2000a, 1985-1999.**

Цитира се е:

1. T. Szymańska, L. Ossowski, Łankiewicz. *Letters in Peptide Science* 9 (4-5), 193-196, **2002**.
2. A.W.J.W. Tepper, L. Bubacco, G.W. Canters. *J. Biol. Chem.* 279 (14), 13425-13434, **2004**.
3. Q.-Y. Shi, Y.-C. Zheng, J.-S. Ren, X.-G. Qu. *Chemical Research in Chinese Universities* 24 (2), 192-195, **2008**.
4. B. Tang, Y. Wang, D. Zhang, H. Zhang. *J. Mol. Struct.* 920 (28), 454-458, **2009**.

**5. Dolashka, P., Schick, M., Stoeva, S., Voelter, W. Isolation and partial characterization of the N-terminal functional unit of subunit Rth1 from *Rapana thomasiana* grosse hemocyanin. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **32**, 1, 2000b, 529-538.**

Цитира се е:

1. R. Hristova. *Химия и индустрия* 72 (1-2), 9-19, **2001**.
2. A.W.J.W. Tepper, L. Bubacco, G.W. Canters. *J. Biol. Chem.* 279 (14), 13425-13434, **2004**.
3. Q.-Y. Shi, Y.-C. Zheng, J.-S. Ren, X.-G. Qu. *Chemical Research in Chinese Universities* 24 (2), 192-195, **2008**.

4. A. Varshney, B. Ahmad, G. Rabbani, V. Kumar, S. Yadav, R.H. Khan. *Amino Acids*. 39 (3), 899-910, **2010**.

**6. Ali, S. A., Abbasi, A., Stoeva, S., Kayed, R., Dolashka-Angelova, P., Schwarz, H., Voelter, W. Oxygen transport proteins: III. Structural studies of the scorpion (*Buthus indicus*) hemocyanin, partial primary structure of its subunit Bsin1. *Comparative Biochemistry and Physiology - Biochemistry and Molecular Biology*, 126, 2000, 361-376.**

Цитира се в:

1. R. Hristova. *Химия и индустрия* 72 (1-2), 9-19, **2001**.
2. L.I. Sapunova, A.G. Lobanok, I.O. Kazakevich, E.A. Shlyakhotko, A.N. Evtushenkov. *Applied Bioch. and Microb.* 42 (3), 246-251, **2006**.

**7. Dolashka-Angelova, P., Beltramini, M., Dolashki, A., Salvato, B., Voelter, V. Carbohydrate composition of *Carcinus aestuarii* hemocyanin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 389, 2, 2001, 153-158.**

Цитира се в:

1. H.-Y. Chen. Study on biochemical characteristics of hemocyanins in mud crab *Scylla olivacea*. etd-0810106-100344, **2006**.
2. D.J. Harvey. *Mass Spectrom. Rev.* 27 (2), 125-201, **2008**.
3. T. Fan, Y. Zhang, L. Yang, X. Yang, G. Jiang, M. Yu, R. Cong. *Compar. Bioch. Physiol., Part B* 152 (2), 144-149, **2009**.
4. Y.L. Zhang, L.G. Xing, F. Yan, X.W. Huang, Z.H. Du, J. Qiao, Z.Y. Lin, Y.Y. Li. *Chinese J. of Bioch. and Mol. Biology* 25 (7), 655-661, **2009**.
5. V.Matozza, C. Gallo, M. Monari and M. G. Marin. *J. Experimen. Mar. Biol.* 398 (1-2), 18-25, **2011**.
6. V. Matozzo, A. Boscolo, M. G. Marin. *Marine Environm. Research* 89, 21-28, **2013**.
7. E.I. Solomon, D.E. Heppner, E.M. Johnston, J.W. Ginsbach, J. Cirera, M. Qayyum, M.T. Kieber-Emmons, C.H. Kjaergaard, R.G. Hadt, L. Tian. *Chem. Reviews* 114 (7), 3659-853, **2014**.
8. V. Leignel, J.H. Stillman, S. Baringou, R. Thabet, I. Metais. *Envir. Sci. Pollut. Res.* 21, 9129-9144, **2014**.
9. E. D'Agaro, V. Sabbioni, M. Messina, F. Tulli, G. Lippe, M. Stecchini. *Italian Journal of Animal Science* 13 (4), 891-896, **2014**.
10. H. Chen, M. Cao, Q. Cai, R. Gao, L. Zhang, M. Zhu, G. Liu. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology* 14 (2), 240-247, **2014**.
11. P. Pinnow, A. Fabrizius, C. Pick, T. Burmester. *Journal of Compar. Physiology B* 10, 1-8, **2015**.
12. E. Staudacher. *Molecules* 20 (6), 10622-10640, **2015**.

**8. Angelova, M., Dolashka-Angelova, P., Ivanova, E., Serkedjieva, J., Slokoska L., Pashova, S., Toshkova, R., Vassilev, S., Simeonov, I., Hartmann, H.-J, Stoeva, S., Weser, U., Voelter, W. A novel glycosylated Cu/Zn-containing superoxide dismutase: Production and potential therapeutic effect. *Microbiology*, 147, 6, 2001, 1641-1650.**

Цитира се в:

1. T. Amo, H. Atomi, T. Imanaka. *Journal of Bacteriology* 185 (21), 6340-6347, **2003**.
2. D.-C. Li, J. Gao, Y.-L. Li, J. Lu. *Extremophiles* 9 (1), 1-6, **2005**.
3. Z. Wang, Z. He, S. Li, & Q. Yuan. *Enzyme and microbial technology* 36 (7), 862-869, **2005**.
4. Z. Wang, Z. He, Q. Shen, Y. Gu, S. Li, Q. Yuan. *J. of Chroma B* 826 (1-2), 114-121, **2005**.
5. A. Karmali. *Sección biotecnología. Agaricus blazei: Española Noticias de micología* 1, 11, **2005**.
6. M. Isobe, H. Kai, T. Kurahashi, S., Suwan, S. Pitchayawasin-Thapphasaraphong, T. Franz, N. Tani, H. Nishida. *Chem Bio Chem* 7 (10), 1590-1598, **2006**.
7. C. Dellomonaco, A. Amaretti, S. Zanoni, A. Pompei, D. Matteuzzi, M. Rossi. *J. of Industr. Microb. Biotechn.* 34 (1), 27-34, **2007**.
8. F.X. Guo, S.J. E, S.A. Liu, J. Chen, D.C. Li. *Mycologia* 100 (3), 375-380, **2008**.
9. V. Calabrese, C. Cornelius, M. Cavallaro, M. Cambria, M.A. Toscano. *Revista Clínica de Micología* 2, 3-4, **2009**.
10. V. Calabrese, C. Cornelius, M. Cavallaro, M. Cambria, M.A. Toscano. *Clinical J. of Micology* 3 (1), 2-5, **2009**.
11. E. Chorukova. *Bioautomation* 12, 13-20, **2009**.
12. N.N. Song, Y. Zheng, S.J. E, D.C. Li. *J. Microbiol.* 47 (1), 123-130, **2009**.

13. S. Wakadkar, L.-Q. Zhang, D.C. Li, T. Haikarainen, P. Dhavala, A. C. Papageorgiou. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 66, 1089-1092, **2010**.
14. S. Raimondi, D. Uccelletti, A. Amaretti, A. Leonardi, C. Palleschi, M. Rossi. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 86 (3), 871-878, **2010**.
15. X.-Q. Xie, S.-H. Ying, M.-G. Feng. *Enzyme Microb. Tech.* 46, 5, 217-222, **2010**.
16. H. Korekane, A. Korekane, Y. Yamaguchi, M. Kato, Y. Miyamoto, A. Matsumoto, T. Hasegawa, K. Suzuki, N. Taniguchi, T. Ookawara. *Glycog. J.* 28 (3-4), 183-196, **2011**.
17. S. Bafana, Dutt, S. Kumar, P.S. Ahuja. *Crit. Rev. Biotech.* 31 (1), 65-76, **2011**.
18. S. Areekit, P. Kanjanavas, P. Khawsak, A. Pakpitchareon, K. Potivejkul, G. Chansiri, K. Chansiri. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 844-856, **2011**.
19. L.-Q. Zhang, F.-X. Guo, H.-Q. Xian, X.-J. Wang, A.-N. Li, D.-C. Li. *Biotechnol Lett* 33 (6), 1127-1132, **2011**.
20. X. Qin, M. Zhang, J. Qin, S. Yuan, Y. Hou, J. Liu. *Sep. Purif. Technol.* 87, 79-83, **2012**.
21. Q. Xiaorong, Z. Mingjin, Q. Jian, Y. Shiwei, H. Yali, L. Jianzhong. *Separation and purification technology* 87, 79-83, 1383-5866, **2012**.
22. C. Cornelius, M. Cavallaro, M. Scuto, V. Calabrese. *Positive Health* 208, 1, **2013**.
23. Y. Zhu, G. Wang, H. Ni, A. Xiao, H. Cai. *World J Microbiol Biotechnol.* 30 (4), 1347-1357, **2013**.
24. Z. Karahaliloğlu, M. Demirbilek, M. Şam, M. Erol-Demirbilek, N. Sağlam, E.B. Denkbaş. *J. of Appl. Polymer Science* 128 (3), 1904-1912, **2013**.
25. W. Wang, T. Ma, B. Zhang, N. Yao, M. Li, L. Cui, G. Li, Z. Ma. *J. Cheng. Science reports* 4, 7284, **2014**.
26. B.Q. Li, X. Dong, N. Li, J.Y. Gao, Q. Yuan, S.H. Fang, F.S. Wang. *Experimental Biology and Medicine* 239 (10), 1366-1379, **2014**.
27. Y. Zhu, H. Li, H. Ni, J. Liu, A. Xiao. *Acta Oceanologica Sinica* 33, 163-169, **2014**.
28. N. Tuteja, P. Mishra, S. Yadav, M. Tajrishi, S. Baral, S.C. Sabat. *BMC Biotechnology* 15, 3, **2015**.
29. G.M. Montero-Morán, J.G. Sampedro, G. Saab-Rincón, M.A. Cervantes-González, J.Á. Huerta-Ocampo, A. De León-Rodríguez, A.P. Barba de la Rosa. *Appl Biochem Biotechnol.* 176 (8), 2328-45, 2015.
30. M. Li, L. Zhu, W. Wang, Springerplus. 5, 241, **2016**.
31. N.C.N. Perera, G.I. Godahewa, J. Lee. *Fish & Shellfish Immunology* 57, 386-399, **2016**.
32. R.K. Gopal, S. Elumalai. *J Prob Health* 5, 3, **2017**.

**9. Schütz, J., Dolashka-Angelova, P., Abrashev, R., Nicolov, P., Voelter, W. Isolation and spectroscopic characterization of the structural subunits of keyhole limpet hemocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1546, 2, 2001, 325-326.**

Цитира се в:

1. R. Hristova. *Химия и индустрия* 72 (1-2), 9-19, **2001**.
2. B.A. de Noya, C. Colmenares, O. Noya. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 20, 163-171, **2001**.
3. R. Favilla, M. Goldoni, A. Mazzini, P. Di Muro, B. Salvato, M. Beltramini. *BBA* 1597 (1), 42-50, **2002**.
4. A.W.J.W. Tepper, L. Bubacco, G.W. Canters. *Biol. Chem.* 279 (14), 13425-13434, **2004**.
5. B. Huang, J. Zhang, J. Xiang. *Crustaceana* 81 (7), 769-780, **2008**.
6. Y. Mizutani, S. Tsuge, K. Shiogama, R. Shimomura, S. Kamoshida, K. Inada, Y. Tsutsumi. *JHC express* 57 (2), 101-11, **2009**.
7. S.A. Ali, Z. Ayub, A. Bano, H. Fatima, *Pakistan J. Zool* 43 (6), 1085-1093, **2011**.
8. X. Tu, J. Wang, K. Hao, D.W. Whitman, Y. Fan, G. Cao, Z. Zhang. *Scientific Reports* 5, 19 11402, **2015**.
9. Y. Fan, H. Chen, G. Zeng, J. Liu, J. Xue, Y. Wu, X. Li. *Med chem (Los Angeles)* 6, 395-398, **2016**.

**10. Dolashka-Angelova, P., Schwarz, H., Dolashki, A., Stevanovic, S., Fecker, M., Saeed, M., Voelter, W. Oligomeric stability of *Rapana venosa* hemocyanin (RvH) and its structural subunits. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1646(1-2) 2003a, 77-85.**

Цитира се в:

1. B. Lieb, V. Boisguérin, W. Gebauer, J. Markl. *J. Mol. Evol.* 59 (4), 536-545, **2004**.
2. P. De Ioannes, B. Moltedo, H. Oliva, R. Pacheco, F. Faunes, A.E. De Ioannes, M.I. Becker. *J. of Biol. Chem.* 279 (25), 26134-26142, **2004**.
3. A. Varshney, B. Ahmad, G. Rabbani, V. Kumar, S. Yadav, R.H. Khan. *Amino acid* 39 (3), 899-910, **2010**.

4. F. Spinozzi, P. Mariani, I. Mičetić, C. Ferrero, D. Pontoni, M. Beltramini. *PLOS ONE* 11 (7), e49644, **2012**.
5. C.J. Bolton, R. Bayer, R. Bushway, S. Collins, B. Perkins. *J. of Shellfish Research* 33, 11-17, **2014**.
6. N.T. Zanjania, A.L. Cunningham, F. Dehghani, M.M. Saksen. *Current Medicinal Chemistry* 24, **2017**.

**11. Dolashka-Angelova, P., Beck, A., Dolashki, A., Beltramini, M., Stevanovic, S., Salvato, B., Voelter, W. Characterization of the carbohydrate moieties of the functional unit RvH1-a of *Rapana venosa* haemocyanin using HPLC/electrospray ionization MS and glycosidase digestion. *Biochemical Journal*, **374**, **1**, **2003b**, **185-192**.**

*Lumupa ce e:*

1. J. Wiley & Sons, *J. Mass Spectrom.* 39 (1), 99-108, **2004**.
2. K. Idakieva, S. Stoeva, W. Voelter, C. Gielens. *Comp. Biochem. Phys.B* 138, 221–228, **2004**.
3. M. Gutternigg, K. Ahrer, H. Grabher-Meier, S. Burgmayr, E. Staudacher. *Eur. J. Biochem.* 271 (7), 1348-1356, **2004**.
4. C. Gielens, K. Idakieva, V. Van den Bergh, N.I. Siddiqui, K. Parvanova, F. Compennolle. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 331 (2), 562-570, **2005**.
5. M. Gutternigg, S. Burgmayr, G. Poltl, J. Rudolf, E. Staudacher. *Glycoconjugate J.* 24 (8), 475-489, **2007**.
6. N.I. Siddiqui, K. Idakieva, B. Demarsin, L. Doumanova, F. Compennolle, C. Gielens. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 361 (3), 705-711, **2007**.
7. D.J. Harvey. *Mass Spectrom. Rev.* 28, 273-361, **2008**.
8. E. Staudacher, H. Stepan, M. Gutternigg. *Curr Top Biochem Res.* 11 (2), 29–39, **2009**.
9. M. Patky, C. Huhn. *Bioanalytical Reviews* 2, 115-155, **2010**.
10. H. Stepan, Ch. Bleckmann, H. Geyer, R. Geyer, E. Staudacher. *Carbohydr. Res.* 345 (10), 1504-1507, **2010**.
11. A.M. Martin, G.G. Martin, R. Butler, S.K. Goffredi. *Invert. Biol* 130 (4), 302–312, **2011**.
12. O. Levy-Ontman, S. Arad, D.J. Harvey, T.B. Parsons, A. Fairbanks, Y. Tekoah. *J. Biol. Chem.* 286 (24), 21340-21352, **2011**.
13. B. Schiller, A. Hykollari, S. Yan, K. Paschinger, I.B.H. Wilson. *Biological Chemistry* 393 (8), 661-673, **2012**.
14. E. Staudacher. *Biological Chemistry* 393 (8), 675-685, 2012.
15. S. Arancibia, F. Salazar, M. I. Becker. *Bladder Cancer – From Basic Science to Robotic Surgery.* 221-243, **2012**.
16. S. Kurz, J. Chunsheng, A. Hykollari, D. Gregorich, B. Giomarelli, R. Vasta, I. B. H. Wilson, K. P. Gerardo. *J. Biol. Chem.* 288 (34), 24410-24428, **2013**.
17. N.T. Zanjani, M.M. Saksena, F. Dehghani, A.L. Cunningham. *Curr Med Chem.* 25 (20), 2292-2303, **2018**.

**12. Dolashka-Angelova, P., Stevanovic, S., Dolashki, A., Angelova, M., Serkedjieva, J., Krumova, E., Pashova, S., Zacharieva, S., Voelter, W. Structural and functional analysis of glycosylated Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, **4**, **2004a**, **1006-1016**.**

*Lumupa ce e:*

1. Z. Wang, Z. He, Q. Shen, Y. Gu, S. Li, Q. Yuan. *J. Chromat. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 826 (1-2), 114-121, **2005**.
2. Z. Wang, Z. He, S.Li, Q. Yuan. *Enz. Microb. Technol.* 36 (7), 862-869, **2005**.
3. M. Isobe, H. Kai, T. Kurahashi, S. Suwan, S. Pitchayawasin-Thapphasaraphong, T. Franz, N. Tani, H. Nishida. *Chem. Bio. Chem.* 7 (10), 1590-1598, **2006**.
4. Z.S. Wang, Y.X. Gu, Q.S. Yuan. *Current Microbiol.* 52 (1), 74-79, **2006**.
5. Z.S. Wang, Z.J. He, S.X. Li, Q.S. Yuan. *Chin. Pharma. J.* 41 (22), 1753-1756, **2006**.
6. O.C. Lima, G. Larcher, P. Vandeputte, A. Lebouil, D. Chabasse, P. Simoneau, J-P. Bouchara. *Microbes Infect.* 9, 558-565, **2007**.
7. D.J. Harvey. *Mass Spect. Rev.* 28, 273– 361, **2009**.
8. S.A.G. Echauri, M. Gidekel, A.G. Moraga, L.G. Ordonez, J.A.R. Contreras, A.P. Barba de la Rosa, A. De Leon Rodriguez. *Process Biochem.* 44 (9), 969-974, **2009**.
9. H.H. Xu, H. Ma, B.-Q. Hu, D.B. Lowrie, X.-Y. Fan, C-G. Wen. *Fish & Shellfish Immunol.* 29 (4), 615-622, **2010**.
10. S. Ali, Z. Huang, Sh. Ren. *Biol. Trace Element Research* 143 (1), 600, **2011**.

11. H. Korekane, A. Korekane, Y. Yamaguchi, M. Kato, Y. Miyamoto, A. Matsumoto, T. Hasegawa, K. Suzuki, N. Taniguchi, T. Ookawara. *Glycoconjugate J.* 28 (3-4), 183-196, **2011**.
12. S. Ali, Z. Wang, S. Ren, Z. Huang. *Biocontrol Sci. Techn.* 21 (12), 1457-1469, **2011**.
13. X. Qin, M. Zhang, J. Qin, S. Yuan, Y. Hou, J. Liu. *Sep. Purif. Technol.* 87, 79-83, **2012**.

**13. Dolashka-Angelova, P., Beck, A., Dolashki, A., Beltramini, M., Salvato, B., Hristova, R., Velkova, L., Voelter, W. Carbohydrate moieties of molluscan *Rapana venosa* hemocyanin. *Micron*, 35, 1-2, 2004b, 101-104.**

Цумупа се е:

1. R.B. King. *Encyclopedia of inorganic chemistry.* 9, 11173, **2005**.
2. H. Decker. Aufl. (Hrsg. R. B. King), Wiley, New York, 1159–1173, **2006**.
3. M. Gutternigg, S. Burgmayr, G. Poltl, J. Rudolf, E. Staudacher. *Glycoconj. J.* 24 (8), 475-489, **2007**.
4. D.J. Harvey. *Mass Spect. Rev.* 28, 273– 361, **2008**.
5. D. Guo, H. Wang, D. Zeng, X. Li, X. Fan, Y. Li. *Parasit. Internat.* 60 (3), 242-246, **2011**.
6. J. Markl. *BBA* 1834 (9), 1840-1852, **2013**.

**14. Stefanov, R., Angelova, M., Stefanova, T., Subev, M., Dolashka, P., Voelter, W., Zachariev, Z.. Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103 improves ram spermatozoa functions in vitro. *Andrologia*, 36, 2, 2004, 51-56.**

Цумупа се е:

1. Z. Wang, Z. He, Q. Shen, Y. Gu, S. Li, Q. Yuan. *J. Chromatography B* 826 (1-2), 114-121, **2005**.
2. Z. Wang, Z. He, S. Li, Q. Yuan. *Enzyme and Microb. Technol.* 36, 862–869, **2005**.
3. V.S.N. La Falci, A.E. Yrjö-Koskinen, A. Fazeli, W.V. Holt, P.F. Watson. *Animal reproduction science* 129 (3), 180-187, **2011**.
4. S.V. Silva, A.T. Soares, A.M. Batista, F.C. Almeida, J.F. Nunes, C.A. Peixoto, M.M.P. Guerra. *Reprod. Domest. Anim.* 46 (5), 874-881, **2011**.
5. S.V. Silva, M.M.P. Guerra. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 35 (4), 370-384, **2011**.
6. M.M. Pessoa Guerra, D. Ribeiro Câmara, E.C. Bento da Silva, S.V. Silva. *Ciência Animal* 22 (1), 354-364, **2012**.
7. F. Soltanpour, G. Moghaddam, R. Asadpour, S.A. Rafat. *Intern. J. of Advanced Biol. and Biom. Research* 3, 732-740, **2014**.
8. A. Santiani, S. Evangelista, N. Sepúlveda, J. Risopatrón, J. Villegas, R. Sánchez. *Theriogenology* 82 (6), 884-889, **2014**.
9. L. Allaia, X. Druartc, M. Öztürkd, A. BenMoulaa, B. Nasserb, B. El Amiria. *Animal Reproduction Science* 175, 1-9, **2016**.
10. S. Evangelista-Vargas, A. Santiani. *Reproduction in Domestic Animals* 52 (5) 819-824, **2017**.

**15. Dolashka-Angelova, P., Dolashki, A., Stevanovic, S., Hristova, R., Atanasov, B., Nicolov, P., Voelter, W. Structure and stability of arthropodan hemocyanin *Limulus polyphemus*. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61, 6, 2005a, 1207-1217.**

Цумупа се е:

1. A.G. Martin, F. Depoix, M. Stohr, U. Meissner, S. Hagner-Holler, K. Hammouti, T. Burmester, J. Markl. *J. Mol. Biol.* 366 (4), 1332-1350, **2007**.
2. B. Huang, J. Zhang, J. Xiang. *Crustaceana* 81 (7), 769-780, **2008**.
3. T. Fan, Y. Zhang, L. Yang 1, X. Yang, G. Jiang, M. Yu, R. Cong. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 152 (2), 144-149, **2009**.
4. B. Tang, Y. Wang, D. Zhang, H. Zhang. *J. Mol. Struct.* 920 (28), 454-458, **2009**.
5. B. Mindykowski, E. Jaenicke, S. Tenzer, S. Cirak, Th. Schweikardt, H. Schild, H. Decker. *Developmental and Comparative* 34 (7), 722-733, **2010**.
6. A. Doyen, L. Beaulieu, L. Saucier, Y. Pouliot, L. Bazinet. *Separ. Purif. Tech.* 78, 321-329, **2011**.
7. K. Idakieva, Y. Raynova, F. Meersman, C. Gielens. *Comp. Bioch. Phys. B* 164 (3), 201-209, **2013**.
8. J.C. Bolton, R. Bayer, R. Bushway, S. Collins, B. Perkins. *J. of Shellfish Research* 33, 11-17, **2014**.
9. G. Marshall, P. Valtchev, F. Dehghani, V.G. Gomes. *J. of Thermal Analysis and Calorim.* 123, 2499-2505, **2016**.
10. M. Velayutham, S.K. Kamanuri, K. Saravanan, A. Munusamy. *Biologia* 71 (2), 176-183, **2016**.



11. M. Khalil, Z. Boubegtiten-Fezoua, N. Hellmann, P. Hellwig. *Physical Chemistry Chemical Physics* 18 (41), 28732-28739, **2016**.

**16. Dolashka-Angelova, P., Dolashki, A., Savvides, S. N., Hristova, R., Van Beeumen, J., Voelter, W., Devreese, B., Weser, U., Di Muro, P., Salvato, B., Stevanovic, S. Structure of hemocyanin subunit CaeSS2 of the crustacean Mediterranean crab *Carcinus aestuarii*. *Journal of Biochemistry*, 138, 3, 2005b, 303-312.**

Lumupa ce e:

1. M. Trabalon, C. Carapito, F. Voinot, J.-M. Martrette, A. Van Dorselaer, C. Gilbert, Bertile. *J. Exper. Zoology Part A* 313 (10), 651-659, **2010**.
2. I. Mičetić, C. Losasso, P.D. Muro, G. Tognon, P. Benedetti, M. Beltramini. *J. of Structural Biology* 171 (1), 1-10, **2010**.
3. F. Yan, Y. Zhang, R. Jiang, M. Zhong, Hu Z, H. Du, J. Lun, J. Chen, Y. Li. *Fish Shellfish Immunol.* 30 (1), 354-60, **2011**.
4. N.H. Andersen, G. Zoppellaro, L. Bubacco, L. Casella, K.K. Andersson. *Chemistry Letters* 40 (12), 1360-1362, **2011**.
5. C.F. Garcia, A. Laino, M. Cunningham. *Spiders: Morphology, Behavior and Geographic Distribution*. (Editor M. Santerre) 71-93, **2013**.
6. P. Pinnow, A. Fabrizius, C. Pick, T. Burmester. *J of Comp. Physiology B* 10, 1-8, **2015**.
7. M. Velayutham, K. Sunil Kumar, S. Karthick, A. Munusamy. *Biologia* 71, 2, 176–183, **2016**.
8. Z. Zhang, F. Wang, C. Chen, Z. Zheng, J.J. Aweya, Y. Zhang. *Immunol Lett.* 192, 42-47, **2017**.

**17. Abrashev, R., Dolashka-Angelova, P., Hristova, R., Stefanova, L., Angelova, M. Role of antioxidant enzymes in survival of conidiospores of *Aspergillus niger* 26 under conditions of temperature stress. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 4, 2005, 902-909.**

Lumupa ce e:

1. A. Erkan, U. Bakir, G. Karakas. *J. Photoch. Photobio. A: Chem.* 184 (3), 313-321, **2006**.
2. S. Nandagopal, B.D.R. Kumari. *American-Eurasian J. Agrie. & Environ. Sci.* 1 (3), 225-228, **2006**.
3. H.L. Chen, C.C. Yen, T.C. Tsai, C.H. Yu, Y.J. Liou, Y.W. Lai, M.L. Wang, C.M. Chen. *J. Agricult. Food Chem.* 54 (21), 8041-8047, **2006**.
4. S. Inouye, K. Uchida, Y. Nishiyama, Y. Hasumi, H. Yamaguchi, S. Abe. *Japan. J. Med. Mycol.* 48 (1), 27-36, **2007**.
5. G.V. Smirnova, N.G. Muzyka, O.N. Oktyabrsky. *J. Therm. Biol.* 32 (6), 321-327, **2007**.
6. H. Hisada, M. Sano, Y. Hata, Y. Abe, M. Machida. *Biosci. Biotech. Biochem.* 72 (1), 48-53, **2008**.
7. Q. Li, L.M. Harvey, B. McNeil. *Proc. Biochem.* 43 (8), 877-881, **2008**.
8. D. Todorova, D. Nedeva, R. Abrashev, K. Tsekova. *Journal of applied microbiology* 104 (1), 178-184, **2008**.
9. Q. Li, L. M. Harvey, B. McNeil. *Critic. Rev. in Biotechn.* 29 (3), 199-213, **2009**.
10. K. Lambou, C. Lamarre, R. Beau, N. Dufour, J.-P. Latge. *Molecular Microb.* 75 (4), 910-923, **2010**.
11. S. Kumar, G.T. Kalyanasundaram, S.N. Gummadi. *Curr. Microbio.* 62 (2), 382-387, **2011**.
12. S-H. Ying, M-G. Feng. *Biol. Cont.* 59 (2), 255-260, **2011**.
13. N. Talebian, M.R. Nilforoushan, E.B. Zargar. *Appl. Surf. Sci.* 258, 547-555, **2011**.
14. D.A. Delgado, A. de Souza Sant'ana, P.R. de Massaguer. *World J Microbiol Biotechnol* 28, 7, 2609-2614, **2012**.
15. J. Chang, Y. Zhang. *Process Biochemistry* 47 (2), 195-200, **2012**.
16. R. Sharma, M. Katoch, N. Govindappa, P.S. Srivastava, K.N. Sastry, G.N. Qazi. *FEMS Microbi. Letters* 327 (1), 33-40, **2012**.
17. K.S. Shin, H.S. Park, Y.H. Kim, J.H. Yu. *J. of Proteomic* 7, 40-52, **2013**.
18. M.A.C. Luna, C.C.S. Cordiero, E.R. Vieira, M.H.M.E. Alves, J.H.E.S. Freitas, K. Okada, G.Maria, C. Takaki, A.E. Nascimento. *Int. J. Mol. Sc.* 14, 2-27. **2013**.
19. M.A.C. Luna, E.R. Vieira, K. Okada, G.M. Campos-Takaki, A.E. Nascimento. *Electronic Journal of Biotechnology* 18, 418–427, **2015**.
20. T. Roukas. *Crit. Rev. Biotechn.* 36 (3), 424-33, **2016**.
21. X.F. Zhang, W. Shen, S. Gurunathan. *Molecules* 21 (6), 7312016, **2016**
22. A. Mukherjee. Book Chapter: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: *Aspergillus* System Properties and Applications 209-214, **2016**.

23. D. Das, A. Chakraborty, S.C. Santra. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India - Section B: Biological Sciences* 87 (2), 571–578, **2017**.
24. C. Paulussen, J.E. Hallsworth, S. Alvarez-Perez, W.C. Nierman, P.G. Hamill, D. Blain, B. Lievens. *Microbial biotechnology* 10 (2), 296-322, **2017**.
25. J.H. Mares, K.P. Gramacho, E.C. Santos, F.C. Alvim, C.P. Pirovani. *BMC Microb.* 17 (1), 176, **2017**.
26. Y. Yuan, L. Ji, Y. Hu, J. Gao, Y. Zhou. *Process Biochemistry* 58, 92-97, **2017**.

**18. Beck, A., Hillen, N., Dolashki, A., Stevanovic, S., Salvato, B., Voelter, W., Dolashka–Angelova, P. Oligosaccharide structure of a functional unit RvH1-b of *Rapana venosa* hemocyanin using HPLC/electrospray ionization mass spectrometry. *Biochimie*, **89**, 8, **2007**, 938-949.**

Lumupa ce e:

1. C. Gielens, K. Idakieva, V. Van den Bergh, N.I. Siddiqui, K. Parvanova, F. Compennolle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 562–570, **2005**.
2. Y.-F. Zhang, S.-L. Ji. *J. Chinese Pharm. Sciences* 43 (15), 1125-1129, **2008**.
3. A. Varshney, B. Ahmad, G. Rabbani, V. Kumar, S. Yadav, R.H. Khan. *Amino Acids.* 39 (3), 899-910, **2010**.
4. Z. Zhang, F. Wang, C. Chen, Z. Zheng, J.J. Aweya, Y. Zhang. *Immunol Lett.* 192, 42-47, **2017**.
5. N.T. Zanjani, M.M. Saksena, F. Dehghani, A.L. Cunningham. *Current Medicinal Chemistry* 25 (20), 2292-2303, **2018**.

**19. Dolashka, P., Stefanovic, S., Dolashki, A., Devreese, B., Tzvetkova, B., Voelter, W., Beeumen, J., Salvato, B. A challenging insight on the structural unit 1 of molluscan *Rapana venosa* hemocyanin. *Archive Biochem. Biophys*, **459**, 1, **2007**, 50-58.**

Lumupa ce e:

1. C. Gatsogiannis, A. Moeller, F. Depoix, U. Meissner, J. Markl. *J. Mol. Biol.* 374 (2), 465-486, **2007**.
2. S. Campello, M. Beltramini, G. Giordano, P. Di Muro, S.M. Marino, L. Bubacco. *Arch. Biochem. Biophys.* 471 (2), 159-167, **2008**.
3. A. Varshney, B. Ahmad, G. Rabbani, V. Kumar, S. Yadav, R.H. Khan. *Amino Acids.* 39 (3), 899-910, **2010**.
4. A. Manubens, F. Salazar, D. Haussmann, J. Figueroa, M. Del Campo, J. Martínez Pinto, L. Huaquín A. Venegas, M. Inés Becker. *Cell Tissue* 342 (3), 423-435, **2010**.
5. M. Palacios, R. Tampe, M. Del Campo, Ta-Ying Zhong, M.N. López, F. Salazar-Onfray, M.I. Becker. *European Journal of Medicinal Chemistry* 150, 74-86, **2018**.
6. J.J. Mora Román, M. Del Campo, J. Villar, F. Paolini, G. Curzio, A. Venuti, L. Jara, J. Ferreira, P. Murgas, A. Lladser, A. Manubens, M. Inés Becker. *Journal of Immunology Research* 2019 (2), 1-19, **2019**.

**20. Krumova, E., Dolashka-Angelova, P., Pashova, S., Stefanova, I., Van Beeumen, J., Vassilev, S., Angelova, M. Improved production by fed-batch cultivation and some properties of Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 4, **2007**, 524-532.**

Lumupa ce e:

1. Y. Bao, L. Li, F. Xu, G. Zhang. *Fish and Shellfish Immunol.* 27 (2), 210-220, **2009**.
2. S.A. Garcia Echaury, M. Gidekel, A.G. Moraga, L.G. Ordonez, J.A. Rojas Contreras, A.P. Barba de la Rosa, A. De Leon Rodriguez. *Proc. Biochem.* 44 (9), 969-974, **2009**.
3. X.-Q. Xie, S.-H. Ying, M.-G. Feng. *Enz. Microb. Technol.* 46 (5), 217-222, **2010**.
4. I. Vangelov, J. Dineva, K. Todorova, S. Hayrabedyan, M.D. Ivanova. *Ovarian Biomarkers in Infertility*. Edited by Dr. E. Abuelzein 8, 102-132, **2012**.
5. A.E. Ünlü, S. Takaç. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 40 (5), 338-344, **2012**.
6. X. Gao, C. He, H. Liu, H. Li, D. Zhu, S. Cai, Y. Xia, Y. Wang, Z. Yu. *Mol Biol Rep.* 39, 10713-10722, **2012**.
7. A. Ezgi Ünlü, S. Takaç. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 31 (5), 1046–1054, **2017**.
8. K. Bhatia, G. Mal, R. Bhar, C. Attri, A. Seth. *Int. J. of Biological Macromolecules* 117, 1133-1139, **2018**.

**21. Sandra, K., Dolashka, P., Devreese, B., Van Beeumen, J. New insights in *Rapana venosa* hemocyanin N-glycosylation resulting from on-line mass spectrometric analyses. *Glycobiology*, **17**, 2, **2007**, 141-156.**

Lumupa ce e:

1. Y. Park, Z. Zhang, T.N. Laremore, B. Li, J.-S. Sim, A.-R. Im, M.Y. Ahn, Y.S. Kim, R.J. Linhardt. *Glycoconj. J.* 25 (9), 863-877, **2008**.
2. S. Amon, A.D. Zamfir, A. Rizzi. *Electrophor.* 29 (12), 2485-2507, **2008**.
3. E. Staudacher, H. Stepan and M. Gutternigg. *Curr Top Biochem Res.* 11 (2), 29–39, **2009**.
4. W. Bragg, S. A. Shamsi. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* 15 SEP, **2010**.
5. A. Varshney, B. Ahmad, G. Rabbani, V. Kumar, S. Yadav, R.H. Khan. *Amino Acids.* 39 (3), 899-910, **2010**.
6. T.F. Gesteira, V.J. Coulson-Thomas, F.T. Ogata, E.H.C. Farias, R.P. Cavalheiro, M.A. de Lima, G.L.A. Cunha, E.S. Nakayasu, I.C. Almeida, L. Toma, H.B. Nader. *BBA* 1814 (12), 1862-1869, **2011**.
7. M. Nakano, K. Kakehi, N. Taniguchi, A. Kondo. *Capill. Electroph. Carbohydr. Chapter 9*, 205-235, **2011**.
8. D.J. Harvey. *Mass Spectrometry Reviews* 31 (2), 183-311, **2012**.
9. N. Liu, L. Zhao, C. He, Z. Cai. *Current Anal. Chem.* 8 (1), 22-34, **2012**.
10. S. Mittermayr, J. Bone, A. Guttman. *Anal. Chem.* 85 (9), 4228–4238, **2013**.
11. B. Eckmair, C. Jin, D. Abed-Nava. K. Paschinger. *Mol Cell Proteomics.* 15 (2), 573-97, **2016**.
12. M. Palacios, R. Tampe, M. Del Campo, T.-Y. Zhong, M.N. López, F. Salazar-Onfray, M.I. Becker. *European Journal of Medicinal Chemistry* 150, 74-86, **2018**.

**22. Hristova, R., Dolashki, A., Voelter, W., Stevanovic, S., Dolashka, P. O-diphenol oxidase activity of molluscan hemocyanins. *Comp. Biochem Physiol.* 149, 3, 2008, 439-446.**

*Lumupa ce 6:*

1. T. Fan, Y. Zhang, L. Yang, X. Yang, G. Jiang, M. Yu, R. Cong. *Compar. Biochem. Physiol. B* 152 (2), 144-149, **2009**.
2. D. Guo, Y. Zhang, D. Zeng, H. Wang, X. Li, Y. Li, X. Fan. *Experim. Parasit.* 123 (3), 277-281, **2009**.
3. K. Idakieva, N. I. Siddiqui, F. Meersman, M. De Maeyer, I. Chakarska, C. Gielens. *Int J Biol Macromol.* 45 (2), 181-187, **2009**.
4. A. Varshney, B. Ahmad, G. Rabbani, V. Kumar, S. Yadav, R.H. Khan. *Amino Acids.* 39 (3), 899-910, **2010**.
5. N. Fujieda, A. Yakiyama, S. Itoh. *Dalton Trans.* 39, 3083–3092, **2010**.
6. N. Fujieda, A. Yakiyama, S. Itoh. *BBA* 1804 (11), 2128-2135, **2010**.
7. J. Alpuche, A. Pereyra, G. Mendoza-Hernández, C. Agundis, C. Rosas, E. Zenteno. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 156 (1), 1-5, **2010**.
8. D. Guo, H. Pan, D. Zeng, Y. Li, X. Li, X. Fan. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 102 (3), 233–236, **2012**.
9. Z. Zhou, D. Ni, M. Wang, L. Wang, L. Wang, X. Shi, F. Yue, R. Liu, L. Song. *Fish & Shellfish Immunol.* 33 (2), 375-81, **2012**.
10. F. Aguilera, C. McDougall, B.M. Degnan. *BMC Evolutionary Biology* 13, 96-98, **2013**.
11. E. Scheil, S. Hilsmann, R. Triebkorn, Heinz. *Results in Immunol.* 3, 73–78, **2013**.
12. Y. Raynova, L. Doumanova, K. N. Idakieva. *Protein J.* 32, 609-618, **2013**.
13. C.J. Coates, J. Nairn. *Dev. Comp. Immunol.* 45 (1), 43–55, **2014**.
14. J. Zhuang, C.J. Coates, H. Zhu, P. Zhu, Z. Wu, L. Xie. *Developm. Comp. Immun.* 49, 96–102, **2015**.
15. N. Fujieda, S. Itoh. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 89, 733-742, **2016**.
16. K. Suwannatrai, A.Suwannatrai, P. Tabsripair, J.U. Welb, S. Tangkawattana, C. Cantacessi, J. Mulvenna, S. Tesana, A. Loukas, J. Sotillo. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (11), e0005104, **2016**.
17. C.J. Coates, H. Decker. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 2, 293-317, **2017**.
18. L. Wang, Y. Ye, V. Lykourinou, J. Yang, A. Angerhofer, Y. Zhao, L.-J. Ming. *Europ. J. of Inorg. Chem.* 42, 4899-4908, **2017**.
19. N.T. Zanjani, M.M. Saksena, F. Dehghani, A.L. Cunningham. *Current Medic Chemistry* 25 (20), 2292-2303, **2018**.

**23. Krumova, E., Dolashki, A., Pashova, S., Dolashka, P., Stevanovic, S., Hristova, R., Stefanova, L., Voelter, W., Angelova, M. Unusual location and characterization of Cu/Zn-containing superoxide dismutase from filamentous fungus *Humicola lutea*. *Arch. Microbiol.*, 189, 2, 2008, 121-130.**

*Lumupa ce 6:*

1. M. Graz, A. Jarosz-Wilkolazka, B. Pawlikowska-Pawlga. *BioMetals* 22 (3), 401-410, **2009**.
2. Q. Li, L.M. Harvey, B. McNeil. *Crit.Rev. Biotech.* 29 (3), 199-213, **2009**.
3. A. Bodył, P. Mackiewicz, R. Milanowski. *J. Parasitol.* 96 (2), 465–475, **2010**.

4. J. Liu, Y.-Y. Gao, X.-Z. Jiang, R.-Y. Mao, B.-Y. Tian, C.-R. Ke, S.-G. Wu, J.-Z. Huang. *Pharmac. Biotechn.* 17 (1), 50-55, **2010**.
5. A. Bafana, S. Dutt, S. Kumar, P.S. Ahuja. *Critic. Rev. Biotechnol.* 31 (1), 65-76, **2011**.
6. H. Li, J. Wang, J. Wang, G. Geng, H. Ju. *African J. of Microbiology* 6 (4), 757-763, **2012**.
7. X. Qin, M. Zhang, J. Qin, S. Yuan, Y. Hou, J. Liu. *Separ. Purif. Technol.* 87, 79-83, **2012**.
8. M. Sturini, C. Girometta, F. Maraschi, E. Savino, A. Profumo. *Bull Environ Contam Toxicol.* 98 (4), 508-512, **2017**.
9. C. Paulussen, J.E. Hallsworth, S. Álvarez-Pérez, W.C. Nierman, P.G. Hamill, D. Blain, H. Rediers, B. Lievens. *Microbial Biotechnology* 10 (2), 296-322, **2017**.

**24. Abrashev, R., Pashova, S., Stefanova, L., Vassilev, S., Dolashka-Angelova, P., Angelova, M. Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. Canadian Journal of Microbiology, 54, 12, 2008, 977-983.**

*Lumupa ce e:*

1. Q. Li, L.M. Harvey, B. McNeil. *Critic. Rev. Biotech.* 29 (3), 199-213, **2009**.
2. C.-G. Zou, Y.-F. Xu, W.-J. Liu, W. Zhou, N. Tao, H.-H. Tu, X.-W. Huang, J.-K. Yang, K.-Q. Zhang. *PLoS One* 5 (10), **2010**.
3. I. Boyadzhieva, E. Emanuilova. *Comptes Rendus de L'Acad. Bulgare des Sci.* 63 (11), 1571-1576, **2010**.
4. S. Buranajitpakorn, A. Piwkam, N. Charoenlap, P. Vattanaviboon, S. Mongkolsuk. *FEMS Microbiol. Lett.* 317 (1), 60-66, **2011**.
5. S.-H. Ying and M.-G. Feng. *Biol. Contol* 59 (2), 255-260, **2011**.
6. J. Chang, Y. Zhang. *Process Biochemistry* 47 (2), 195-200, **2011**.
7. P. Chuaybamroong, C. Thunyasirion, S. Supothina, P. Sribenjalux, C.-Y. Wu. *Chemosphere* 83 (5), 730-735, **2011**.
8. J. Liu, Y. Sui, M. Wisniewski. *Postharvest Biol. Tec.* 65, 61-68, **2012**.
9. A.K. Pavlychenko, N.N. Zhdanova. *Mikologiya i Fitopatologiya - Mycology and Phytopathology* 46 (1), 75-80, **2012**.
10. P.M. Garza-Lo'pez, M. Konigsberg, L.E. Go'mez-Quiroz, O. Loera. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 353-359, **2012**.
11. A.A. Ordaz, E.A. Favela, M.B. Meneses, G.C. Mendoza, O. Loera. *J. Basic Microbiol.* 52 (2), 167-174, **2012**.
12. W. Zhao, M. Wisniewski, W. Wang, J. Liu, Y. Liu. *World J Microbiol Biotechnol.* 30 (3), 951-957, **2013**.
13. D.J. Liu, M. Copland. *PloS One* 8 (8), e72935, **2013**.
14. A. Krastanov, Z. Alexieva, H. Yemendzhiev. *Engineering in Life Sciences* 13 (1), 76-87, **2013**.
15. K-S. Shin, H-S. Park, Y-H. Kim, J-H. Yu. *J. of Proteomics* 11 (87), 40-52, **2013**.
16. F. Shirazi, M.A. Pontikos, T.J. Walsh, N.A. Russell, E. Lewis, D.P. Kontoyiannis. *Antimicrob Agents Chemother.* 57 (9), 4360-4368, 2013.
17. L. Liu, L-K Long Yang, J.Y.X. Xu, C-H Hu, G. Liu. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 2551-2562, **2013**.
18. W-D. Liang, Y-T. Bi, H-Y. Wang, S. Dong, K-S. Li, J-S. Li. *BioMed Research Internat*, **2013**.
19. M.A.C. Luna, C.C.S. Cordeiro, E.R. Vieira, M.H.M.E. Alves, J.H.E.S. Freitas, K. Okada, G.M.C. Takaki, A.E. do Nascimento. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 2-27, **2013**.
20. R.A. Choudhury, N. McRoberts, W.D. Gubler. *Phytopathologia Mediterranea* 53 (1), 14, **2014**.
21. A.P. Del Vesco, E. Gasparino, D.O. Grieser, V. Zancanela, F.R.S. Gasparin, J. Constantin, A.R. Oliveira Neto. *J. of Animal Science*, 92 (2), 806-815, **2014**.
22. W. Zhao, M. Wisniewski, W. Wang, J. Liu, Y. Liu. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30 (3), 951-957, **2014**.
23. R.F. Azevedo, R.K. Souza, G.U. Braga, D.E. Rangel. *Fungal Biology* 118, 990-995, **2014**.
24. N. Garcia-Ortiz, S. Tlecuil-Beristain, E. Favela-Torres, O. Loera. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99 (6), 2783-2791, **2015**.
25. T. Futagami, K. Mori, S. Wada, H. Ida, Y. Kajiwara, H. Takashita, M. Goto. *Applied and environmental microbiology* 81 (4), 1353-1363, **2015**.
26. J. Li, R.Y. Qin, H. Li, R.F. Xu, C.H. Qiu, Y.C. Sun, H. Ma, Y.C. Yang, D.H. Ni, L. Li, P.C. Wei, J.B. Yang. *Plant Science* 233, 22-31, **2015**.
27. X. Tianpei, Z. Mao, Y. Zhu, S. Li. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 176, 625-635, **2015**.
28. M.A.C. Luna, E.R.Vieira, K. Okada, G.M. Campos-Takaki, A.E. do Nascimento. *Electronic Journal of Biotechnology* 18 (6), 418-427, **2015**.

29. T. Roukas. *Crit Rev Biotechnol.* 36 (3), 424-33, **2016**.
30. Y. Sui, M. Wisniewski, S. Droby, J. Norelli, J. Liu. *Trends in Food Science & Technology* 51, 34-40.
31. F. Miranda-Hernández, P.M. Garza-López, O. Loera. *Biological Control* 103, 196-203, **2016**.
32. G. Li, H. Zhao, H. Wang, X. Guo, X. Guo, Q. Sun, B. Xu. *PLOS one* 11 (2), e0149117, **2016**.
33. C. Paulussen, J.E. Hallsworth, S. Álvarez-Pérez, W.C. Nierman, P.G. Hamill, D. Blain, H. Rediers, B. Lievens. *Microb Biotechnol.* 10 (2), 296-322, **2017**.
34. L.J. Zhang, J.L. Chen, B.L. Yang, D. Bourguet, G. Wu. *Bulletin of Entomological Research* 107 (4), 513-526, **2017**.
35. J. Liu, Y. Sui, M. Wisniewski, Z. Xie, Y. Liu, Y. You. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 31, 1-7, **2017**.
36. A.P. Del Vesco, E. Gasparino, V. Zancanela. *J. of Animal Physiology and Animal Nutrition* 101 (1), 170-179, **2017**.
37. E.A. Lilleskov. *Fungal Ecology* 27, 24-35, **2017**.

**25. Dolashka-Angelova, P., Stefanova, T., Livaniou, E., Velkova, L., Klimentzou, P., Stevanovic, S., Salvato, B., Neychev, H., Voelter, W. Immunological potential of *Helix vulgaris* and *Rapana venosa* hemocyanins. *Immunological Investigations*, 37, 8, 2008, 822-840.**

Lumupa ce e:

1. S.A. Zunino, C.E. Morales, M. Del Campo, M.I. Becker. *Journals of Immunotherapy* 33 (8), 891-891, **2010**.
2. S. Arancibia, M. Del Campo, E. Nova, F. Salazar, M.I. Becker. *Eur. J. Immun.* 42 (3), 688-99, **2012**.
3. S. Arancibia, F. Salazar, M.I. Becker. *Bladder Cancer from Basic Science to Robotic Surgery* 221-243, **2012**.
4. A.E. Scheil, S. Hilsmann, R. Triebkorn, H.-R. Köhlera. *Results in Immunol.* 3, 73-78, **2013**.
5. N.T. Zanjani, F. Sairi, G. Marshall, M.M. Saksena, P. Valtchev, V.G. Gomes, A.L. Cunningham, F. Dehghani. *Europ. J. of Pharmac. Sciences* 53, 77-85, **2014**.
6. S. Arancibia, C. Espinoza, F. Salazar, M. Del Campo, R. Tampe, T.Y. Zhong, P. De Ioannes, B. Moltedo, J. Ferreira, E.C. Lavelle, A. Manubens, A.E. De Ioannes, M.I. Becker. *Plos One* 9 (1), 87240, **2014**.
7. C.J. Coates, J. Nairn. *Dev. Comp. Immunol.* 45, 43-55, **2014**.
8. J.W. Chen, Q.H. Wu, D.C. Rowley, A.M. Al-Kareef, H. Wang. *J Asian Nat Prod Res.* 17 (2), 199-216, **2015**.
9. S.B. Natarajan, Y.S. Kim, J.W. Hwang, P.J. Park. *RSC Advances*, 6 (31), 26163-26177, **2016**.
10. J. Altaf, M.H. Rasool, S. Akhtar, M. Manzoor, T. Younas, B. Ansari, G. Ahmad, F. Jabeen, M. Ali, R. Munir. *Pak J Pharm Sci.* 31, 1555-1563, **2018**.
11. R. Ishwarya, B. Vaseeharan, R. Jayakumar, V. Ramasubramanian, M. Govindarajan, N.S. Alharbi, J.M. Khaled, M.N. Al-anbr, G. Benelli. *Aquaculture* 489, 130-140, **2018**.

**26. Dolashki, A., Abrashev, R., Stevanovic, S., Stefanova, L., Ali, S., Velkova, L., Hristova, R., Angelova, M., Voelter, W., Devreese, B., Van Beeumen, J., Dolashka-Angelova, P. Biochemical properties of Cu/Zn-superoxide dismutase from fungal strain *Aspergillus niger* 26. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71, 3, 2008a, 975-983.**

Lumupa ce e:

1. Y. Bao, L. Li, F. Xu, G. Zhang. *Fish and Shellfish Immunol.* 27 (2), 210-220, **2009**.
2. J. Liu, Y.-Y. Gao, X.-Z. Jiang, R.-Y. Mao, B.-Y. Tian, C.-R. Ke, S.-G. Wu, J.-Z. Huang. *Pharmac. Biotechn.* 17 (1), 50-55, **2010**.
3. F. Yan, G. Yan, S. Lv, N. Shen, Y. Mu, T. Chen, P. Gong, Y. Xu, L. Lv, J. Liu, J. Shen, G. Luo. *Intern. J. of Biochem. and Cell Biology* 43 (12), 1802-1811, **2011**.
4. S. Silva, S. Martins, A. Karmali, E. Rosa. *J. of the Science of Food and Agricult.* 92 (9), 1826-1832, **2012**.
5. X. Gao, C. He, H. Liu, H. Li, D. Zhu, S. Cai, Y. Xia, Y. Wang, Z. Yu. *Mol. Biol. Rep.* 39 (12), 10713-10722, **2012**.
6. F. Spinozzi, P. Mariani, I. Mičetić, C. Ferrero, D. Pontoni, M. Beltramini. *PLOS ONE* 7 (11), e49644, **2012**.
7. N. Umasuthan, S.D.N.K. Bathige, K.S. Revathy, Y. Lee, I. Whang, C.Y. Choi, H.-C Park, J.Lee. *Fish & Shellfish Immunology* 33 (4), 753-765, **2012**.
8. I. Hornyák, K. Marosi, L. Kiss, P. Gróf, Z. Lacza. *Free Radical Research* 46 (2), 214-25, **2012**.
9. N. Umasuthan, S.D. Bathige, W.S. Thulasitha, W. Qiang, B.S. Lim, J. Lee. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry Molecular Biology* 176, 18-33, **2014**.

10. M. Montibus, L. Pinson-Gadais. *Journal Critical Reviews in Microbiology* 41 (3), 295-308, **2015**.
11. N.C.N. Perera, G.I. Godahewa, S. Lee, et al. *Fish and Shellfish Immunology* 68, 435-442, **2017**.
12. N.C.N. Perera, G.I. Godahewa, B.H. Nam, J.Y. Park, J. Lee. *Fish & Shellfish Immunology* 80, 31-45, **2018**.
13. D.M.K.P. Sirisena, N.C.N. Perera, G.I. Godahewa, H. Kwon, H. Yang, B.H. Nam, J. Lee. *Fish Shellfish Immunol.* 84, 73-82, **2019**.

**27. Dolashki, A., Velkova, L., Atanasov, B., Voelter, W., Stevanovic, S., Schwarz, H., Di Muro, P., Dolashka-Angelova, P. Reversibility and “pH-T phase diagrams” of *Rapana venosa* hemocyanin and its structural subunits. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1784, 11, 2008b, 1617-1624.**

*Lumupa ce e:*

1. B. Tang, Y. Wang, D. Zhang, H. Zhang. *J. of Molecul. Struct.* 920 (28), 454-458, **2009**.
2. A. Varshney, B. Ahmad, G. Rabbani, V. Kumar, S. Yadav, R.H. Khan. *Amino Acids.* 39 (3), 899-910, **2010**.
3. K. Idakieva, F. Meersman, C. Gielens. *Biochim. et Bioph. Acta - Proteins and Proteomics* 1824 (5), 731-738, **2012**.
4. S. Schenk, J. Schmidt, U. Hoeger, H. Decker. *Biochim Biophys Acta.* 1854 (8), 939-949, **2015**.

**28. Krumova, E., Pashova, S., Dolashka-Angelova, P., Stefanova ,T., Angelova, M. Biomarkers of oxidative stress in the fungal strain *Humicola lutea* under copper exposure. *Process Biochemistry*, 44, 3, 2009, 288-295.**

*Lumupa ce e:*

1. K. Paraszkiwicz, P. Bernat, M. Naliwajski, J. Długoński. *Arch. Microbiol.* 192 (2), 135-141, **2010**.
2. B-Y. Sun, S-H Kan, Y-Z. Zhang, S-H. Deng, J. Wu, H. Yuan, H. Qi, G. Yang, L. Li, X-H. Zhang, H. Xiao, Y-J. Wang, H. Peng, Y-W. Li. *J. Hazard. Mater.* 183 (1-3), 833-8, **2010**.
3. L. Cerioni, S.I. Volentini, F.E. Prado, V.A. Rapisarda, L. Rodríguez-Montelongo. *J. of Applied Microbiol.* 109 (4), 1441-1449, **2010**.
4. Y-C. Lin, E.M. Leaño, K-L. Pang. *Botan. Marina* 53 (6), 581–586, **2010**.
5. D.J. Li, H-I. Li, H.Z. Ji-cheng, H. Wei-dong. *Liquor-Making Science & Technol.* 6, **2010**.
6. S. Ali, Z. Huang, S. Ren. *Biol. Trace Element Research.* 143 (1), 600, **2011**.
7. J. Du, H. Li, H-L Li, J-C Zhan, W. Huang. *Scientia Agricultura Sinica* 44 (2), 369-378, **2011**.
8. M. Wangwang, Z. Lu, H. Min. *Ecotoxicology around the Globe. Chapters* 179-194, **2011**.
9. Sh. Liao, J. Guo, F. Wang, Z. Song, R. Wang, S. Tang. *Acta Scientiae Circumstantiae* 1, 213-223, **2012**.
10. F. Cen, Y. Hu, H. Xu. *Asian Journal of Chemistry* 24 (10), 4679-4685, **2012**.
11. P. Patra, S. Mitra, N. Debnath, A. Goswami. *Langmuir.* 28 (49), 16966-16978, **2012**.
12. O.M. Gomaa, K.S. Azab. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 6, 49-55, **2013**.
13. Y.H. Diao, T. Li, Z.W. Zhao. *J. of Environm. Protection* 4, 12-19, **2013**.
14. F. Martins, J.A. Pereira, P. Baptista. *Pest Manag Sci.* 70 (8), 1220-1227, **2014**.
15. P. Patra, S. Roy, S. Sarkar, S. Mitra, S. Pradhan, N. Debnath, A. Goswami. *Applied Nanoscience* 5, 7, 857–866, **2015**.
16. J. Wan, G. Zeng, D. Huang, C. Huang, C. Lai, N. Li, Z. Wei, P. Xu, X. He, M. Lai, Y. He. *Appl Biochem Biotechnol.* 175 (4), 1981-1991, **2015**.
17. W. Zhao, J. Han, D. Long. *Annals of Microbiology* 65, 3, 1505–1514, **2015**.
18. M. Zhao, C Zhang, G. Zeng, D. Huang, P. Xu, M. Cheng. *Chemosphere* 138, 560-567, **2015**.
19. C. Civardi, M. Schubert, A. Fey, P. Wick, F.W.M.R. Schwarze. *Plos One*, 10, 11, **2015**.
20. D.D. Long, R.R. Fu, J.R. Han. *Folia Microbiologica* 62 (4), 295-304, **2017**.

**29. Nedeva, T., Dolashka-Angelova, P., Moshtanska, V., Voelter, W., Petrova, V., Kujumdzieva, A. Purification and partial characterization of Cu/Zn superoxide dismutase from *Kluyveromyces marxianus* yeast. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877, 29, 2009, 3529-3536.**

*Lumupa ce e:*

1. S. Raimondi, D. Uccelletti, A. Amaretti, A. Leonardi, C. Palleschi, M. Rossi. *Appl. Microbiol. Biotech.* 86 (3), 871-878, **2010**.
2. N. Jiang, X. Liu, J. Yang, Z. Li, J. Pan, X. Zhu. *FEMS Yeast Research* 11 (5), 440-448, **2011**.

3. C. Bing, K-C Lil, C. Bi-Lian, Y-X. Zhang, Y. Jun, Y. Su-Yu, P-L Liu, X. Rui. *Science and Techn. of Food Ind.* 12, 123-125, **2011**.
4. S. Wang, B. Shao, S. Liu, R. Pingfan. *Food Research Intern.* 47 (2), 374-379, **2012**.
5. X. Qin, M. Zhang, J. Qin, S. Yuan, Y. Hou, J. Liu. *Sep. Purif. Technol.* 87, 79-83, **2012**.
6. F. Shen, L. Peng, L. Lin, Y. Zhang, J. Wu, X. Zhang, S. Deng. *J. of Biobased Mater. Bioen.* 6 (5), 580-587 **2012**.
7. M.A. Ibrahim, M.M. Mohamed, A-H.M. Ghazy, H.M.M. Masoud. *Comp.Biochem.Physiol. B* 164 (3), 221-228, **2013**.
8. J. Simental-Martínez, R.R. Vennapusa, J. Benavides, V. Ganeva, B. Galutzov, M. Rito-Palomares, M. Fernández-Lahore. *J. of Chemi. Technol. and Biotech.* 88 (8), 1498–1505, **2013**.
9. P. Mishra, A. Dix, M. Ray, S. Chandra Sabat. *Biochimie* 97, 181-193, **2014**.
10. X.-L. Yao, S.-L. Xiong, X.-J. Zhang. *Modern Food Science and Technol.* 30, 2223-2278, **2014**.
11. J. Simental-Martínez, M. Rito-Palomares, J. Benavides. *Biotechnology Progress* 30 (6), 1326-34, **2014**.
12. N. Tuteja, P. Mishra, S. Yadav, M. Tajrishi, S. Baral and S. Chandra Sabat. *BMC Biotechnol.* 15, 3, **2015**.
13. D.J. Harvey. *Mass spectrometry reviews* 36, 3, 255–422, **2015**.
14. V. Ganeva, D. Stefanova, B. Angelova, B. Galutzov, I. Velasco, M. Arévalo-Rodríguez. *J. of Biotechnology* 211, 12-19, **2015**.
15. A. Ceugniet, M. Turret, E. Dussert, F. Coucheney, B. Deracinois, P. Jacques, C. Flahaut, E. Heuson, D. Drider, J. Behra-Miellet. *LWT - Food Science and Technology* 81, 281-290, **2017**.
16. D.J. Harvey. *Mass spectrometry reviews* 36, 3, 255–422, **2017**.

**30. Dolashka-Angelova, P., Lieb, B., Velkova, L., Heilen, N., Sandra, K., Nikolaeva-Glomb, L., Galabov, A. S., Van Beeumen, J., Stevanovic, S., Voelter, W., Devreese, B. Identification of glycosylated sites in Rapana hemocyanin by mass spectrometry and gene sequence, and their antiviral effect. *Bioconjugate Chemistry*, 20, 7, 2009, 1315-1322.**

#### Lumupa ce e:

1. M. Trabalon, C. Carapito, F. Voinot, J.-M. Martrette, A. Van Dorsselaer, C. Gilbert, F., Bertile. *J. of Exper. Zoo. Part A* 313 (10), 651-659, **2010**.
2. A. Manubens, F. Salazar, D. Haussmann, J. Figueroa, M. Del Campo, J.M. Pinto, L. Huaquín, A. Venegas, I.M. Becker. *Cell Tissue Res.* 342 (3), 423-35, **2010**.
3. A. Varshney, B. Ahmad, G. Rabbani, V. Kumar, S. Yadav, R.H. Khan. *Amino Acids.* 39 (3), 899-910, **2010**.
4. John Wiley & Sons. *Journal of Mass Spectrometry* 45 (1), 125–136, **2010**.
5. M. Del Campo, S. Arancibia, E. Nova, F. Salazar, A. González, B. Moltedo, P. de Ioannes, J. Ferreira, A. Manubens, M.I. Becker. *Revista Medica de Chile* 139 (2), 236-246, **2011**.
6. D. Guo, H. Wang, D. Zeng, X. Li, X. Fan, Y. Li. *Parasit. Internat.* 60 (3), 242-246, **2011**.
7. A. Carlier, R., Michel, J.-P. Cadoret, A. Lejeune, N. Dufourmantel. "Production of high mannose glycosylated proteins stored in the plastid of microalgae." Patent WO2012089342A1, **2012**.
8. C.J. Coates, J. Nairn. *Dev. Comp. Immunol.* 45, 43-55, **2014**.
9. V.T. Dang, K. Benkendorff, T. Green, P. Speck. *J. of Virology* 89 (16), 8114-8118, **2015**.
10. J. Zhuang, C.J. Coates, H. Zhu, P. Zhu, Z. Wu, L. Xie. *Developmental & Comparative Immunology* 49, 96-102, **2015**
11. J. Wu, A.L. Cunningham, F. Dehghani, R.J. Diefenbach. *Gene Reports* 4, 123-130, **2016**.
12. N.T. Zanjani, M. Miranda-Saksena, P. Valtchev, R.J. Diefenbach, L. Hueston, E. Diefenbach, F. Sairi, V.G. Gomes, A.L. Cunningham, F. Dehghani. *Antim. Agents and Chemoth.* 60, 2, 1003-1012, **2016**.
13. A.R. de Toledo-Piza, C.A. Figueiredo, M.I. de Oliveira, G. Negri, G. Namiyama, M. Tonelotto, K. de Senna Villar, H.K. Rofatto, R.Z. Mendonça. *Antiviral Research* 134, 172-181, **2016**.
14. V.A. Toptikov, V.M. Totsky, T.G. Alieksieieva, O.O. Kovtun. *Cytology and Genetics* 51 (4), 253-262, **2017**.
15. Z. Zhang, F. Wang, C. Chen, Z. Zheng, J. Aweya, Y. Zhang. *Immunology Letters* 192, 42-47, **2017**.
16. C.J. Coates, H. Decker. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (2), 293–317, **2017**.
17. N.T. Zanjani, M.M. Saksena, F. Dehghani, A.L. Cunningham. *Curr Med Chem.* 25 (20), 2292-2303, **2018**.
18. Z. Zhang, R. Li, J.J. Aweya, F. Wang, M. Zhong, Y. Zhang. *FEBS Lett.* 593 (8), 820-830, **2019**.
19. T. Yao, M.M. Zhao, J. He, T. Han, W. Peng, H. Zhang, J.Y. Wang, J.Z. Jiang. *Int J Biol Macromol.* 129, 538-551, **2019**.

20. B.M. Khan, Y. Liu. Marine Mollusks: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18, **2019**.

**31. Dolashka, P., Velkova, L., Shishkov, S., Kostova, K., Dimitrov, I., Dolashki, A., 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, 2010a, 2361-2367.**

Lumupa ce e:

1. Q.A. Acton. *Book "Metalloproteins: Advances in Research and Application"*. Scholarly Editions, Atlanta, Georgia 4, **2011**.
2. D. Guo, H. Wang, D. Zeng, X. Li, X. Fan, Y. Li. *Parasit. Internat.* 60 (3), 242-246, **2011**.
3. J-P. Cadoret, A. Carlier, N. Dufourmantel, A. Lejeune, R. Michel. "Production of high mannose glycosylated proteins stored in the plastid of microalgae." Patent WO 2012089342 A1/05.07.**2012**.
4. S. Arancibia, F. Salazar, M. I. Becker. *Bladder Cancer from Basic Science to Robotic Surgery*. Chapter 11, 221–242. A.E. Canda, Ed., InTech, Croatia, Rijeka, **2012**. [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com).
5. Z. Xiao-Yu, L. Xiao-Min, Z. Yue-Ling, L. Qun-Shan, Z. Wen-Hui, L. Jing- Sheng. *Acta hydrobiol. Sinica* 37 (6), 1059-1065, 2013.
6. X-Y. Zhang, X-M. Lin, Y-L. Zhang, Q-S. Lu, W-H. Zou, J-S. Lun. *Acta Hydrobiol. Sinica* 37 (6), 1079-1084, **2013**.
7. C.J. Coates, J. Nairn. *Dev.Comp.Immunol.* 45, 43–55, **2014**.
8. V. Sereanu, M. Mihai, I. Meghea. Conference Proceedings, Book, 2, 531-538, **2014**.
9. D.J. Harvey. *Mass Spectrometry Reviews* 1-155, **2014**.
10. V.T. Dang, K. Benkendorff, T. Green, P. Speck. *J. of Virology* 89, 16, 8114-8118, **2015**.
11. J. Zhuang, C.J. Coates, H. Zhu, P. Zhu, Z. Wu, L. Xie. *Dev. Comp. Immunol.* 49, 96-102, **2015**.
12. B. Eckmair, C. Jin, D. Abed-Nava. K. Paschinger. *Molecular & Cellular* 15 (2), 573-97, **2016**.
13. J. Wu, A.L. Cunningham, F. Dehghani, R.J. Diefenbach. *Gene Reports* 4, 123-130, **2016**.
14. H. Song, H.-Y. Wang, T. Zhang. *Int. J. of Molec. Sciences* 17 (6), 924, **2016**.
15. T.Y. Zhong, S. Arancibia, R. Born, R. Tampe, J. Villar, M. Del Campo, A. Manubens, M.I. Becker. *The Journal of Immunology* 196 (11), 4650-4662, **2016**.
16. R. Bayer. Patent, IPC8 Class: AA61K35612FI, Publication date: 2016-05-26, **2016**.
17. R. Bayer. "Methods of treatment viral diseases." (Orono, ME, US) Patent, Application Number: 14/948338, Publication Date: 05-26-**2016**.
18. D.J. Harvey. *Mass spectrometry reviews* 36 (3), 255–422, **2017**.
19. Z. Zhang, F. Wang, C. Chen, Z. Zheng, J.J. Aweya, Y. Zhang. *Immunology Letters* 192, 42-47, **2017**.
20. V.A. Toptikov, V.M. Totsky, T.G. Alieksieieva, O.O. Kovtun. *Cytology and Genetics* 51 (4), 253-262, **2017**.
21. F. Luo, R. Xing, X. Wang, Q. Peng, P. Li. *J. Sci. Food Agric.* 97 (15), 5361-5368, **2017**.
22. N.T. Zanjani, M.M. Saksena, F. Dehghani, A.L. Cunningham. *Curr Med Chem.* 25 (20), 2292-2303, **2018**.
23. T. Sahin, S. Yilmaz, S.A. Ergun. *Internat. Journal of Oceanography & Aquaculture* 2 (3), **2018**.
24. M. Palacios, R. Tampe, M. Del Campo, T.-Y. Zhong, M.N. López, F. Salazar-Onfray, M.I. Becker. *European Journal of Medicinal Chemistry* 150, 74-86, **2018**.
25. I.D. Grice, G.L. Mariottini *Results Probl Cell Differ.* 65, 439-475, **2018**.
26. B.M. Khan, Y. Liu. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18, **2019**

**32. Dolashka-Angelova, P., Moshtanska, V., Kujumdzieva, A., Atanasov, B., Petrova, V., Voelter, W., Van Beeumen, J. Structure of glycosylated Cu/Zn-superoxide dismutase from Kluyveromyces yeast NBIMCC 1984. *Journal Molecular Structure*, 980, 1-3, 2010b, 18-23.**

Lumupa ce e:

1. H. Korekane, A. Korekane, Y. Yamaguchi, M. Kato, Y. Miyamoto, A. Matsumoto, T. Hasegawa, K. Suzuki, N. Taniguchi, T. Ookawara. *Glycoconjugate J.* 28 (3-4), 183-196, **2011**.
2. U. Jabeen, A. Salim, A. Abbasi. *J. Chem. Soc. of Pakistan* 34 (2), 404-414, **2012**.
3. D.J. Harvey. *Mass Spectrometry Reviews* 1-155, **2014**.
4. A.K. Gombert, J.V. Jr. Madeira, M.E. Cerdán, M.I. González-Siso. *Applied Microb.and Biotechnology.* 100, 14, 6193-6208, **2016**.



**33. Velkova, L., Dimitrov, I., Schwarz, H., Stevanovic, S., Voelter, W., Salvato, B., Dolashka-Angelova, P.. Structure of hemocyanin from garden snail *Helix lucorum*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, **157**, 1, 2010a, 16-25.**

Lumupa ce e:

1. Q.A. Acton. *Book "Metalloproteins: Advances in Research and Application"*, A Scholarly Editions, Atlanta, Georgia, 4, **2011**.
2. S. Arancibia, F. Salazar, M.I. Becker. *Bladder Cancer – From Basic Science to Robotic Surgery*. Chapter 11, 221-243, **2012**. A.E. Canda, Ed., InTech, Croatia, Rijeka. [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)
3. D.M. Whitacre. *Reviews of Env. Cont. Toxic.* 225, 136, **2013**.
4. J. Markl. *BBA* 1834 (9), 1840-1852, **2013**.
5. Y. Raynova, L. Doumanova, K. N. Idakieva. *Protein J.* 32, 609-618, **2013**.
6. K. Świderek, P. Paneth. *Chem. Rev.* 113 (10), 7851–7879, **2013**.
7. D.V. Nica, D-M. Bordean, A.B. Borozan, I. Gergen, M. Bura, I. Banatean-Dunea. *Rev Environ Contam Toxicol.* 225, 95-137, **2013**.
8. A.E. Scheil, S. Hilsmann, R. Triebkorn, H.-R. Köhler. *Results in Immun.* 3, 73–78, **2013**.
9. H. Stewart, H.E. Westlake, L.R. Page. *Invertebrate Biology* 133, 42-68, **2014**.
10. R. Bayer. Patent IPC8 Class: AA61K35612FI, Publication data: 2016-05-26, **2016**.
11. R. Bayer. "Methods of treatment viral diseases." (Orono, ME,US) Patent US 2016/0143958 A1, **2016**.
12. S. Todinova, Y. Raynova, K. Idakieva. *J. of Analytical Methods in Chemistry* 2018 (4), 1-8, **2018**.
13. G.G. Schäfer, V. Pedrini-Martha, R. Schnegg, R. Dallinger, D.J. Jackson, B. Lieb. *Mol Phylogenet Evol.* 130, 99-103, **2019**.
14. T. Yao, M.M. Zhao, J.He, T. Han, W.Peng, H.Zhang, J-Y.Wanga, J-Z. Jiang. *International Journal of Biological Macromolecules* 129, 538-551, **2019**.

**34. 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 - Proteins and Proteomics*, **1804**, 12, 2010b, 2177-2182.**

Lumupa ce e:

1. K. Idakieva, F. Meersman, C. Gielens. *BBA* 1824, 731–738, **2012**.
2. J. Markl. *BBA* 1834 (9), 1840-1852, **2013**.

**35. Dolashka, P., Moshtanska,V., Dolashki, A., Velkova, L., Rao, G.S., Angelova, M., Betzel, C., Voelter, W., Atanasov, B. Structural analysis and molecular modelling of the Cu/Zn-SOD from fungal strain *Humicola lutea* 103. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **83**, 1, 2011a, 67-73.**

Lumupa ce e:

1. H. Korekane, A. Korekane, Y. Yamaguchi, M. Kato, Y. Iyamoto, A. Matsumoto, T. Hasegawa, K. Suzuki, N. Taniguchi, T. Ookawara. *Glycoconj. J.* 28 (3-4), 183-196, **2011**.
2. Y. Ran, Li. Yin, Z. Zhifang, S. Guifang, P. Shenyuan. *Biotechnol. Bulletin* 11, 78-82, **2012**.
3. L.-X. Jiao, C.-W. Hua, X.-X. Xu, J.-J. Wang, R.-X. Zhao. *Modern Food Science and Technology* 31 (3), 43-49, **2015**.
4. G. Leoni, A. De Poli, M. Mardirossian, S. Gambato, F. Florian, P. Venier, D.N. Wilson, A. Tossi, A. Pallavicini and M. Gerdol. *Marine Drugs — Open Access Journal* 15, 8, **2017**.
5. T. Sahin, S. Yilmaz, S.A. Ergun. *Internat. Journal of Oceanography & Aquaculture* 2 (3), **2018**.

**36. Dolashka, P., Velkova, L., Iliev, I., Beck, A., Dolashki, A., Yossifova, L., Toshkova, R., Voelter, W., Zacharieva, S. Antitumor activity of glycosylated molluscan hemocyanins via Guerin ascites tumor. *Immunological Investigations, Journal Immunological Investigations* **40**, 2, 2011, 130-149.**

Lumupa ce e:

1. X.-Y. Zhang, X.-M. Lin, Y.-L. Zhang, Q.-S. Lu, W.-H. Zou and J.-S. Lun. *Acta Hydrobiol. Sinica* 37 (6), 1079-1084, **2013**.
2. J. Stoyloff, S. Ivanov. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des sciences: sciences mathématiques et naturelles* 67 (2), 223-230, **2014**.
3. N.T. Zanjani, F. Sairi, G.Marshall, M.M. Saksena, P.Valtchev, V.G Gomes, A.L.Cunningham, F.Deighani, *European J. of Pharmac. Sciences* 12 (53), 77-85, **2014**.

4. C.J. Coates, J. Nairn. *Developm. and Compar. Immun.* 45, 43–55, **2014**.
5. R.C. Bayer. "Lobster hemolymph as a utility for treatment of mammalian tissue lesions." Patent US 2014/0348877 A9, **2014**.
6. X. Lu, H. Lu, L. Guo, Z. Zhang, X. Zhao, M. Zhong, S. Li, Y. Zhang. *Fish and Shellfish Immun.* 46, 2, 398-405, **2015**.
7. R. Bayer. Patent IPC8 Class: AA61K35612FI, **2016**.
8. R. Bayer. "Methods of treatment viral diseases" (Orono, ME, US) Application Number: 14/948338 Publication Date: 05/26/2016. United States Patent Application 20160143958, **2016**.
9. Z. Zhang, F. Wang, C. Chen, Z. Zheng, J.J. Aweya, Y. Zhang. *Immunology Letters* 192, 42-47, **2017**.
10. A. Parmakelis, P. Kotsakiozi, C.K. Kontos, P.G. Adamopoulos, A. Scorilas. *BMC Genomics* 18 (1), 491, **2017**.
11. J. Altaf, M.H. Rasool, S. Akhtar, M. Manzoor, T. Younas, B. Ansari, G. Ahmad, F. Jabeen, M. Ali, R. Munir. *Pak J Pharm Sci.* 31, 1555-1563, 2018.
12. R. Ishwarya, B. Vaseeharan, R. Jayakumar, V. Ramasubramanian, M. Govindarajan, N.S. Alharbi, J.M. Khaled, M.N. Al-anbr, G. Benelli. *Aquaculture* 489, 130-140, **2018**.

**37. De Smet, L., Dimitrov, I., Debyser, G., Dolashka-Angelova, P., Dolashki, A., Van Beeumen, J., Devreese, B. The cDNA sequence of three hemocyanin subunits from the garden snail *Helix lucorum*. *Gene*, 487, 2, 2011, 118-128.**

*Lumupa ce e:*

1. Z. Zhou, D. Ni, M. Wang, L. Wang, L. Wang, X. Shi, F. Yue, R. Liu, L. Song. *Fish & Shellfish Immunol.* 33 (2), 375-381, **2012**.
2. A.E. Scheil, S. Hilsmann, R. Triebkorn, H.R. Köhler. *Results Immunol.* 3, 73–78, **2013**.
3. J. Markl. *BBA* 1834 (9), 1840-1852, **2013**.
4. H. Stewart, H.E. Westlake, L.R. Page. *Invertebrate Biology* 133, 1, 42-68, **2014**.
5. J. Wu, A.L. Cunningham, F. Dehghani, R.J. Diefenbach. *Gene Reports* 4, 123-130, **2016**.
6. M. Palacios, R. Tampe, M. Del Campo, T.-Y. Zhong, M.N. López, F. Salazar-Onfray, M.I. Becker. *European Journal of Medicinal Chemistry* 150, 74-86, **2018**.
7. G.G. Schäfer, V. Pedrini-Martha, R. Schnegg, R. Dallinger, D.J. Jackson, B. Lieb. *Mol Phylogenet Evol.* 130, 99-103, **2019**

**38. Dolashki, A., Voelter, W., Dolashka, P. Phenoloxidase activity of intact and chemically modified functional unit RvH1-a from molluscan *Rapana venosa* hemocyanin. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 160, 1, 2011, 1-7.**

*Lumupa ce e:*

1. Q. Wang, Z-H. Lin, Y-B. Bao, L-H. Huo, H-L. Gu. *Ocean. limnol. sinica.* 43 (1), 88-94, **2012**.
2. A.E. Scheil, S. Hilsmann, R. Triebkorn, H.R. Köhler. *Results Immunol.* 3, 73–78, **2013**.
3. C.J. Coates, J. Nairn. *Dev Comp Immunol.* 45, 43–55, **2014**.
4. S. Schenk, J. Schmidt, U. Hoeger, H. Decker. *Biochim Biophys Acta.* 1854, 8, 939-949, **2015**.
5. J. Zhuang, C.J. Coates, H. Zhu, P. Zhu, Z. Wu, L. Xie. *Dev Comp Immunol.* 49, 96-102, **2015**.
6. K.N. Naresh, A. Sreekumar, S.S. Rajan. *J Mol Graph Model.* 61, 272-280, **2015**.
7. L. Wang, Y. Ye, V. Lykourinou, J. Yang, A. Angerhofer, Y. Zhao, L.-J. Ming. *Eur. J. Inorg. Chem.* 42, 4899- 4908, **2017**.
8. C.J. Coates, H. Decker. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 2, 293- 317, **2017**.
9. F. Luo, R. Xing, X. Wang, Q. Peng, P. Li. *J. Sci Food Agric.* 97 (15), 5361-5368, **2017**.
10. N.T. Zanjani, M.M. Saksena, F. Dehghani, A.L. Cunningham. *Curr Med Chem.* 25 (20), 2292-2303, **2018**.

**39. Velkova, L., Dolashka, P., Lieb, B., Voelter, W., Dolashki, A., Van Beeumen, J., Devreese, B. Glycan structures of the structural subunit (HtH1) of *Haliotis tuberculata* hemocyanin. *Glycoconjugate Journal*, 28, 6, 2011, 385-395.**

*Lumupa ce e:*

1. Y. Fujii, N. Dohmae, K. Takio, S.M.A. Kawsar, R. Matsumoto, I. Hasan, Y. Koide, R.A. Kanaly, H. Yasumitsu, Y. Ogawa, S. Sugawara, M. Hosono, K. Nitta, J. Hamako, T. Matsui, Y. Ozeki. *JBC* 287 (53), 44772-44783, **2012**.
2. B. Schiller, A. Hykollari, S. Yan, K. Paschinger, I.B.H. Wilson. *Biological Chemistry* 393 (8), 661-67, **2012**.

3. S. Kurz, J. Chunsheng, A. Hykollari, D. Gregorich, B. Giomarelli, R.Vasta, I.B.H. Wilson, K.P. Gerardo. *J. Biol. Chem.* 288 (34), 24410-28, **2013**.
4. M.I. Becker, S. Arancibia, F. Salazar, M.D. Campo, A. De Ioannes. *Immune Response Activation*. Chapter 2, 45-72, **2014**.
5. E.I. Solomon, D.E. Heppner, E.M. Johnston, J.W. Ginsbach, J. Cirera, M. Qayyum, M.T. Kieber-Emmons, C.H. Kjaergaard, R.G. Hadt, L. Tian." *Chem. Rev.* 114, 3659–3853, **2014**.
6. D.J. Harvey, *Mass Spec Rev* 34, 268–422, **2015**.
7. J. Zhuang, C.J. Coates, H. Zhu, P. Zhu, Z. Wu, L. Xie. *Dev. Comp. Immunol.* 49 (1), 96-102, **2015**.
8. C. Gatsogiannis, O .Hofnagel, J. Markl, S. Raunser. *Structure.* 23 (1), 93-103, **2015**.
9. J .Wu, A.L. Cunningham, F. Dehghani, R.J. Diefenbach. *Gene Reports* 4, 123-130, **2016**.
10. T-Y. Zhong, S. Arancibia, R. Born, R. Tampe, J. Villar, M. Del Campo, A. Manubens, M.I. Becker. *J. Immunol.* 196 (11), 4650-62, **2016**.
11. N.T. Zanjani, M. Miranda-Saksena, P. Valtchev, R.J. Diefenbach, L. Hueston, E. Diefenbach, F. Sairi, V.G. Gomes, A.L. Cunningham, F. Dehghani. *Antimicrob Agents Chemother.* 60, 2, 1003-1012, **2016**.
12. Z. Zhang, F. Wang, C. Chen, Z. Zheng, J. Aweya, Y. Zhang. *Immunology Letters* 192, 42-47, **2017**.
13. S. Schulze, E. Urzica, M.J.M.F. Reijnders, H. van de Geest, S. Warris, L.V. Bakker et al. *New Phytol.* 215 (4), 1361-1369, **2017**.
14. D.J. Harvey. *Mass Spectrometry Reviews* 36 (3), 255-422, **2017**.
15. N.T. Zanjani, M.M. Saksena, F. Dehghani, A.L. Cunningham. *Curr Med Chem.* 25 (20), 2292-2303, **2018**.
16. Z. Zhang, R. Li, J.J. Aweya, F. Wang, M. Zhong, Y. Zhang. *FEBS Lett.* 593 (8), 820-830, **2019**.

**40. Dolashka, P., Franck, Z., Dolashki, A., Laura, M., Pietro, T., Salvato, B. ESI-MS and MALLS analysis of quaternary structure of molluscan and arthropodan hemocyanins.. Journal of Mass Spectrometry, 47, 7, 2012a, 940-947.**

Lumupa ce e:

1. J. Ya-fang, Z. Yi-fang. *Food and Drag* 15, 6, 436-438, **2013**.
2. D. Zhenhuan, J. Jing. *Bioprocess* 5 (3), 30-37, **2015**.
3. M. Velayutham, S. Kumar Kamanuri, K. Saravanan, A. Munusamy. *Biologia* 71 (2), 176–183, **2016**.

**41. Dolashka, P. Tandem mass spectrometry—Applications and principles 2012. Applications and Principles. Edited by Jeevan K. Prasain., 2012b.**

Lumupa ce e:

1. D.J. Harvey. *Mass Spectrometry Reviews* 36, 3, 255-422, **2017**.

**42. Dolashka, P., Voelter, W. Antiviral activity of hemocyanins. Invertebrate Survival Journal 10, 2013, 120-127.**

Lumupa ce e:

1. C.J. Coates, J. Nairn. *Dev Comp Immunol.* 45, 43–55, **2014**.
2. J.C. Bolton, R. Bayer, R. Bushway, S. Collins, B. Perkins. *J. of Shellfish Research* 33, 1, 11-17, **2014**.
3. K. Benkendorff, D. Rudd, B.D. Nongmaithem, L. Liu, F. Young, V. Edwards, C. Avila, C. Abbott. *Marine Drugs* 13 (8), 5237-5275, **2015**.
4. V.T. Dang, K. Benkendorff, T. Green, P. Speck. *J. of Virology* 89 (16), 8114-8118, **2015**.
5. N. Talaei Zanjani, M. Saksenab, P. Valtchev, R. Diefenbach, L. Hueston, E. Diefenbach, F. Sairi, V. Gomes, A. Cunningham, F .Dehghani. *Antimicrob. Agent and Chemoter* 60 (2), 1003-1012, **2016**.
6. R. Bayer. Patent, IPC8 Class: AA61K35612FI, Paten Publication **2016**.
7. R. Bayer "Methods of treatment viral deseases (Orono, ME, US)" US Patent App. 14/948 338, 2016, Publication Date: 05/26/**2016**.
8. C.J. Coates, H. Decker. *Cell Mol Life Sci.* 74 (2), 293-317, **2017**.
9. K. Bux, S. A. Ali, S.T. Moin. *European Biophysics Journal* 47, 1-14, **2018**.
10. D.K. Hasegawa, W. Chen, Y. Zheng, N. Kaur, W.M. Wintermantel, A.M. Simmons, Z. Fei, K.-S. Ling. *Virology* 513, 52-64, **2018**.

**43. Kostadinova, E., Dolashka, P., Velkova, L., Dolashki, A., Stevanovic, S., Voelter, W.. Positions of the glycans in molluscan hemocyanin, determined by fluorescence spectroscopy. Journal of Fluorescence, 23, 4, 2013, 753-760.**

Lumupa ce 8:

1. C.J. Coates, J. Nairn. *Dev Comp Immunol.* 45, 43–55, **2014**.
2. Z. Du, J. Jing. *Bioprocess.* 5 (3), 30-37, **2015**.

**44. Abrashev, R., Stoitsova, S., Pashova, S., Paunova-Krasteva, T., Vassilev, S., Dolashka, P., Angelova, M. Temperature-stress tolerance of the fungal strain *Aspergillus niger* 26: physiological and ultrastructural changes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 5, 2014, 1661-1668.**

Lumupa ce 8:

1. K. Pietrzak, S. Glińska, M. Gapińska, T. Ruman, A. Nowak, E. Aydin, B. Gutarowska. *Metallomics* 8 (12), 1294-1302, **2016**.
2. M. Tegelaar, H.A.B. Wösten. *Sci Rep.* 7 (1), 6039, **2017**.
3. M. Rubio-Teixeira, G. Van Zeebroeck, J.M. Thevelein. In book: *Biochemistry and Molecular Biology* 191-277, **2017**.
4. X. Zhang, B. Zhang, R. Miao, .J. Zhou, L. Ye, D. Jia, W. Peng, L. Yan, X. Zhang, W. Tan, X. Li. *Mycobiology* 46 (3), 224–235, **2018**.
5. A. Koziróg, A. Otlewska, M. Gapinska and S. Michlewska. *Appl. Sci.*, 9, 245, **2019**.

**45. Dolashki, A., Radkova, M., Todorovska, E., Ivanov, M, Stevanovic, S., Molin, L., Traldi, P., Voelter, W., Dolashka, P. Structure and characterization of *Eriphia verrucosa* hemocyanin. *Marine Biotechnology*, 17, 6, 2015, 743-752.**

Lumupa ce 8:

1. M. Velayutham, S. K. Kamanuri, K. Saravanan, A. Munusamy. *Biologia* 71, 2, **2016**.
2. M. Khalil, Z. Boubegtiten-Fezoua, N. Hellmann, P. Hellwig. *Phys Chem Chem Phys.* 18 (41), 28732-28739, **2016**.

**46. Dolashka, P., Dolashki, A., Velkova, L., Stevanovic, S., Molin, L., Traldi, P., Velikova, R., Voelter, W. Bioactive compounds isolated from garden snails. *J. BioSci. Biotechnol.*, 2015b, 147-155.**

Lumupa ce 8:

1. V. Schneider, F.-K. Lücke, M. Birringer. *Gesunde Pflanzen* 68 (2), 89–97, **2016**.
2. P. Kumar, S. Kumar, S. K. Nayak. *The Bioscan* 12 (1), 149-153, **2017**.
3. M. Matusiewicz, I. Kosieradzka, T. Niemiec, M. Grodzik, H. Antushevich, B. Strojny, M. Gołębowska. *Int J Mol Sci.* 19 (4), 1064, **2018**.
4. G. Cilia, F. Fratini. *Developmental and Comparative Immunology* 86, 47-51, **2018**.

**47. Dolashka, P., Dolashki, A., Van Beeumen, J., Floetenmeyer, M., Velkova, L., Stevanovic, S., Voelter, W. Antimicrobial activity of molluscan hemocyanins from *Helix* and *Rapana* snails. *Current Pharm. Biotechnol* 17, 3, 2016, 263-270.**

Lumupa ce 8:

1. K. Suwannatrai, A. Suwannatrai, P. Tabsripair, J.U. Welb, S. Tangkawattana, C. Cantacessi, J. Mulvenna, S. Tesana, A. Loukas, J. Sotillo. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (11), 1-20, **2016**.
2. M. Velayutham, S.K. Kamanuri, K. Saravanan, A. Munusamy. *Biologia* 71, 2, 176-183, **2016**.
3. B. Dubief, F.L. Nunes, O. Basuyaux, C. Paillard. *Fish Shellfish Immunol.* 60, 255–264, **2017**.
4. L. Lagos, J.I. Tandberg, M.I. Becker, H.C Winther-Larsen. *Fish Shellfish Immunol.* 67, 571-574, **2017**.
5. F. Luo, R. Xing, X. Wang, Q. Peng, P. Li. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97 (15), 2017.
6. C.J. Coates, H. Decker. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 2, 293-317, **2017**.
7. G. Cilia, F. Fratini. *J. of Complementary and Integrative Medicine* 15 (3), 20170168, **2018**.
8. Y. López, V. Cepas, S.M. Soto. *The Marine Ecosystem as a Source of Antibiotics*. Chapter 1, 3-48, Grand Challenges in Marine Biotechnology, Springer International Publishing AG, part of Springer Nature, P.H. Rampelotto, A. Trincone (eds.), **2018**.
9. N.T. Zanjani, M.M. Saksena, F. Dehghani, A.L. Cunningham. *Curr Med Chem.* 25 (20), 2292-2303, **2018**.
10. T. Sahin, S. Yilmaz, S.A. Ergun. *International Journal of Oceanography & Aquaculture* 2 (3), **2018**.
11. P.H. Rampelotto, A. Trincone. *Grand Challenges in Biology and Biotechnology*. Series Ed.: Rampelotto, Pabulo H., 2367-1017, **2018**.
12. S. Ulagesan, J.H. Kim. *Applied Sciences* 8 (8), 1362, **2018**.
13. B. Houyvet, B. Zanuttini, E. Corre, G. Le Corguillé, J. Henry, C. Zatylny-Gaudin. *Amino Acids* 50 (11), 1573-1582, **2018**.

14. C.J. Coates, J. Talbot. *Dev Comp Immunol.* 86, 47-51, **2018**.

**48. Stenzl, A., Dolashki, A., Stevanovic, S., Voelter, W., Aicher, W., Dolashka, P. Cytotoxic effects of Rapana venosa hemocyanin on bladder cancer permanent cell lines. Journal of US-China Medical Science, 13, 2016, 179-188.**

Цитирани са:

1. F. Luo, X. Wang, R. Xing, P. Li. *J. of the Science of Food and Agriculture* 97 (15), 5361-5368, **2017**.
2. T. Sahin, S. Yilmaz, S. Ergun. *Intern. Journal of Oceanography & Aquaculture* 2 (3), **2018**.
3. M. Palacios, R. Tampe, M. Del Campo, T-Y. Zhong, M.N. López, F. Salazar-Onfray, M.I. Becker. *European J. of Medicinal Chemistry* 150, 74-86, **2018**.
4. J.J. Mora Román, M. Del Campo, J. Villar, F. Paolini, G. Curzio, A. Venuti, L. Jara, J. Ferreira, P. Murgas, A. Lladser, A. Manubens, M.I. Becker. *J. of Immun. Research.* 2019 (2), 1-19, **2019**.

**49. Velkova, L., Dolashka, P., Van Beeumen, J., Devreese, B. N-glycan structures of b-HIH subunit of Helix lucorum hemocyanin. Carbohydrate Research, 449, 2017, 1-10.**

Цитирани са:

1. M. Palacios, R. Tampe, M. Del Campo, T.Y. Zhong, M.N. López, F. Salazar-Onfray, M.I. Becker. *Eur J Med Chem.* 150, 74-86, **2018**.
2. Z. Zhang, R. Li, J.J. Aweya, F. Wang M. Zhong, Y. Zhang. *FEBS Letter* 593 (8), 820-830, **2019**.

**50. Dolashki, A., Dolashka, P., Stenzl, A., Stevanovic, S., Aicher, WK., Velkova, L., Velikova, R., Voelter, W. Antitumor activity of Helix hemocyanin against bladder carcinoma permanent cell lines. Biotechnology & Biotechnol. Equipment. (2019)**

**ЦИТАТИ : 505**

**КРАТКИ СЪОБЩЕНИЯ**

**1A. Velkova, L., Dolashki, A., Dolashka, P. Analysis of a glycopeptide from structural subunit ( $\beta$ c-HIH) of Helix lucorum hemocyanin by mass spectrometry. Proceedings of the Thirty-Third European Peptide Symposium – Sofia, Bulgaria, 288-289, 2014.**

Цитирани са:

1. M. Palacios, R. Tampe, M. Del Campo, T.Y. Zhong, M.N. López, F. Salazar-Onfray, M.I. Becker. *Eur J Med Chem.* 150, 74-86, **2018**.

**2A. Velkova, L., Nikolaeva-Glomb, L., Mukova, L., Dolashki, A., Dolashka, P., Galabov, A. Antiviral Effect of Molluscan Haemocyanines. Antiviral Research, 90, 2, 2011, A47-A48.**

Цитирани са:

1. C.J. Coates, J. Nairn. *Dev Comp Immunol.* 45, 43–55, **2014**.
2. T. Yao, M.-M. Zhao, J. He. T. Han, W. Peng, H. Zhang, J-Y. Wang, J.-Z. Jiang. *Int J Biol Macromol.* 129, 538-551, **2019**.

**3A. Zagorodnya, S., Dolashka, P., Baranova, G., Golovan, A., Nesterova, N. Anti-EBV Activity of Hemocyanin Isolated from Helix lucorum. Antiviral Research, 90, 2, 2011, A66.**

Цитирани са:

1. N.T. Zanjani, F. Sairi, G. Marshall, M.M. Saksena, P. Valtchev, V.G. Gomes, A.L. Cunningham, F. Dehghani. *European J. of Pharmac. Sciences* 12 (53), 77-85, **2014**.
2. X-Y. Zhang, X-M. Lin, Y-L. Zhang, Q-S. Lu, W-H. Zou, J-S. Lun. *Acta Hydrobiol. Sinica* 37 (6), 1079-1084, **2013**.
3. C.J. Coates, J. Nairn. *Dev Comp Immunol.* 45, 43–55, **2014**.
4. V.T. Dang, K. Benkendorff, T. Green, P. Speck. *J. of Virology* 89, 16, 8114-8118, **2015**.
5. X. Lu, H. Lu, L. Guo, Z. Zhang, X. Zhao, M. Zhong, S. Li, Y. Zhang. *Fish and Shellfish Immun.* 46, 2, 398-405, **2015**.
6. T.J. Green, D. Raftos, P. Speck, C. Montagnani. *J Gen Virol.* 96, 2471–2482, **2015**.
7. S. Liu, L. Zheng, J.J. Aweya, Z. Zheng, M. Zhong, J. Chen, F. Wang, Y. Zhang. *PLoS ONE* 12 (8), e0183783, **2017**.
8. Z. Zhang, F. Wang, C. Chen, Z. Zheng, J.J. Aweya, Y. Zhang. *Immunology Letters* 192, 42-47, **2017**.

4A. Nesterova, N, Zagorodnya, S, Moshtanska, V, Dolashka, P., Baranova, G., Golovan, A., Antiviral Activity of Hemocyanin Isolated from Marine Snail *Rapana venosa*. *Antiviral Research*, 90, 2, 2011, A38-A38.

Цитирани са:

1. X.-Y. Zhang, X.-M. Lin, Y.-L. Zhang, Q.-S. Lu, W.-H. Zou, J.-S. Lun. *Acta Hydrobiol. Sinica* 37 (6), 1079-1084, 2013.
2. N.T. Zanjani, F. Sairi, G Marshall, M.M. Saksena, P. Valtchev, V.G. Gomes, A.L. Cunningham, F. Dehghani. *Eur J Pharm Sci.* 12 (53), 77-85, 2014.
3. C.J. Coates, J. Nairn. *Dev Comp Immunol* 45, 43–55, 2014.
4. V.T. Dang, K. Benkendorff, T. Green, P. Speck. *J. of Virology* 89, 16, 8114-8118, 2015.
5. X. Lu, H. Lu, L. Guo, Z. Zhang, X. Zhao, M. Zhong, S. Li, Y. Zhang. *Fish and Shellfish Immun.* 46, 2, 398-405, 2015.
6. T.J. Green, D. Raftos, P. Speck, C. Montagnani. *J Gen Virol.* 96, 2471– 2482, 2015.
7. S. Liu, L. Zheng, J.J. Aweya, Z .Zheng, M. Zhong, J. Chen, F. Wang, Y. Zhang. *PLoS ONE* 12(8), e0183783, 2017.
8. Z. Zhang, F. Wang, C. Chen, Z. Zheng, J.J. Aweya, Y. Zhang. *Immunology Letters* 192, 42-47, 2017.
9. V.A.Toptikov, V.M.Totsky, T.G.Alieksieieva, O.O. Kovtun. *Cytology and Genetics* 51 (4), 253-262, 2017.
10. I.D. Grice, G.L. Mariottini. *Results Probl Cell Differ.* 65, 439-475, 2018.
11. B.M. Khan, Y. Liu. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18, 2019

ОБЩО ЦИТАТИ : 527

## **XI. СПИСЪК НА ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С МАТЕРИАЛА ПО ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

### **РЪКОВОДСТВО НА НАЦИОНАЛЕН НАУЧЕН ИЛИ ОБРАЗОВАТЕЛЕН ПРОЕКТ**

1. **Договор X-449/1995 МОН**, "Изолиране и охарактеризиране на Mn - Супероксид дисмутаза от филаментозна гъба *Humicola lutea* 110".
2. **Договор 5012/98, МОН**, Получаване на ензима Супероксид дисмутаза от плесенен щам *Humicola lutea* 103 AL.
3. **X-822/1998, МОН**, "Молекулна структура, конформационна стабилност и свойства на Cu/Zn съдържаща супероксид дисмутаза от фунгален щам *Humicola lutea* 103 AL".
4. **X-1202/2002, МОН (2003-2005)**, "Кислород-пренасящи протеини: структура, функция и медицинско приложение";
5. **K-1302, МОН, (2003-2006)**. "Фунгална супероксид дисмутаза: адаптивен отговор срещу оксидативния стрес и конформационен контрол на ензимно действие".
6. **K-1401/2004 МОН (2004-2007)**. "Функция на антиоксидантните ензими в клетъчния отговор на *Aspergillus niger* срещу температурния стрес".
7. **BO1 МОН (2006-2009)**. "Имунологични проучвания и разработване на ваксина с участието на хемоцианини от *Rapana venosa*, *Helix vulgaris*, *Carcinus aestuarii* при експериментални тумори и паразитози върху опитни животни".
8. **№ НИС-2493, ДО1-884/10.11.2006 МОН**, "Структурна и функционална характеристика на растителни кисели белтъци, подобни на неспецифични липид-пренасящи (nsLTPs), от ембриогенни суспензионни култури *Dactylis glomerata* L.".
9. **ВУ-Л-310/07 (2007-2010)**, "Хемоцианините като имуностимулатори и антивирусни средства. Определяне на генната и въглехидратната структура на хемоцианин *H. vulgaris*".

10. **ДО 02-205/17.12.2008 ТК01/496 (2009-2011)**, "Получаване на нови биологично-активни продукти от морски организми с антимикробна активност".
11. **НИТС02 019/13.12.2011**, „Научни монографии, тематични сборници, справочници, енциклопедии и българска научна периодика" тематичен сборник, "Същност и биологично приложение на маспектрометрията".
12. **BG051PO001-3.3.05-0001 13.06.2012**, „Наука и бизнес, Финансирани по схемата за подкрепа на специализирани публикации в реферирани издания и издания с импакт фактор. "ESI-MS and MALLS analysis of quaternary structure of molluscan and arthropodan hemocyanins".
13. **ДФНИ Б 02/29 от 12.12.2014, (2016-2019)**, "Антитела с индуцирана полиспецифичност – роля в имунната хомеостаза и лечебен потенциал".
14. **ФНИ ДН 01/14 от 19.12.2016 (2016-2019)**, „Протеомен анализ на нови природни пептиди с антибактериална и противогъбична активност, изолирани от охлюв *Cornu aspersum*".
15. **ФНИ ДН 03/13 от 18.12.2016 (2016-2019)**, „Промени в състава и термодинамичните свойства на мозъчния протеом при невродегенеративни нарушения - връзка на екзотермните процеси в протеома с механизма на формиране на плаки".
16. **ДН 11/10 от 15.12.2017 г. (2017-2020)**, "Състояние на покой при *Saccharomyces cerevisiae* – модел за изследване на токсикологичен и стресов отговор".
17. **КП-06-ОПР-03/10 от 20.12.2018 г. (2018-2021)**, "Разработване и валидиране на силико метод за идентифициране на биотерапевтици в пептидни смеси с природен произход".
18. **КП-06-21/13 от 18.12.2018 г. (2018-2021)**, "Нови ензими от групата на сиалидази при филаментозни гъби".
19. **ДО1-2017 / 30.11.2018**, Националната научна програма „Иновативни нискотоксични биологично активни средства за прецизна медицина (БиоАктивМед).
20. **BG05M2OP001-1.002-0019**, „Чисти технологии за устойчива околна среда – води, отпадъци, енергия за кръгова икономика“ 03.2018 г. – 12.2023 г.
21. **BG05M2OP001-1.002-0012-C01**, „Устойчиво оползотворяване на био-ресурси и отпадъци от лечебни и ароматични растения за иновативни биоактивни продукти“ 03.2018 г. - 12.2023 г.

#### **РЪКОВОДСТВО НА БЪЛГАРСКИЯ ЕКИП В МЕЖДУНАРОДЕН НАУЧЕН ИЛИ ОБРАЗОВАТЕЛЕН ПРОЕКТ**

1. **LST.CLG 973968/1999-2000, NATO** *Helix aspersa* hemocyanin, structural determination and potential therapeutic effect
2. **DFG (2000-2002)**, „Биотехнологично получаване на Cu/Zn-съдържаща супероксид дисмутаза от филаментозни гъби".
3. **LST.CLG 977860/2001-2003, NATO** "Recombinant Glycosylated Cu/Zn Superoxide Dismutase: Production and Structural Characterization".
4. **DLR 001/01(2003-2005)** "Oxygen transporting proteins: structure, function and medical application". "Кислород-пренасящи протеини: структура, функция и медицинско приложение".

5. **LST. CLG 978 560/2004, NATO, 2003-2005),**"*Helix aspersa* hemocyanin, structural determination and potential therapeutic effect".
6. **LST.CLG.977860, NATO** "Superoxide dismutase by *Aspergillus niger*. Heat shock-induced biosynthesis and structural characterization".
7. **CBP.EAP.CLG 973968/2005, NATO,** "Isolation, structural characterization and medical application of superoxide dismutase from a fungal strain".
8. **CBP.EAP.CLG 981969/2007-2009, NATO** "Production and characterization of novel materials (hemocyanins) for prevention of virus infection".
9. **ДААД-17-2007, (2007-2009) Германия** "Oligosaccharide structures responsible for the antiviral effect of hemocyanins".
10. **DFG-GZ:436 BUL 113/112/1-1 (2003-2006).** "Involvement of superoxide dismutase in the cell response of *Aspergillus niger* against heat shock"
11. **DFG-GZ:436 BUL 113/149/0-1 (2007-2010).** „Hemocyanins as immunostimulators and antiviral compounds. Determination of the gene sequence and carbohydrate structure of *Helix vulgaris* hemocyanin".
12. **ДО 02-91/14.12.2008, НТС01-187, (2008-2011) Украйна,** "Hemocyanins as immunostimulators and antiviral compounds".
13. **2009-1-BG1-LEO05-01655.** „Леонардо да Винчи” „Трансфер на иновации” “Competence – based training for VET professionals in clean environment - COMBAT”.
14. **GZ: STE 1819/5-1 DFG (2012-1014),** „Natural compounds as immunostimulators with antibacterial activity from garden snail *Helix aspersa*”.
15. **BG051PO001-3.3.06-0025 (2012-2014).** Подкрепа за изграждане и развитие на млад конкурентноспособен научен потенциал в областта на физиологията, фитохимията, геномиката, протеомиката и биоразнообразието на еукариотните организми".
16. **Fund for Scientific Research – Flanders (FWO-Vlaanderen) VS.011.06N/2007-2009.** "Gene sequence and carbohydrate structure of hemocyanin isolated from garden snail *Helix vulgaris*".
17. **Fund for Scientific Research – Flanders (FWO-Vlaanderen) VS.016.09N /2008 (2009-2011),** "Complete structure of hemocyanin and of peptides isolated from garden snail *Helix vulgaris* and test of their antimicrobial activity".
18. **CNR-(Italy), №-01/2007, (2007-2009).** "New insights on quaternary structure of molluscan hemocyanins".
19. **CNR-(Italy), (2010-2012).** "Охарактеризиране на нековалентно свързани протеини с масспектрометрия".
20. **FWO (2012-2014), Белгия,** "Isolation of bio compounds from *Helix lucorum* slime and analyses by mass spectrometry".
21. **FWO VS.076.18N/2018-2020, Белгия.** "Proteomics investigation of the antibacterial effect of molluscan bio-active peptides".

#### **УЧАСТИЕ В МЕЖДУНАРОДЕН НАУЧЕН ИЛИ ОБРАЗОВАТЕЛЕН ПРОЕКТ**

1. **ДНТС/Китай 01/6 (2012-2013)** Проект с Китай тема: "Фенолоксидазни активности на мед-съдържащи протеини и техните медицински ефекти".



2. **ЕБР-Италия (1998-2001)**, “Определяне разположението на триптофановите аминокиселинни остатъци в протеини посредством стационарна и динамична флуоресцентна спектроскопия“.

## **XII. СПИСЪК НА ПАТЕНТНИ И ПОЛЕЗНИ МОДЕЛИ**

1. Патент за изобретение BG №66374, Дата на издаване 05.12.2013 г.; “БИОЛОГИЧНО АКТИВЕН ПРОДУКТ, СЪДЪРЖАЩ ХЕМОЦИАНИН” - **Павлинка Александрова Долашка-Ангелова**, Александър Константинов Долашки, Людмила Георгиева Велкова
2. Патент за изобретение BG № 66614, Дата на издаване 31.10.2017 г. «БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ПЕПТИДИ ОТ ХЕМОЛОМФА НА *RAPANA VENOSA*» - **Павлинка Александрова Долашка-Ангелова**, Александър Константинов Долашки, Людмила Георгиева Велкова
3. Патент за изобретение BG № 66811, Дата на издаване 12.12.2018 г. «ЕКСТРАКТИ ОТ ОХЛЮВ *HELIX ASPERSA*» - **Павлинка Александрова ДОЛАШКА**, Людмила Георгиева ВЕЛКОВА
4. Патент за изобретение BG №66832, Дата на издаване 04.02.2019 г. «СЪСТАВ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ СМЕСИ ОТ СЛУЗ НА ОХЛЮВИ *HELIX ASPERSA*, ЗА ВЛАГАНЕ В ХРАНИТЕЛНИ ДОБАВКИ И КОЗМЕТИЧНАТА ПРОМИШЛЕННОСТ» - **Павлинка Александрова Долашка**, Александър Константинов Долашки, Людмила Георгиева Велкова
5. Полезен модел №: 2097, Дата на издаване 31.08.2015 г., “УСТРОЙСТВО ЗА СЪБИРАНЕ НА ЕКСТРАКТ ОТ ГРАДИНСКИ ОХЛЮВИ” - Димитър Георгиев Атанасов и **Павлинка Александрова Долашка-Ангелова**
6. Полезен модел №:2194, Дата на издаване 31.03.2017 г., „СЪСТАВ ЗА ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ НА СТОМАШНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ“ - Александър Константинов Долашки, **Павлинка Александрова Долашка** и Мария Красиминова Тодорова