

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО
ФИТОХИМИЯ

Юлиана Маринова Райнова

**Структура и биологична активност на кислород-
пренасящи протеини от безгръбначни**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

за присъждане на образователната и научна степен "Доктор"

Научна специалност:

**„Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни
вещества”**

шифър: 01.05.10

Научен ръководител: доц. д-р Красимира Идакиева

София, 2014г.

Изказвам благодарности на научния ми ръководител доц. Д-р Красимира Идакиева за предоставената ми възможност да работя върху интересната тема, както и за оказаната ми подкрепа,

на проф. Н. Генов ценните съвети при обсъждане на настоящия дисертационен труд,

и на всички колеги от лаб. „Химия и биофизика на протеини и ензими” при Институт по органична химия с Център по фитохимия – БАН.

Благодаря ви!

Изследванията, свързани с дисертационния труд са проведени в Институт по органична химия с Център по фитохимия, БАН – лаборатория „Химия и биофизика на белтъци и ензими”.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от колоквиума „Структура и функция на пептиди, белтъци и ензими” при ИОХЦФ – БАН, на заседание от 25.09.2014 г.

Дисертационният труд е изложен на 118 страници, включва 5 таблици и 47 фигури. Използвани са 168 литературни източника. Резултатите са отразени в 4 научни публикации, докладвани са на 10 научни форума и са забелязани 2 цитата на публикациите включени в дисертационния труд.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на.....г. от.....часа в зала 111 „Акад. Б. Куртев” на ИОХЦФ - БАН, кв. „Гео Милев”, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 9, на открито заседание на Научното жури.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на ИОХЦФ - БАН – стая 206, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 9, София.

Използвани съкращения:

kDa – килодалтон

SDS - натриев додецилсулфат

PAGE - електрофореза в полиакриламиден гел

ТЕМ - трансмисионна електронна микроскопия

ДСК - диференциална сканираща калориметрия

FTIR – Фурие трансформирана инфрачервена спектроскопия

Трис - трис (хидроксиметил) аминометан

EDTA - етилендиамин тетраоцетна киселина

DEAE-Sepharose - диетиламиноетил-сефароза

λ - дължина на вълната

V_{max} – максимална скорост на ензимно-катализирана реакция

K_m – константа на Михаелис-Ментен

T_m – температура на прехода

АК - аминокиселина

АЦ – активен център

MBTH - 3-метил-2-бензотиазолин

PMSF - фенилметансулфонил флуорид

DMF - N,N-диметилформаид

L-Dopa - 3,4-Дихидрокси-L-фенилаланин

УВОД

Хемоцианините са кислород-пренасящи (дихателни) протеини, разтворени в хемолимфата на безгръбначни от двата биологични вида – *Arthropoda* (членестоноги) и *Mollusca* (мекотели). През последните години, в световен мащаб, се наблюдава непрекъснато нарастващ интерес към тези преносители на кислород не само поради важната им биологична функция, но и поради възможностите за успешното им приложение в медицината. Хемоцианини от безгръбначни са обект на детайлни функционални, структурни и еволюционни изследвания. Фенолоксидазите, както и хемоцианините, спадат към групата на тип-3 мед-съдържащи протеини и притежават сходство по отношение на структурата на активния център. За разлика от хемоцианините обаче, фенолоксидазите окисляват фенолни субстрати. Съществуват доказателства, че хемоцианините са еволюирали от по-древните фенолоксидази и притежават латентна ензимна активност, която може да бъде активирана. Кристалографските структури на хемоцианини от различни организми показват, че активните им центрове са недостъпни за фенолни субстрати, но не и за малките кислородни молекули, което позволява осъществяването на функцията на хемоцианините като кислород-пренасящи протеини. Възможно е, както фенолоксидазите, които се активират от тяхната неактивна форма – профенолоксидази, посредством ограничена протеолиза от специфична серинова протеиназа, и хемоцианините да бъдат активирани така, че да проявят ензимна активност. Фенолоксидазната активност, осъществена чрез ензим или от хемоцианин е важна за оцеляването на безгръбначните животни, които не могат да осъществят хуморален имунен отговор. Фенолоксидазите в значителна степен участват в защитни реакции на имунната система на организмите срещу патогенни микроорганизми, играят роля при заздравяване на рани, склеротизация и др.

От години лабораторията по „Химия и биофизика на белтъци и ензими” при ИОХЦФ-БАН провежда системни изследвания върху структурата и функцията на хемоцианини от безгръбначни организми. Натрупването на данни за структурата, както и за функционирането на хемоцианини от различни източници подпомага изясняването на биологичното значение и свойствата на кислород-пренасящите протеини. В настоящия дисертационен труд представяме изолиране и структурно охарактеризиране на кислород-пренасящите протеини от представители на видовете *Arthropoda* и

Mollusca, а именно от морски рак *Cancer pagurus* и градински охлюв *Helix aspersa maxima*. Проведени са детайлни изследвания върху фенолоксидазната активност на изолираните в нативно състояние хемоцианини, както и върху възможностите за нейното активиране. Разработен е прототип на биосензор за количествено определяне на катехол на базата на хемоцианин изолиран от охлюви *Helix aspersa maxima*.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на научно-изследователската работа е да бъдат получени нови данни за структура, конформационна стабилност при повишена температура и биологична (ензимна) активност на кислород-пренасящи протеини от двата вида *Arthropoda* и *Mollusca*.

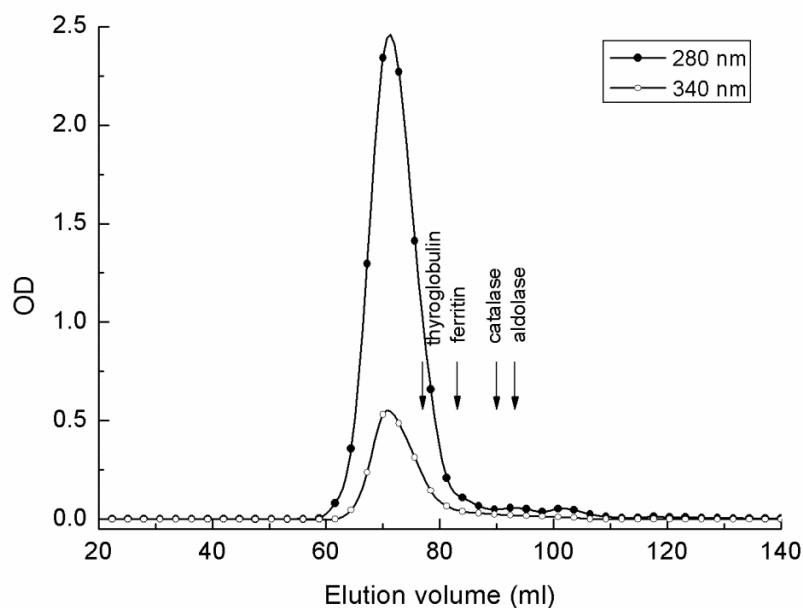
За постигане на тази цел са дефинирани следните конкретни задачи:

1. Изолиране и пречистване на препаративни количества хемоцианини от рак *Cancer pagurus* и охлюви *Helix aspersa maxima*.
2. Структурно характеризиране на хемоцианините.
3. Изследване на ензимните свойства (монофенолоксидазната и *o*-дифенолоксидазна активност) на хемоцианините при различни субстрати (катехол, L-Дора, допамин, тирамин и L-тирозин).
4. Изследване на възможностите за повишаване на ензимната активност на хемоцианините посредством ограничена протеолиза, третиране с детергент натриев додецилсулфат и повишаване на температурата.
5. Изследване посредством спектрални методи на конформационните промени, които настъпват в протеиновите молекули, в резултат на активиране на фенолоксидазната активност.
6. Изследване на конформационната стабилност на хемоцианините при повишена температура с помощта на диференциална сканираща калориметрия и инфрачервена спектроскопия.
7. Установяване на корелация между конформационна стабилност и ензимна активност при кислород-пренасящите протеини от безгръбначни.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ.

1. Пречистване и охарактеризиране на кислород-пренасящия протеин от хемолимфата на рак *Cancer pagurus* (СрН).

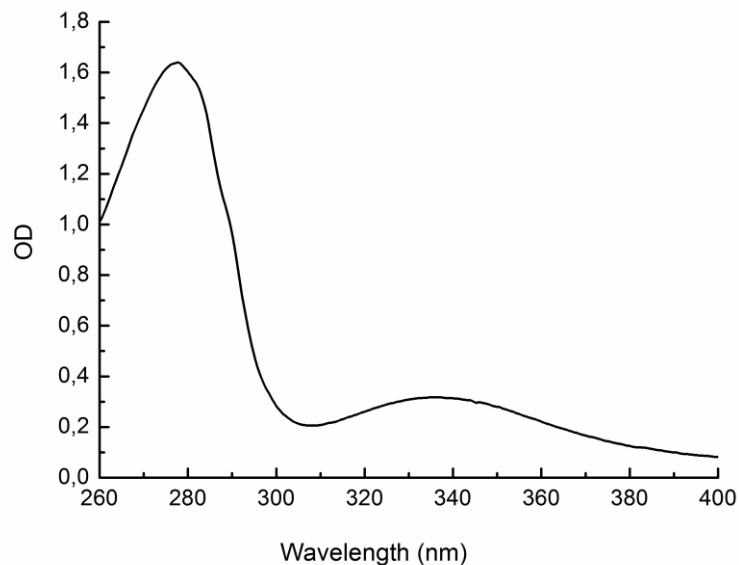
Кислород-пренасящият протеин, изолиран посредством ултрацентрифугиране на хемолимфата от *Cancer pagurus*, беше пречистен допълнително посредством молекулноситова хроматография върху колона Sephacryl S-300 (фиг. 1). Протеинът беше елуиран като единичен, симетричен пик, което е индикация за неговата молекулна хомогенност.



Фиг. 1. Молекулноситова хроматография на СрН върху колона Sephacryl S-300 (80 x 1.6 cm), уравновесена и елуирана с 50 mM трис/HCl буфер, рН 7.2, съдържащ 0.01 M CaCl₂, 0.01M MgCl₂ и 0.1M NaCl. Скорост на елуиране 0.3 мл/мин.

В абсорбционния спектър на изолирания хемоцианин освен ивицата при 280 nm, дължаща се на ароматните хромофори, се наблюдава ивица при 345 nm, което се дължи на комплекса Cu^{II}-O₂²⁻-Cu^{II} при активния център и е характерна за хемоцианин в окси – форма (фиг. 2). Отношението $A_{345}/A_{280} = 0.2$, характерно за напълно оксигениран хемоцианин показва, че СрН е изолиран със запазени активни центрове. Отношението

между оптичната плътност при 345 и 280 nm е широко използвано и като критерий за молекулна хомогенност при хемоцианини.

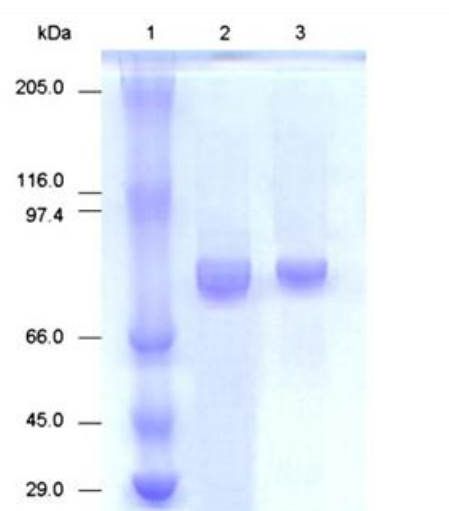


Фиг. 2. Абсорбционен спектър на CrH в буфер 50 mM трис/HCl, pH 7.2, съдържащ 0.01 M CaCl₂, 0.01M MgCl₂ и 0.1M NaCl.

1.1. Определяне на молекулна маса на CrH и неговите субединици.

Молекулната маса на изолирания от хемолимфата на рак *Cancer pagurus* хемоцианин беше определена с помощта на молекулноситова хроматография. Колоната, напълнена със Sephacryl S-300, беше калибрирана с протеини с известна молекулна маса (фиг.1). От построената калибрационна права беше определена молекулната маса на изолирания хемоцианин ~ 900 kDa, което е в съответствие с литературните данни за структурната организация на хемоцианина от *Cancer pagurus* – молекулата е изградена от два хексамера (2 x 6) от субединици. Молекулна маса около 75 kDa за субединиците, изграждащи хемоцианиновата молекула, беше определена с помощта на SDS-PAGE (фиг. 3).

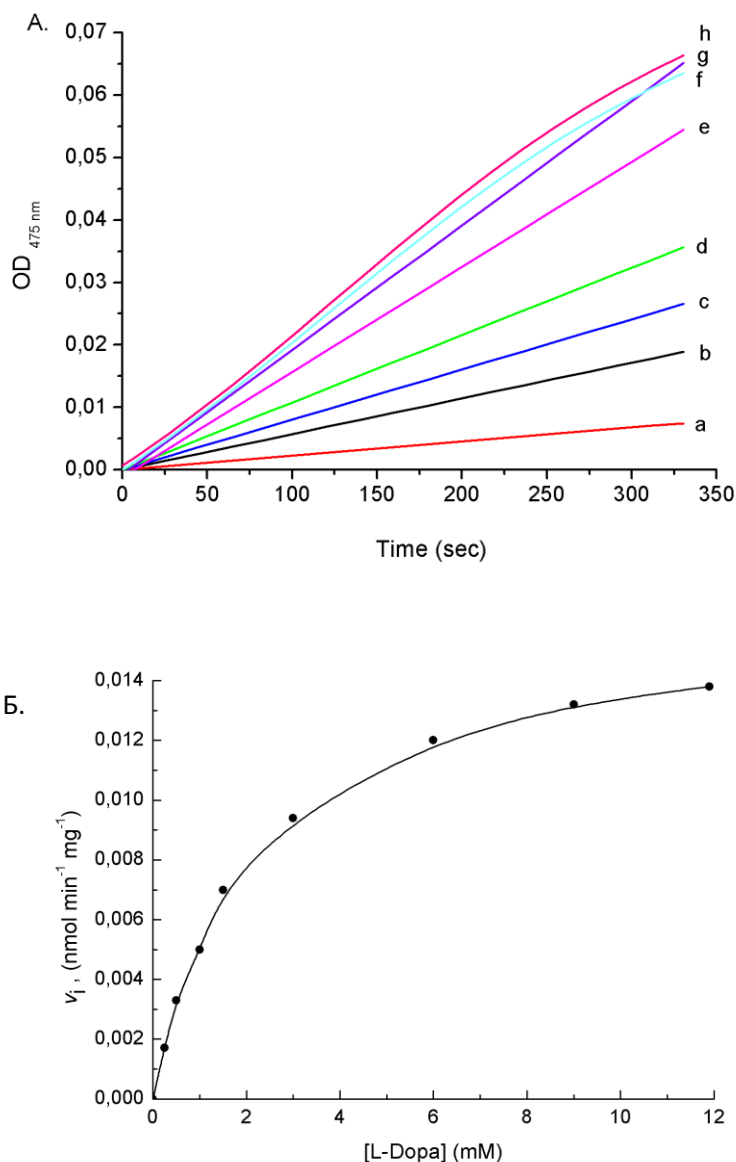
Хемоцианинът от *Limulus polyphemus* (LpH) също беше пречистен допълнително чрез молекулно-ситова хроматография на колона Sephacryl S-400 и основната част, съответстваща на нативния хемоцианин, състоящ се от 8-хексамера от субединици, беше използван за по-нататъшни анализи. SDS-PAGE потвърди присъствието на субединици с молекулна маса ~ 75 kDa за CrH и LpH (Фиг. 3).



Фиг. 3. 7.5 % SDS-PAGE. пътека 1, протеинови маркери: миозин (250 kDa), β -галактозидаза (116 kDa), фосфорилаза b (97.4 kDa), албумин (66 kDa), яйчен албумин (45 kDa), карбоанхидраза (29 kDa); пътека 2, пречистен СрН; пътека 3, пречистен LpH.

2. Изследване на монофенолоксидазна и о-дифенолоксидазна активност на хемоцианините от артоподни организми.

Кинетиката на катализираното от хемоцианин от *Cancer pagurus* окисление на субстрати катехол (от 0.04 до 5 mM), L-Dopa (от 0.25 до 12 mM) и допамин (от 0.0025 до 0.1 mM), беше следена по увеличението на концентрацията на образувания продукт (хинон, допахром) чрез непрекъснат спектрофотометричен тест. На фиг. 4 е представен кинетичен анализ на реакцията на окисление на L-Dopa до допахром, катализирана от СрН. Кинетичните параметри V_{max} и K_M бяха изчислени посредством анализ на зависимостта на началните скорости от субстратната концентрация с използване на програмата Нурег. Данните са представени в таблица 1. СрН притежава различен афинитет към трите субстрата. Стойността на k_{cat} е около три пъти по-висока за катехол, отколкото за двата други субстрата. Това вероятно се дължи на факта, че достъпът до активните центрове за по-малки субстратни молекули е улеснен за разлика от по-обемисти (напр. L-Dopa). Получените данни показват, че допаминът е най-специфичен субстрат (стойност $K_M = 0.01$ mM), последвано от катехол ($K_M = 0.67$ mM) и L-Dopa ($K_M = 2.14$ mM).



Фиг. 4. А. Кинетичен анализ на *o*-дифенолоксидазна активност на СрН (0.5 мг/мл) в 25 mM фосфатен буфер, рН 7.2, при 25 °С, концентрации на субстрата L-Dopa: (a) 0.25 mM; (b) 0.5 mM; (c) 1 mM; (d) 1.5 mM; (e) 3 mM; (f) 6 mM; (g) 9 mM; (h) 12 mM. **Б.** (a) Зависимост на началната скорост от субстратната концентрация, съгласно уравнението на Michaelis-Menten.

Освен това, ензимната ефективност на СрН към допамин ($k_{cat}/K_M = 70.8 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) е значително по-висока, отколкото при другите субстрати (Табл. 1). За разлика от СрН, нативният LpH не показва *o*-дифенолоксидазна активност към L-Dopa, допамин или катехол като субстрати. Не беше установена монофенолоксидазна активност на

СрН и LpH при използване на субстрати тирамин и L-тирозин. При същите реакционни условия не беше установена ензимна активност в хемолимфата от рак *Cancer pagurus*.

Таблица 1. Кинетични параметри на *o*-дифенолоксидазна активност СрН при субстрати катехол (0.04–5 mM), L-Dopa (0.25 mM – 12 mM) и допамин (0.0025 mM – 0.1 mM).

Хемоцинин	Субстрат	V_{\max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ min ⁻¹)
	L-Dopa	8.9 ± 0.001	2.14 ± 0.21	0.67	0.31
Нативен СрН	допамин	9.44 ± 0.001	0.01 ± 0.004	0.71	70.8
	катехол	32.5 ± 0.001	0.67 ± 0.05	2.44	3.64

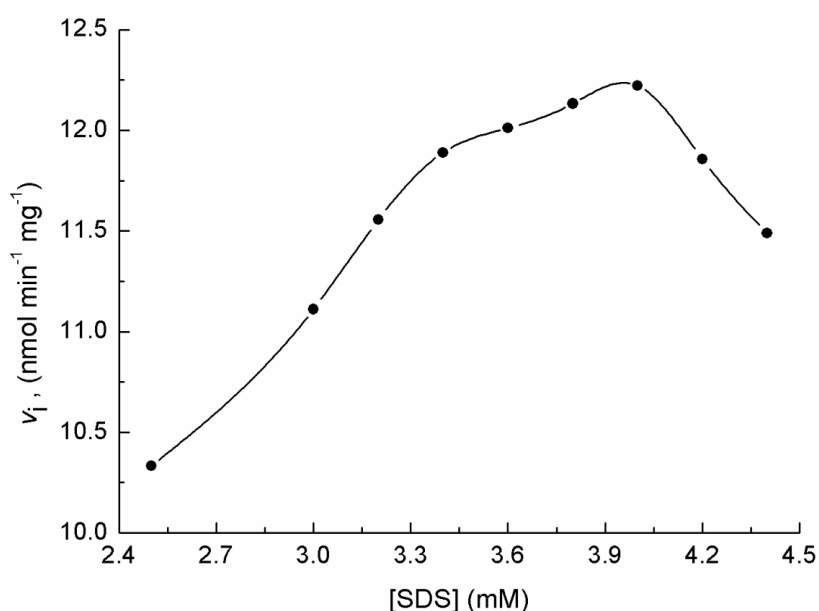
k_{cat} е изчислена за един активен център

Освен това, ензимната ефективност на СрН към допамин ($k_{\text{cat}}/K_M = 70.8 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) е значително по-висока, отколкото при другите субстрати (Табл. 1). За разлика от СрН, нативният LpH не показва *o*-дифенолоксидазна активност към L-Dopa, допамин или катехол като субстрати. Не беше установена монофенолоксидазна активност на СрН и LpH при използване на субстрати тирамин и L-тирозин. При същите реакционни условия не беше установена ензимна активност в хемолимфата от рак *Cancer pagurus*.

2.1. Активиране на фенолоксидазната активност на СрН посредством SDS.

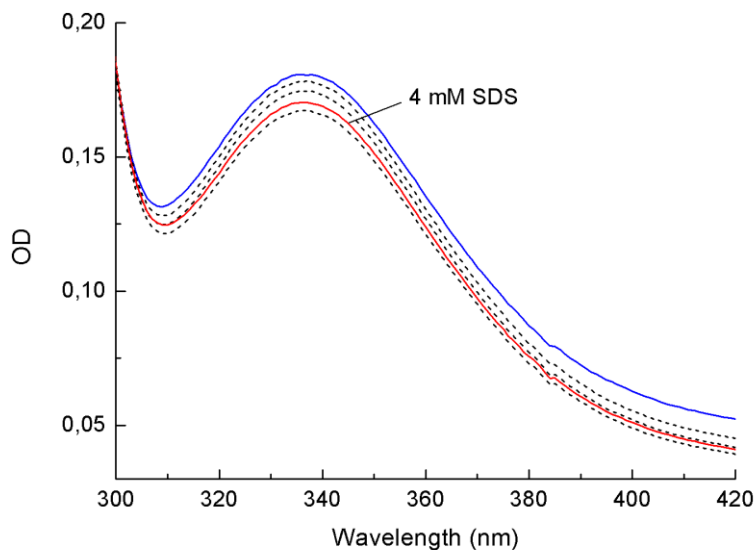
Показано е, че фенолоксидазна активност при хемоцианини може да бъде активирана посредством *in vitro* ефектори, които обикновено се използват при денатурация на протеини. Най-широко използван за тази цел в литературата е натриевия додецилсулфат (SDS). Предполага се, че SDS действа като алостеричен ефектор и благоприятства конформационен преход от неактивно (компактна молекула) в активно (разгънато) състояние.

Ние приложихме метода на активиране на *o*-дифенолоксидазна активност на хемоцианина от *Cancer pagurus* при третиране с концентрации на SDS 2.5 - 4.4 mM и времена на инкубиране 3 - 40 мин. Установихме, че SDS индуцира преходна ензимна активност в СрН: при инкубиране с детергента се наблюдава повишаване на ензимната активност, която след около 30 мин започва да спада. Максимално повишение на *o*-дифенолоксидазна активност на СрН беше постигната при инкубиране на хемоцианина с 4 mM SDS в продължение на 5 мин (фиг. 5). Наблюдаваният спад в активността след първоначалното активиране с SDS, най-вероятно се дължи на нарушаване на активните центрове след продължително време на въздействие с детергента.



Фиг. 5. *o*-дифенолоксидазна активност на СрН (0.5 мг/мл), активиран със различни концентрации SDS, при стандартни условия на реакция: 25 mM фосфатен буфер, pH 7.2, при 25°C, 3 mM концентрация на субстрата L-Дора.

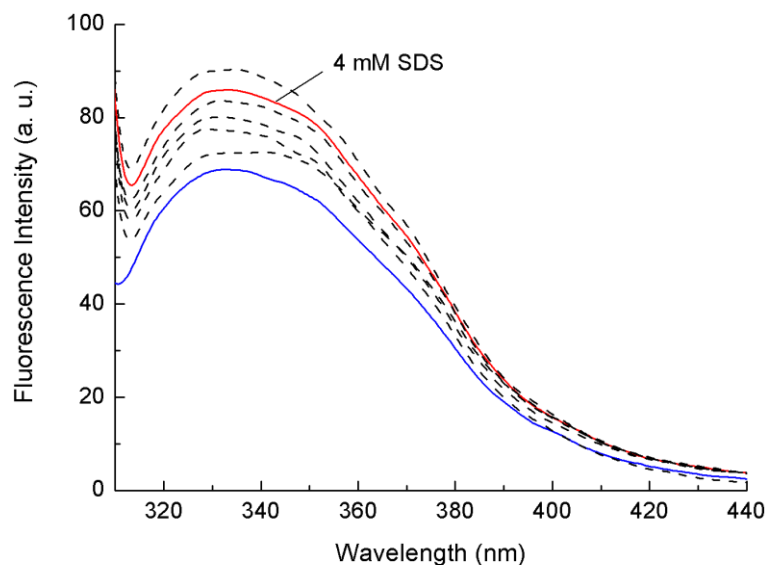
За да се провери влиянието на SDS върху активните центрове, бяха снети абсорбционните спектри на СрН при различни концентрации на SDS (2.5 – 4.4 mM). Проследени бяха промените в интензитета на ивицата при 340 nm, която се дължи на комплекса медни йони-кислород при активния център. След кратко време на инкубиране (5 мин) под действие на детергента, интензитета на ивицата при 340 nm леко намалява като функция от концентрацията на SDS, т.е. при тези условия е запазена кислород-свързващата способност при активните центрове на хемоцианина (фиг. 6).



Фиг. 6. Абсорбционни спектри на CrH, инкубиран с различни концентрации от SDS (2.5–4.4 mM) в продължение на 5 мин. Нативен CrH – синя линия; инкубиран с 4 mM SDS – червена линия.

Флуоресцентни спектри, показаха увеличение в интензитета на триптофиловата флуоресценция, след инкубиране на CrH с нарастващи концентрации на SDS (2.5 - 4.4 mM) в продължение на 5 минути (фиг. 7). Това може да се обясни с промени в микрообкръжението на триптофанови остатъци, както и с намаляване на ефекта на вътрешно гасене на комплекса медни йони-кислород при активния център. Промените в позицията на емисионния максимум (λ_{\max}) не са съществени, в сравнение със спектъра на нативен CrH (фиг. 7, синя линия), което показва, че нативната конформация на хемоцианина след инкубиране с SDS е запазена.

За да се отстрани възможността, промените в интензитета на флуоресценция да се дължат на локални ефекти на SDS върху триптофановите остатъци, отколкото на структурни промени, беше проведен контролен експеримент, в който N-ацетил-L-триптофан амид беше инкубиран при същите условия с SDS. Във флуоресцентните спектри не бяха регистрирани промени в интензитета на флуоресценция или в позицията на λ_{\max} (данните не са показани). Следователно, всяка промяна в триптофиловата флуоресценция се дължи на структурни промени в хемоцианина, в резултат на инкубирането с SDS.



Фиг. 7. Флуоресцентни спектри на СрН, инкубиран с различни концентрации от SDS (2.5–4.4 mM) в продължение на 5 мин. Нативен СрН – синя линия; инкубиран с 4 mM SDS – червена линия.

2.1.2. Кинетични параметри на реакциите на окисление на субстрати L-Дора и допамин, катализирани от СрН, активиран с SDS.

Проведен беше кинетичен анализ на реакциите на окисление на субстратите L-Дора и допамин, катализирани от активиран с 4 mM SDS в продължение на 5 мин хемоцианин от рак *Cancer pagurus*. Началните скорости на реакцията бяха определени при концентрации на L-Дора – от 0.25 mM до 12 mM и на допамин – от 0.0025 mM до 0.1 mM допамин. Контролно измерване показва, че SDS не стимулира образуването на допахром в отсъствие на хемоцианин. Определените кинетични параметри са представени в таблица 2.

Каталитичната активност на СрН нараства почти двойно след третиране с 4 mM SDS, в продължение на 5 мин (табл. 1 и табл. 2). Въпреки това, сравнително високата ензимна ефективност на хемоцианина при субстрат допамин остава почти същата, както определената за нативен СрН ($k_{cat}/K_M = 68 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Таблица 2. Кинетични параметри на о-дифенолоксидазна активност на хемоцианина от *Cancer pagurus* активиран със SDS при субстрати L-Дора (0.25 mM – 12 mM) и допамин (0.0025 mM – 0.1 mM).

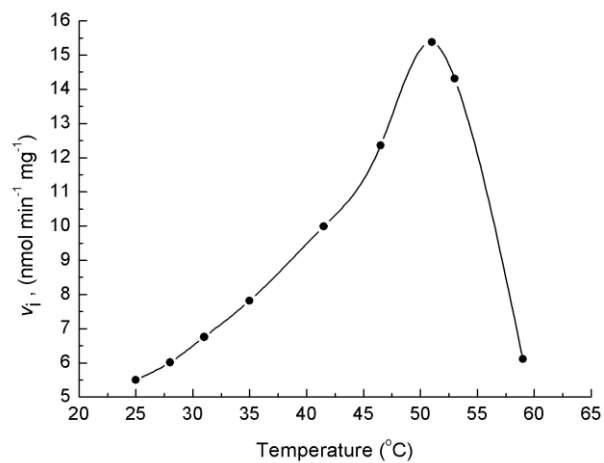
Хемоцианин	Субстрат	V_{\max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ min ⁻¹)
SDS- активиран CrH	L-Дора	24.4 ± 0.003	3.44 ± 0.77	1.83	0.53
	допамин	27.2 ± 0.002	0.03 ± 0.01	2.04	68.0

k_{cat} е изчислена за един активен център

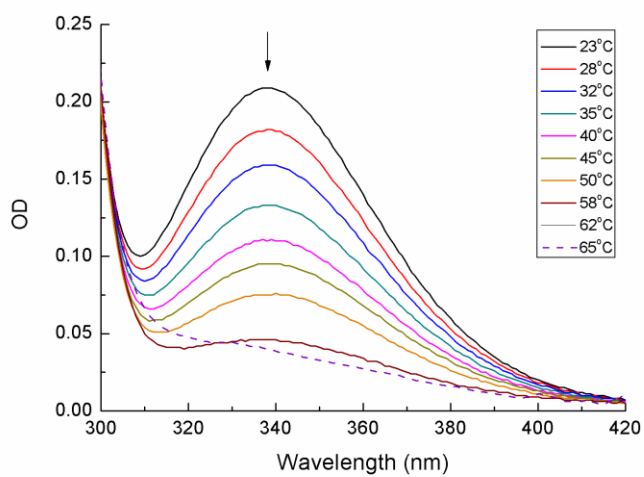
2.2. Активиране на фенолоксидазна активност посредством повишаване на температурата.

Изследвана беше в сравнителен аспект ензимната активност на CrH с повишаване на температурата. Наблюдава се нарастване на фенолоксидазната активност при субстрат 3 mM L-Дора с повишаване на температурата до около 50 °C, свързано с подобрен достъп на молекулите на субстрата. При 53 °C началната скорост на реакцията е все още близо до максималната, след което намалява в резултат на промени, които засягат каталитично-активната конформация на активните центрове (фиг. 8А). Абсорбционните спектри на CrH, записани в интервала от 23 °C до 65 °C, показват, че с повишаване на температурата интензитета на ивицата при 340 nm намалява, което е индикация за загуба на кислорода, свързан към мед-съдържащия активен център на CrH (фиг. 8Б). При 65 °C характеристичния максимум изчезва напълно, което е съпроводено с пълна загуба на ензимна активност. Протеиновата проба показва ~ 70% възстановяване на първоначалната ензимна активност, когато повишаването на температурата е до ~ 60 °C и последващо охлаждане. По този начин получените от нас данни показват, че топлинното денатуриране на активните центрове е обратимо и предхожда цялостното разгъване на хемоцианиновата молекула.

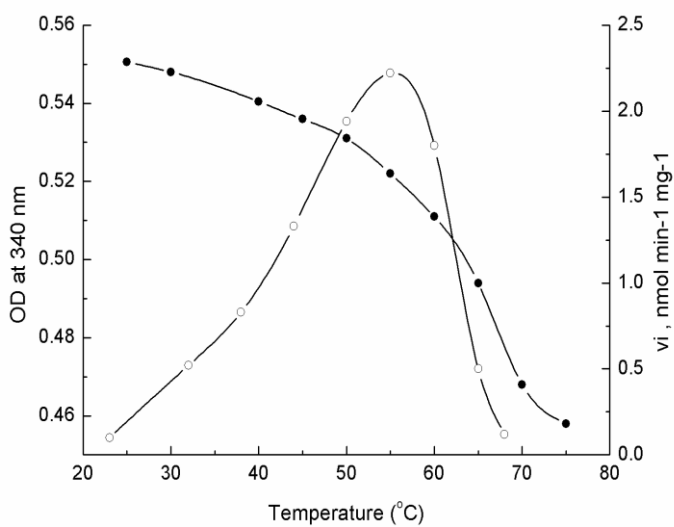
Забележително е, че CrH поддържа кислород-свързваща способност до 70 °C (Фиг. 8В). Както при CrH, се наблюдава повишаване на активността с температурата,



A.



B.



B.

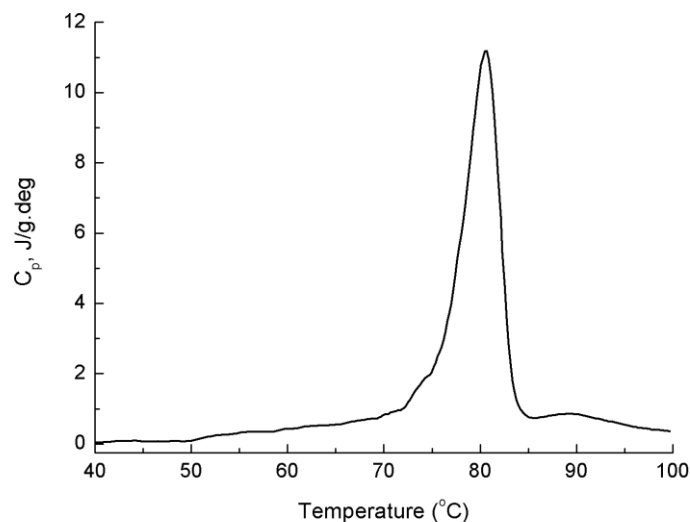
Фиг. 8. А: *o*-дифенолоксидазна активност на СрН към субстрат *L*-Дора (3.0 mM) с повишаване на температурата; протеинова концентрация 0.5 мг/мл. **Б.** Абсорбционен спектър на СрН в 0.05 М фосфатен буфер, рН 7.2, като функция на температурата; протеиновата концентрация е 0.5 мг/мл. Стрелката показва посоката на спектралните промени с повишаване на температурата. **В.** (-●-) Температурна зависимост при 340 nm на LpH в 0.05 М фосфатен буфер, рН 7.2; протеинова концентрация 1.34 мг/мл. (-○-) *o*-diPO активност на LpH към *L*-Дора (3.0 mM) като субстрат при повишена температура; протеинова концентрация 0.5 мг/мл.

последвано от инактивиране. Ензимната активност, обаче, достигната от LpH при оптималната температура е около 7 пъти по-ниска, отколкото при СрН.

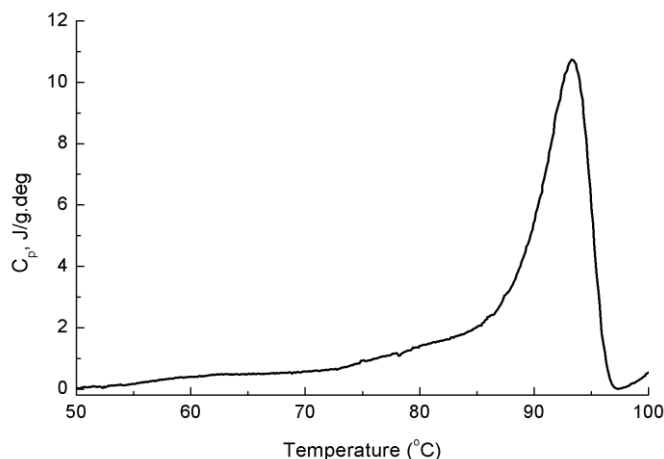
3. Изследване на температурната стабилност на хемоцианините.

С цел да се изследва евентуална взаимовръзка между стабилност и степен на ензимна активност беше изследвана температурната денатурация на хемоцианините от артроподи СрН и LpH. Фиг. 9А показва температурната зависимост на топлинния капацитет на СрН. Наблюдава се един ендотермичен преход, с T_m 80.7 ± 0.1 °C. Температурната денатурация на СрН е необратима. При повторно сканиране на пробата след охлаждане, не се наблюдава преход.

ДСК профилът на LpH демонстрира значителната термостабилност на този хемоцианин (T_m 92 ± 0.1 °C) (Фиг. 9Б).



А.

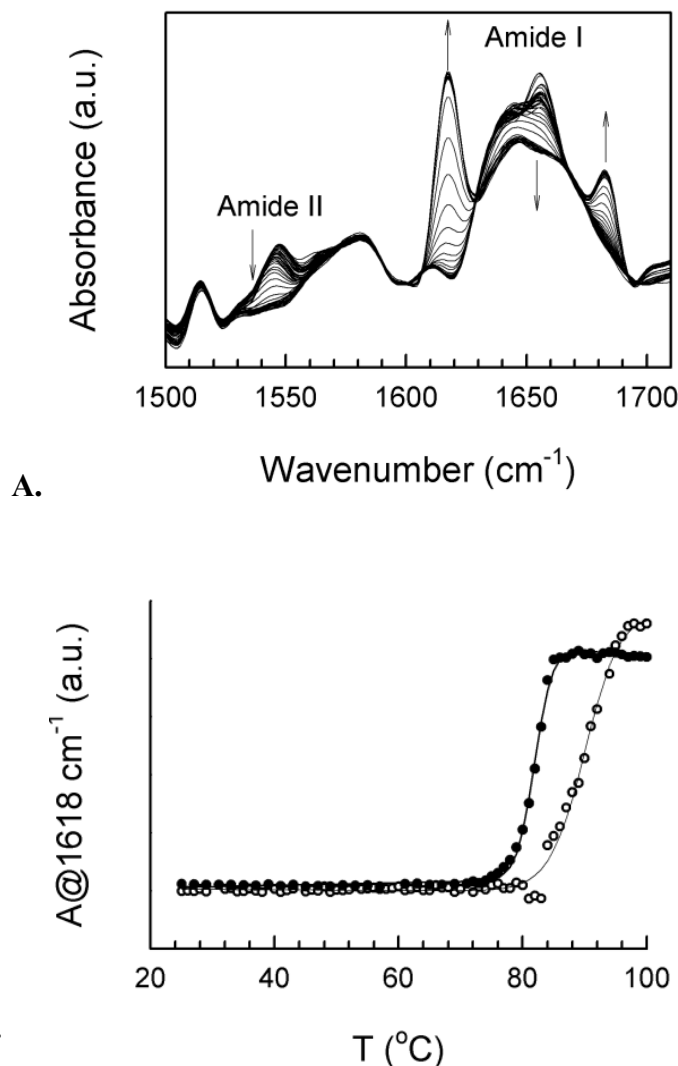


Б.

Фиг. 9. ДСК термограми на СрН (А) и ЛрН (Б) в 20 mM HEPES буфер, съдържащ 0.1 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7.9 (20 ° C), при протеинова концентрация 4.0 мг/мл и 4.6 мг/мл съответно. Експериментите са проведени при скорост на нагряване от 1 °C мин⁻¹.

Фурие трансформирана инфрачервена спектроскопия (FTIR) беше използвана за проследяване на промените с повишаване на температурата в амид I' областта на инфрачервените спектри (1600-1700 cm⁻¹), която показва промени във вторичната структура на протеините. Ефектът от температурата върху вторичната структура на СрН е илюстрирана с фиг. 10 А-Б. При 25 °C могат да бъдат наблюдавани два пика при 1654 и 1636 cm⁻¹, характерни съответно за α-спирална и β-листова структура. Интензитета на пиковете, свързани с нативните структури, намалява с повишаване на температурата. Едновременно с това се появяват две нови ивици при 1618 и 1683 cm⁻¹ (фиг. 10 А). Тези ивици се дължат на образуването на агрегати от разгънатите в резултат на високата температура полипептидни вериги (вътремолекулни агрегати от β-листова структура). След охлаждане на пробата до 25 °C тези ивици остават и служат като индикация за необратимостта на процеса на термична денатурация. От температурната зависимост на интензитета при 1618 cm⁻¹ беше определена температура на прехода T_m 82.2 ± 0.1 °C (Фиг. 10 Б). Този резултат е в съответствие с данните от ДСК.

Данните от изследванията проведени с диференциална сканираща калориметрия, абсорбционна и ИЧ - спектроскопия показват, че термично индуцираното инактивиране на активните центрове при тип-3 медсъдържащи протеини предхожда денатурацията на протеиновата молекула при изследваните артроподни хемоцианини.



Фиг. 10. А. Промени в инфрачервения спектър на СрН зависимост от температурата. Инфрачервени спектри (деконволюирани) записани в областта 25-95 °С. СрН е разтворен в 50 mM Tris-²HCl (p²H 8.2) буфер. Б. Температурна на зависимост на β-листовата структура на СрН и LpН. Интензитет на ивицата при ~ 1618 cm⁻¹ в зависимост от температура за СрН (●) и LpН (○).

Намаляването на фенолоксидазната активност на СрН съвпада със загубата на абсорбционната ивица при 340 nm, която се наблюдава при около 65 °С. Не бяха установени температурно-индуцирани промени във вторичната структура на СрН до около 70 °С, съдейки по данните от ИЧ спектроскопия (фиг. 10 Б). Над тази температура интензитетът на ивицата при 1618 cm⁻¹ започва да се увеличава, като индикация за началото на разгъването на елементи на вторична структура, съпроводено

с агрегиране помежду им. Компактната структура на хемоцианините денатурира без предварително да дисоциира до субединици.

ИЧ-измерванията още веднъж потвърждават много високата термична стабилност на LpH. Един преход при T_m 90.4 ± 0.1 °C се наблюдава от зависимостта температура - интензитет на ивицата при 1618 cm^{-1} (Фиг. 10Б).

4. Връзка между температурна стабилност и фенолоксидазна активност при артроподни хемоцианини.

Температурната стабилност на СрН и LpH беше изследвана като индикация за гъвкавостта, т.е. конформационната подвижност на протеините. Проведените от нас измервания показват, че LpH притежава по-висока термостабилност ($T_m \sim 92$ °C), отколкото СрН ($T_m \sim 80$ °C). Това предполага, че LpH притежава по-стабилна структура, отколкото тази на СрН и притежава по-малко „гъвкави“ участъци от полипептидните вериги, което може да доведе до ограничен достъп за молекулите на субстрата. При СрН активните центрове са по-достъпни, което позволява на хемоцианина да проявява ензимна активност в нативно състояние. Сравняването с литературните данни показва, че хемоцианинът, изолиран от тарантула *E. californicum* (4 x 6 – мер), също притежава значителна стабилност. Този хемоцианин остава функционално и структурно запазен до около 90 °C. Предполага се, че комплексната олигомерна (8 x 6-мер) структура на LpH е отговорна за изключителната термоустойчивост на молекулата, тъй като е стабилизирана от голям брой хидрофилни и полярни връзки. Молекулата на СрН представлява (2 x 6-мер) от субединици и се отличава с по-ниска стабилност. Хемоцианините от рак *S. taenias* (T_m 72 °C) и омар *H. americanus* (T_m 85 °C), молекулите на които са изградени от 2 хексамера от субединици, също са показали по-ниска термостабилност. По същия начин, хемоцианина от *P. vulgaris* (1 x 6 – мер), притежава още по-ниска $T_m = 63$ °C.

Хемоцианините от *L. polyphemus* и *E. californicum*, които показват най-висока термостабилност, проявяват дифенолоксидазна активност само след инкубиране с детергента SDS (табл. 3). Хемоцианините от ракообразни *S. taenias* и *H. americanus* проявяват *o*-дифенолоксидазна активност към субстрат катехол в нативно състояние. Вероятно те притежават по-голяма „гъвкавост“ на полипептидните вериги в областта на активните центрове, в резултат на което те проявяват фенолоксидазна активност в нативно състояние.

Таблица 3. T_m стойности и кинетични параметри на *o*-дифенолоксидазна активност на артроподни хемоцианини.

Хемоцианин	T_m (°C)	Субстрати											
		Катехол				L-Дора				Допамин			
		V_{max} (mM min ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ min ⁻¹)	V_{max} (mM min ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ min ⁻¹)	V_{max} (mM min ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ min ⁻¹)
<i>Panulirus argus</i>	–												
SDS-активиран			7.174 ^a		0.022 ^a		2.565 ^a		0.044 ^a		0.181 ^a		0.79 ^a
<i>Carcinus maenas</i>													
Нативен	72 ^b		142 ^c	1.7 ^c	0.012 ^c								
NaClO ₄ -активиран			182 ^c	6.8 ^c	0.037 ^c								
<i>Homarus americanus</i>													
Нативен	85 ^b		250 ^c	5.5 ^c	0.022 ^c								
NaClO ₄ -активиран			200 ^c	11.0 ^c	0.055 ^c								
<i>Cancer magister</i>													
SDS-активиран		0.009 ^d	0.192 ^d			0.012 ^d	2.875 ^d				0.049 ^d		
<i>E. californicum</i>	90 ^e				0.003 ^f				0.01 ^f	0.015 ^d	1.45 ^f	0.1 ^f	0.069 ^f
SDS- активиран													0.069
<i>Limulus polyphemus</i>	92									0.005 ^g	1.3 ^g		
SDS- активиран													

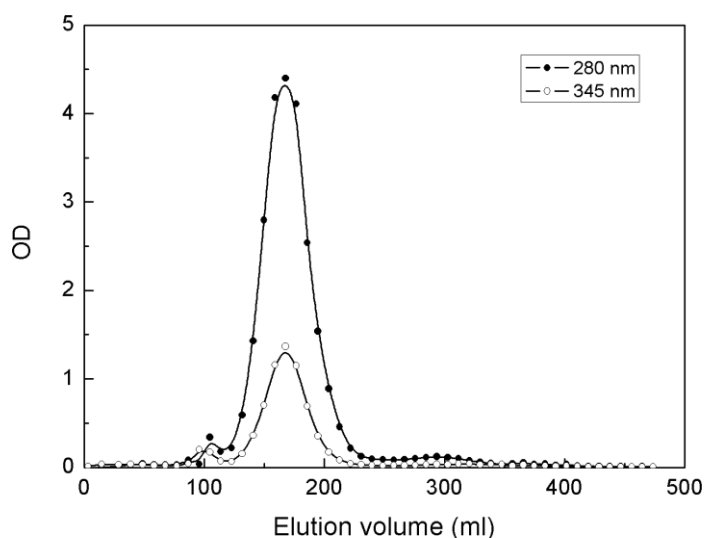
k_{cat} е изчислена за един активен център

^aPerdomo-Morales et al. (2008); ^bGeorgieva et al. (1998); ^cZlateva et al. (1996); ^dTerwilliger and Ryan (2006); ^eSterner et al. (1995); ^fJaenicke and Decker (2008); ^gWright et al. (2012)

При хемоцианините от артроподи съществува взаимовръзка между цялостната структурна стабилност и тяхната температурна стабилност от една страна, и между структурната „гъвкавост“ в областта на активните центрове и проявяваната от тези протеини *o*-дифенолоксидазна активност от друга страна.

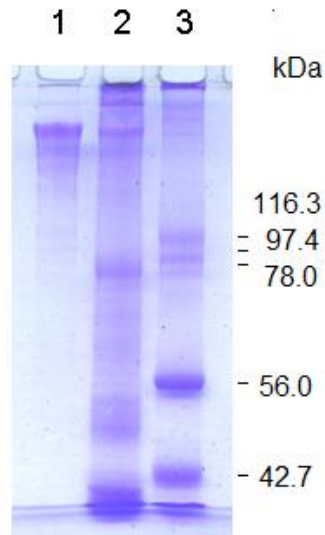
6. Пречистване и охарактеризиране на кислород-пренасящия протеин (НаН) от хемолимфата на охлюви *Helix aspersa maxima*.

Изолираният чрез ултрацентрифугиране на хемолимфата, събрана от охлюви *Helix aspersa maxima*, хемоцианин беше пречистен чрез молекуленоситова хроматография с колона Sepharose 4В. Протеинът беше елуиран като единичен симетричен пик (Фиг. 11), което е индикация за неговата молекулна хомогенност. Оптичната плътност на елуента при 345 nm съвпада с тази при 280 nm, което показва, че тази фракция съдържа само хемоцианин.



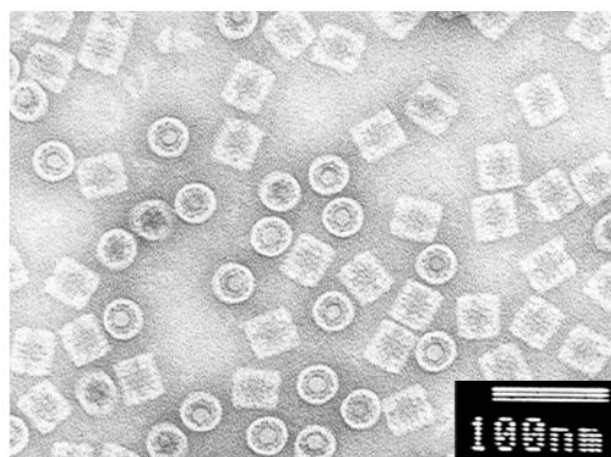
Фиг. 11. Молекуленоситова хроматография на хемоцианин от вида *Helix aspersa maxima* върху колона Sepharose 4В (90 x 2.4 cm), уравновесена и елуирана с 50 mM фосфатен буфер, рН 7.2. Скорост на елуиране 16 мл/час, обем на фракция 8 мл.

Проби от хемолимфата на *Helix aspersa maxima* и изолирания от нея хемоцианин бяха подложени на анализ с SDS-PAGE (Фиг. 12). Електрофоретичният анализ демонстрира чистотата на изолирания НаН (пътека 1), докато хемолимфата показва съдържание и на други белтъчни компоненти (пътека 2).



Фиг. 12. 7.5% SDS-PAGE на хемоцианин от *Helix aspersa maxima*. Пътeка 1 – пречистен HaH; пътека 2 – хемолимфа; пътека 3 – протеинови маркери със следните молекулни маси (отгоре надолу): β -галактозидаза, (116.3 kDa); фосфоорилаза b, (97.4 kDa); овотрансверин, (78 kDa); глутамат дехидрогеназа, (56 kDa) и овалбумин, (42.7 kDa).

Изолирания HaH беше охарактеризиран и посредством TEM (Фиг.13). Снимката е негативно контрастирана с 5% (w/v) амониев молибдат, съдържащ 1% (w/v) трехалоза и демонстрира хомогенността на пречистения препарат. Наблюдават се само типичните за хемоцианини от гастроподи дидекамерни цилиндрични молекули (поглед отгоре и отстрани). Липсва дисоцииран материал или тубуларни структури.

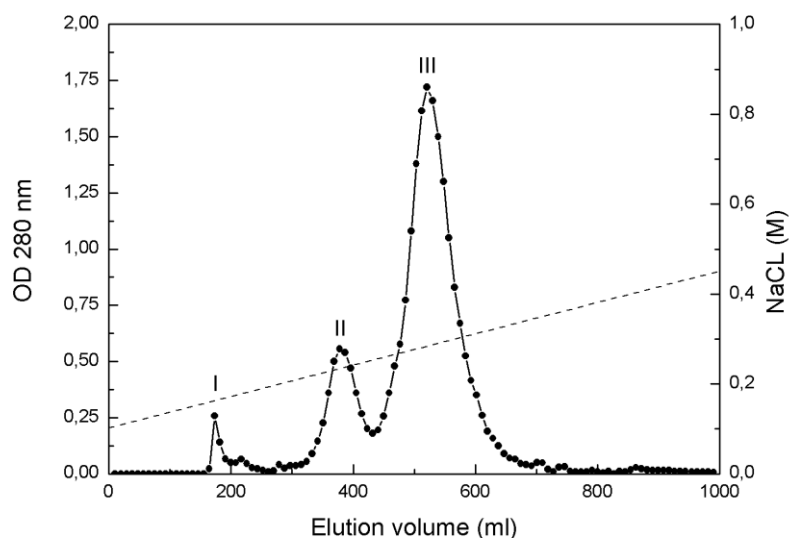


Фиг. 13. ТЕМ-снимка на хемоцианин, изолиран от *Helix aspersa maxima*. Пробата е негативно контрастирана с 5% (w/v) амониев молибдат, съдържащ 1% (w/v) трехалоза.

6.1. Изолиране и охарактеризиране на изоформи на хемоцианина от *Helix aspersa*.

За хемоцианините от гастроподни организми е характерна хетерогенност на молекулно ниво. Подобно на градински охлюв *Helix pomatia*, в хемолимфата на *Helix aspersa* Müller съществуват три хемоцианинови изоформи наименовани като β -НаН, α_D и α_N -НаН. Те се разделят на базата на различие в изоелектрични точки pI-5.2 за β -НаН, а pI-4.6 за двете електрофоретично подобни α -изоформи.

Изолираният НаН беше подложен на йонообменна хроматография върху колона с DEAE-Sepharose CL-6B (Фиг. 14).

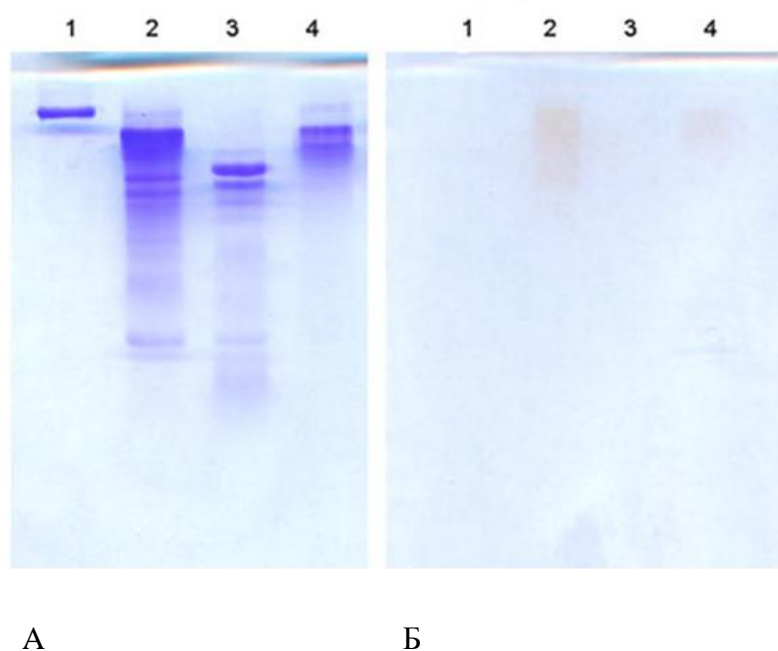


Фиг. 14. Йоннообменна хроматография на изолирания НаН върху колона DEAE-Sepharose CL-6B (32 x 1.2 cm), уравновесена и елуирана с буфер 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, Линеен градиент 0.1–0.45 NaCl при скорост на елуиране 32 мл за час и обем на фракции 8 мл.

Протеинът, който е елуиран като фракция II отговаря на β -изоформата с pI-5.2 (β -НаН). Другите две изоформи с pI-4.6 се елуират заедно като единичен симетричен пик (фракция III). Изучаваме α -изоформите без по-нататъшно разделяне до индивидуални компоненти като α_{D+N} НаН.

Събраните фракции (фиг. 14) бяха характеризирани посредством абсорбционна и флуоресцентна спектроскопия, както и с електрофореза. Пробите II и III имат характеристичните ивици за хемоцианини при 280 nm и 345 nm, докато фракция I (фиг. 15) не притежава ивицата характерна за комплекса медни йони кислород. Установено беше, че тази фракция съдържа протеиназния инхибитор α -макроглобулин.

Изоформите бяха допълнително охарактеризирани чрез нативна електрофореза (фиг. 15). Проведен беше тест за наличие на фенолоксидазна активност в изолираните хемоцианини.

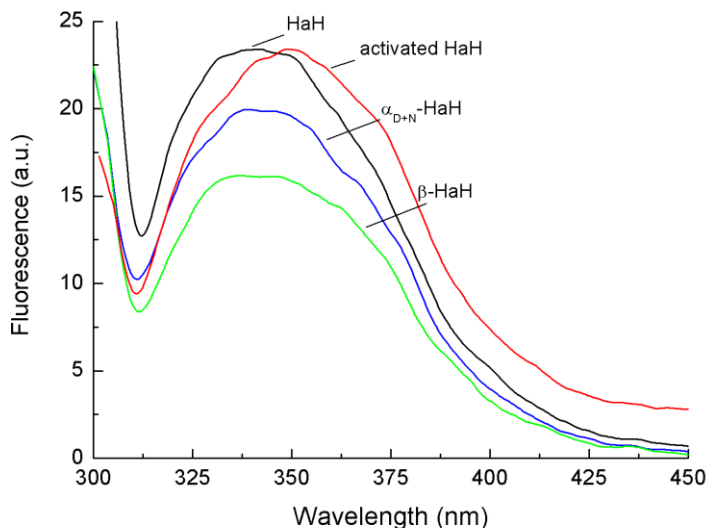


Фиг. 15. А: Нативна електрофореза в 7.5% PAGE; пътека 1 – фракция I; пътека 2 – фракция III; пътека 3 – фракция II; пътека 4 – нативен NaH. **Б:** Същият гел е фиксиран с 20 mM катехол.

Ензимна активност беше отчетена за α_{D+N} NaH (пътека 2) и за нативен NaH (пътека 4). Не се наблюдава (или е доста слабо) оцветяване на пробата, която отговаря на β -изоформа – пътека 3 (фиг. 15 Б). Вероятно тази изоформа притежава по-ниска *o*-дифенолоксидазна активност.

Нативен NaH и неговите изоформи показват типични флуоресцентни спектри, като на изучените до момента хемоцианини (Фиг. 16). Бяха регистрирани следните максимуми за нативен NaH 337 ± 1 nm, α_{D+N} NaH 339 ± 1 nm, и 334 ± 1 nm за β -NaH.

Тези емисионни максимуми са характерни за триптофани „погребани“ в хидрофобната вътрешност на нативната протеиновата молекула.



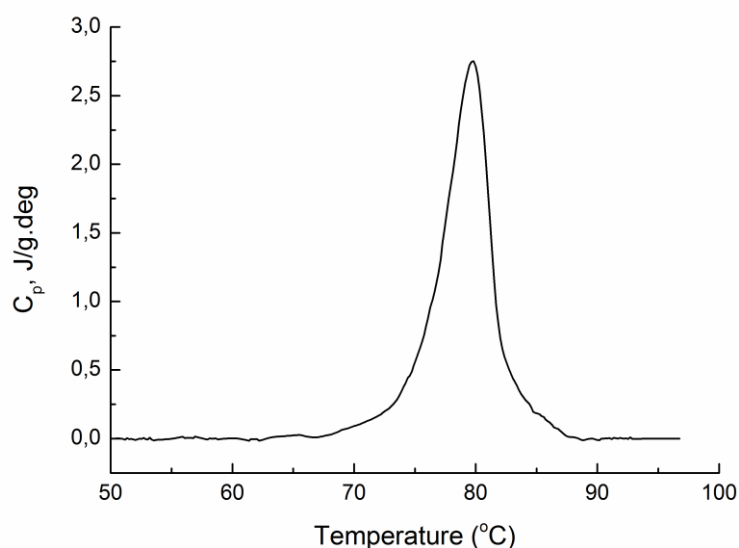
Фиг. 16. Флуоресцентни спектри на нативен HaH и неговите изоформи, и ензимно активиран HaH. Спектрите са записани при λ на възбуждане 295 nm, при температура 25 °C.

Изследвана беше стабилността на HaH при повишена температура с помощта на диференциална сканираща калориметрия. Фиг. 17 показва температурната зависимост на топлинния капацитет на HaH. В термограмата се наблюдава един ендотермичен преход, с температура на прехода T_m 80.0 ± 0.1 °C. Температурната денатурация на HaH е необратима. При повторно сканиране на пробата след охлаждане, не се наблюдава преход.

6.2. Изследване на ензимната активност на нативен HaH и неговите изоформи.

Проведен беше каталитичен анализ на реакцията на окисление на катехол до хинон, катализирана от нативен хемоцианин от *Helix aspersa maxima* и неговите изоформи. Началните скорости (v_i) на реакцията бяха определени при различни концентрации на субстрата катехол (1 – 30 mM). Кинетичните параметри V_{max} и K_M бяха изчислени посредством анализ на зависимостта на началните скорости от субстратната концентрация, с помощта на програмата Нурег. Резултатите от кинетичния анализ са представени на таблица 4. Данните са сравнени с получените за

други хемоцианини от молюски. Определена беше стойност на $V_{\max} = 22 \pm 0.001 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ при $k_{\text{cat}} = 1.1 \text{ min}^{-1}$ (изчислена за един активен център) за нативен HaH. Стойността на V_{\max} за β -изоформата е $17 \pm 0.001 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ при $k_{\text{cat}} = 0.85 \text{ min}^{-1}$. Установено е, че изоформата α_{D+N} HaH катализира окислението на катехол с най-висока скорост – $V_{\max} = 205 \pm 0.002 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ и $k_{\text{cat}} = 10.25 \text{ min}^{-1}$.



Фиг. 17. ДСК термограма на HaH в 20 mM HEPES буфер, съдържащ 0.1 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7.9 (20 °C), при протеинова концентрация 4.65 мг/мл. Скорост на нагряване от 1 °C мин⁻¹.

При идентични експериментални условия на анализ, β -изоформата на хемоцианина от градински охлюв *Helix pomatia* ($k_{\text{cat}} = 0.22 \text{ min}^{-1}$) и хемоцианинът от морски охлюв *Rapana thomasiana* ($k_{\text{cat}} = 0.25 \text{ min}^{-1}$) показват по-ниска ензимна активност (Табл. 4). Афинитетът на β -HrH към субстрат катехол, обаче, е значително по-висок от този на HaH ($K_m = 3.1 \text{ mM}$, срещу $K_m = 11.8 \pm 0.5 \text{ mM}$). Изоформите на HaH също показват по-нисък афинитет към субстрат катехол в сравнение с β -HrH ($K_m = 13.3 \pm 0.5 \text{ mM}$ определена за β -HaH и $K_m = 17.6 \pm 0.6 \text{ mM}$ за α_{D+N} HaH, Нативният хемоцианин от *O. vulgaris* е показал най-висока активност ($k_{\text{cat}} = 10 \text{ min}^{-1}$). Трябва да се отбележи, че стойностите на K_m , определени при кинетичен анализ на хемоцианини от различни представители на вида Молюска, са сравними със с K_m определена за ензима тирозиназа от *Illex argentinus* ($K_m = 9.3 \text{ mM}$) и катехол оксидаза от *Ipomoea batatas* ($K_m = 2.5 \text{ mM}$) (Табл. 4). Този факт показва, че поне някои от активните центрове в нативните

хемоцианинови молекули, притежават сродство към субстрата катехол подобно на фенолоксидаза. Само малките кислородни молекули имат свободен достъп до активните центрове, което е в съответствие с природната роля на хемоцианините като кислород-пренасящи протеини. Хидрофобното микрообкръжение на АЦ отблъсква субстратните молекули, съдържащи заредени полярни функционални групи, като допамин и L-Дора. Катехол е най-малкият дифенол и не съдържа полярни функционални групи, така че той е в състояние да проникне в субстрат свързващ джоб при АЦ, поради това е предпочитан субстрат при моллюсков хемоцианини.

При същите реакционни условия нативният HaH, както и β -HaH, не показаха *o*-дифенолоксидазна активност спрямо по-обемистите субстрати L-Дора и допамин. α_{D+N} -HaH изоформите, обаче, показаха способност да катализират окислението на L-Дора и допамин със сравнително ниска начална скорост $v_i = 1.6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (при 20 mM L-Дора) и $v_i = 3.3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (при 12 mM допамин).

Нито нативният HaH, нито изоформите му показаха моно-фенолоксидазна активност при субстрати L-тирозин и тирамин.

Хемолимфата от *H. aspersa maxima* също беше изследвана за наличие на ензимна активност. Със субстрат катехол хемолимфата (при крайна концентрация на протеин на 0.5 mg/ml) показва *o*-дифенолоксидазна активност сравнима с тази, наблюдавана за пречистения HaH. Оттук се предполага, че в хемолимфата на *H. aspersa maxima*, освен хемоцианин, не се съдържа фенолоксидаза.

6.3. Влияние на активатори върху *o*-дифенолоксидазната активност на HaH.

6.3.1. Активиране на *o*-дифенолоксидазната активност на HaH, посредством лимитирана протеолиза.

Ние приложихме метода на лимитирана протеолиза със субтилизин DY за активиране на *o*-дифенолоксидазна активност на хемоцианина от *Helix aspersa maxima*. HaH беше третиран със субтилизин в отношения E/S = 1/260 (w/w) и E/S = 1/100 (w/w), при 25 °C, в продължение на 24 часа. Изследвано беше изменението на *o*-дифенолоксидазната активност, в зависимост от времето на инкубиране на HaH с различни количества субтилизин DY, при субстрати 8 mM катехол и 9 mM L-Дора. При третиране на хемоцианина със субтилизин DY в отношение E/S = 1/100 (w/w) при pH 7.2, при 25 °C, беше постигнато почти стократно увеличение на ензимната активност,

прямо субстрата катехол, след инкубиране в продължение на 1 ч 30 мин ($v_i = 1.2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) (Фиг. 18).

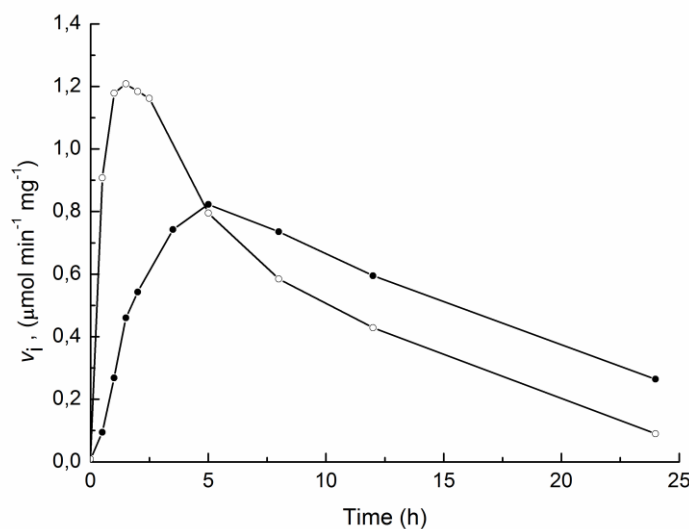
Таблица 4. Кинетични параметри на *o*-дифенолоксидазна активност спрямо катехол и L-Dopa за хемоцианин от вида *Helix aspersa maxima* в сравнение с данните за хемоцианини от други моллюсков организми, тирозиназа от мекотели и растителна катехол оксидаза.

Хемоцианини/фенолоксидази		Катехол			L-Dopa		Цитати	
		K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ min ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)		k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ min ⁻¹)
Моллюсков хемоцианини	Нативен (дидекамери)	11.8	1.1	0.093				
	β-Нс (дидекамери)	13.3	0.85	0.064				
	<i>Helix aspersa maxima</i> α _{D+N} -Нс (дидекамери)	17.6	10.25	0.58				
	Протеолитично активиран	6.8	40.15	5.9	17.3	12.45	0.72	
<i>Helix pomatia</i> (β-Нс)	Нативен (дидекамери)	3.1	0.22	0.068			<i>Siddiqui et al., 2006</i>	
	Димери от субединици	2.6	0.62	0.23				
	Протеолитично активиран	2.6	1.4	0.54				
<i>Helix vulgaris</i>	Нативен (дидекамери)	2.86	4.48	1.57	0.77	1.8	2.32	<i>Hristova et al., 2008</i>
<i>Rapana thomasiana</i>	Нативен (дидекамери)	30.0	0.25	0.008			<i>Idakieva et al., 2009</i>	
	Протеолитично активиран	12.8	0.49	0.039				
<i>Sepia officinalis</i>	Димери от субединици	3.8	1.0	0.26	2.4	0.1	0.04	<i>Siddiqui et al., 2006</i>

	Протеолитично активиран	4.2	1.5	0.36	
<i>Octopus vulgaris</i>	Нативен (дидекамери)	35.0	10	0.28	<i>Salvato et al., 1998</i>
Тирозиназа от молюски	Нативна (ST94)	9.3	2000	225	<i>Naraoka et al., 2003</i>
<i>Illex argentinus</i>	Активирана с трипсин (ST94t)	7.3	12 500	1700	
Растителна катехолоксидаза	Нативна	2.5	138 000	55 000	<i>Eicken et al., 1998</i>
<i>Ipomoea batatas</i>					

k_{cat} - изчислена за един активен център.

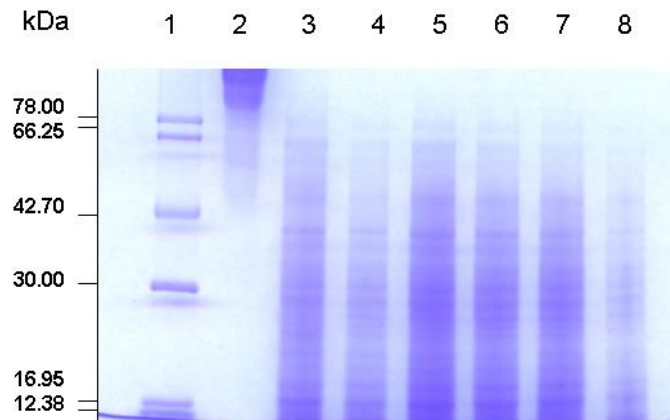
При контролен експеримент (в отсъствие на субтилизин DY) не бяха установени промени в *o*-дифенолоксидазната активност на HaH инкубиран в 25 mM натриев фосфатен буфер, рН 7.2, при 25 °С, в продължение на 24 часа. Следователно, промяната на активността на HaH е резултат на ограничена протеолиза на протеиновата молекула в резултат на действието на субтилизин и не се дължи на други фактори, като деградация на протеина или структурни промени в резултат на продължителното инкубиране при стайна температура.



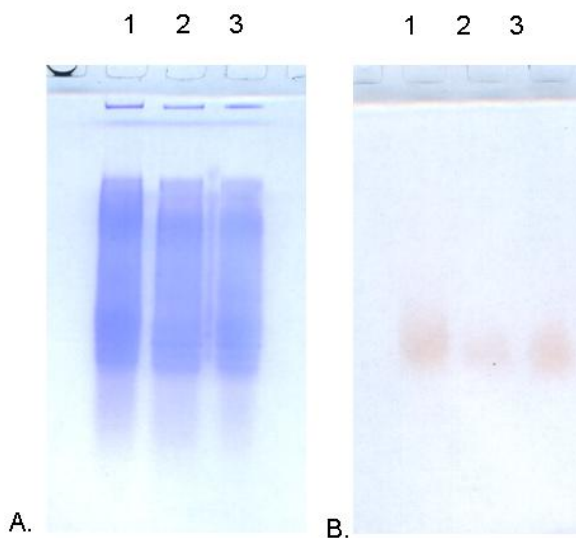
Фиг. 18. *o*-дифенолоксидазна активност при субстрат 8 mM катехол на HaH, активиран със субтилизин DY в отношение $E/S = 1/260$ (w/w)(-●-) и $E/S = 1/100$ (w/w)(-○-).

SDS-PAGE показва, че посредством лимитираната протеолиза са получени фрагменти от функционални единици и компоненти с по-ниска молекулна маса, което обяснява повишената активност в следствие на отваряне достъпа за молекулите на субстрата до активните центрове в молекулата на хемоцианина (фиг. 19).

Нативна електрофореза на проби от хемолимфа и хемоцианин от *H. aspersa*, третирани по идентичен начин със субтилизин демонстрира, че ензимната активност е съсредоточена само във фрагментите, които съдържат каталитичен център (Фиг. 20).



Фиг. 19. 10% SDS - PAGE: пътека 1 протеинови маркери със следните молекулни маси: овотрансверин (78.00 kDa), албумин (66.25 kDa), овалбумин (42.70 kDa), карбоанхидраза (30.00 kDa), миоглобин (16.95 kDa), цитохром с (12.38 kDa) (Merck); пътека 2 нативен HaH; пътека 3-8 HaH, проби след третиране със субтилизин DY [$E/S=1/100$ (w/w)], в продължение на 30 мин (3), 1 ч(4), 1.30 ч(5), 2 ч(6), 3 ч(7), и 4 ч(8), при 25 °C.



Фиг. 20. Нативна 10 % PAGE: **A:** пътека 1 хемолимфа от *Helix aspersa maximo*, третирана със субтилизин DY при съотношение [$E/S = 1/100$ (w/w)] за 1 час 30 мин; пътека 2 и 3 HaH, третирани със субтилизин DY [$E/S = 1/100$ (w/w)] за 1 ч 30 мин и 2 часа инкубационно време, съответно. **B:** Същия гел фиксиран с 20 mM катехол.

Абсорбционните спектри на активиран със субтилизин DY хемоцианин, показват характерната ивица при 345 nm, но с леко намален интензитет (данните не са показани). Следователно, настъпилите промени в резултат на ограничената протеолиза, не водят до нарушаване целостта на активните центрове в хемоцианиновата молекула. Флуоресцентният максимум на HaH, активиран със субтилизин DY [E/S = 1/100 (w/w)] за 1 ч. 30 мин. е изместен към 350 ± 1 nm (Фиг. 16). Изглежда, че след ограничената протеолиза някои триптофилови странични вериги се оказват „изложени” на повърхността на протеиновата молекула.

Проведен беше кинетичен анализ на *o*-дифенолоксидазната активност на HaH, след активиране със субтилизин DY [E/S = 1/100 (w/w)] за 1 ч. 30 мин., с увеличаване на концентрацията на катехол (от 1.0 до 20.0 mM). Високи нива на индуцирана активност бяха определени за HaH – V_{\max} се повиши до 803 ± 0.002 nmol min⁻¹ mg⁻¹ и $k_{\text{cat}} = 40.15$ min⁻¹ (Табл. 4). Ензимната активност на HaH, след активиране със субтилизин DY, е близо тридесет пъти по-висока, отколкото тази след протеолитично активиране на хемоцианините от *H. pomatia* ($k_{\text{cat}} = 1.4$ min⁻¹), *S. officinalis* ($k_{\text{cat}} = 1.5$ min⁻¹) и *R. thomasi* ($k_{\text{cat}} = 0.49$ min⁻¹). Разликата в нивата на протеолитично индуцирана активност може да се дължи на различните условия, при които е проведена ограничената протеолиза на съответните хемоцианини. Афинитетът на протеолитично активиран HaH към субстрат катехол е по-висок, отколкото афинитета на HaH в нативно състояние ($K_m = 6.8 \pm 0.2$ mM). Най-висок афинитет към субстрат катехол ($K_m = 2.6$ mM) е определен за β -HrH третиран със субтилизин.

След активиране със субтилизин DY, хемоцианинът от *Helix aspersa* прояви *o*-дифенолоксидазна активност и към по-обемистия субстрат L-Dopa. Най-висока беше активността на втория час ($v_i = 31 \pm 0.001$ nmol min⁻¹ mg⁻¹), след третиране със субтилизин в отношение E/S = 1/100 (w/w), при субстрат 9 mM L-Dopa. Резултатите от кинетичния анализ, след активиране посредством лимитирана протеолиза на HaH, с нарастваща концентрация на субстрата L-Dopa (от 2.0 до 22.0 mM) са обобщени в таблица 4.

Сравнението на кинетичните параметри, определени от анализа на *o*-дифенолоксидазна активност за хемоцианини от моллюсков организми, показват че повечето от тях проявяват сравнително ниска ензимна активност в нативно състояние.

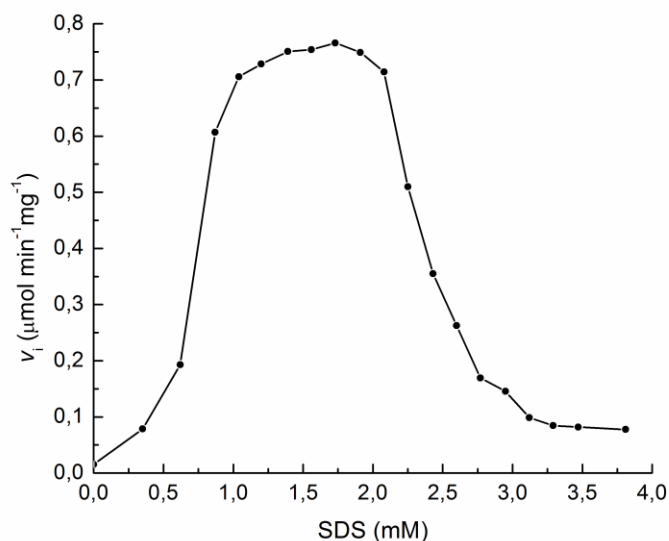
Предпочитаният субстрат при тези хемоцианини е катехол. Ензимната ефективност на нативен NaH ($k_{cat}/K_m = 0.093 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$), както и на повечето от изследваните хемоцианини, е ниска в сравнение с тази на фенолоксидаза, напр. тирозиназа от цефалопод *Illex argentinus* ($k_{cat}/K_m = 225 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Съществува, обаче, голяма разлика в концентрациите, в които присъстват в организмите фенолоксидази и хемоцианин. Пониската каталитична активност може да бъде компенсирана от високите концентрации на кислород-пренасящия протеин в хемолимфата на безгръбначни (10-50mg/ml).

Постигнатото, посредством ограничена протеолиза, 60-кратно увеличение на ензимната ефективност на NaH ($k_{cat}/K_m = 5.9 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$), ни стимулира да потърсим възможност за неговото приложение при създаване на биосензор за детекция на катехол.

6.3.2. Активиране на *o*-дифенолоксидазна активност на нативен NaH, посредством SDS.

Изследвана беше SDS-индуцирана фенолоксидазна активност на NaH и са анализирани съпровождащите конформационни промени в протеиновата молекула. Доказано е, че SDS в мицеларна концентрация (концентрация > 1 mM в 100 mM натриево-фосфатен буфер, pH 7.5) е възможно да предизвика оптимални конформационни преходи в протеина, които могат да доведат до отваряне на „достъпа“ при активния център за обемисти фенолни субстрати.

Ние изследвахме активирането на фенолоксидазната активност на NaH, използвайки различни концентрации на SDS (от 0.35 до 3.81 mM) и различни времена на инкубиране на хемоцианина с детергента. Най-висока степен на нарастване на *o*-дифенолоксидазната активност на NaH ($v_i \sim 0.75 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) към субстрат катехол, беше постигната след 3 минути инкубиране с SDS при концентрация от 1.04 mM до 2.08 mM (фиг. 21). Повисоките концентрации на SDS (> 2.08 mM SDS) най-вероятно повлияват каталитично активна конформация на активния център, тъй като индуцираната активност отново намалява (фиг. 21).

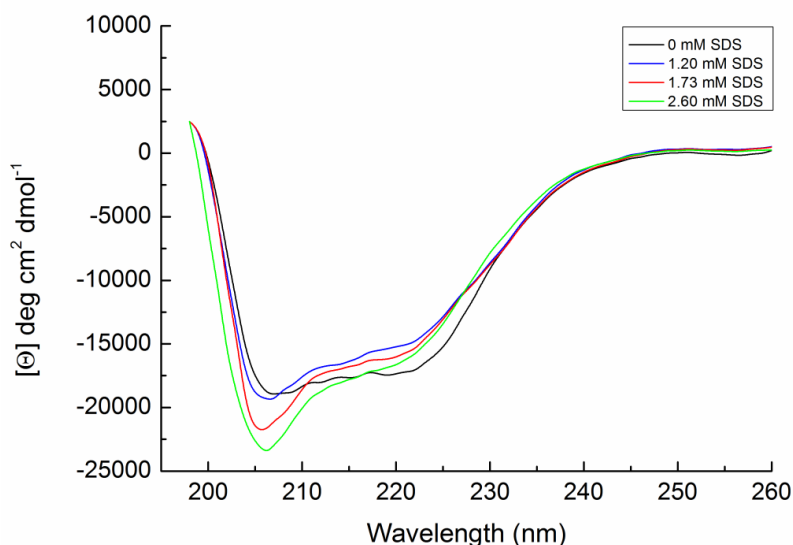


Фиг. 21. *o*-дифенолоксидазна активност на HaH към субстрат катехол, определена след 3 минути инкубиране с SDS при концентрация от 0.35 до 3.81 mM.

Конформационните промени в протеина, свързани с активирането посредством SDS бяха анализирани чрез различни биофизични методи: абсорбционна и флуоресцентна спектроскопия, кръгов дихроизъм в близката и далечна UV-област.

6.3.2.1. Ефект на SDS върху вторичната структура на HaH

Записани бяха спектрите на кръгов дихроизъм (CD) в далечната UV-област на спектъра, които са свързани с вторичната структура на протеините. Спектърът на нативен HaH показва две характеристични ивици при около 208 nm и 222 nm, дължащи се на α -спирална и β -листова структурата (фиг. 22). CD спектрите записани след 3 минути инкубационно време с различни концентрации на SDS (1.2 до 2.6 mM) при 25 °C, показват промени във вторичната структура, както се вижда от преместването на минимума при 208 nm към по-ниските дължини на спектъра (фиг. 22).



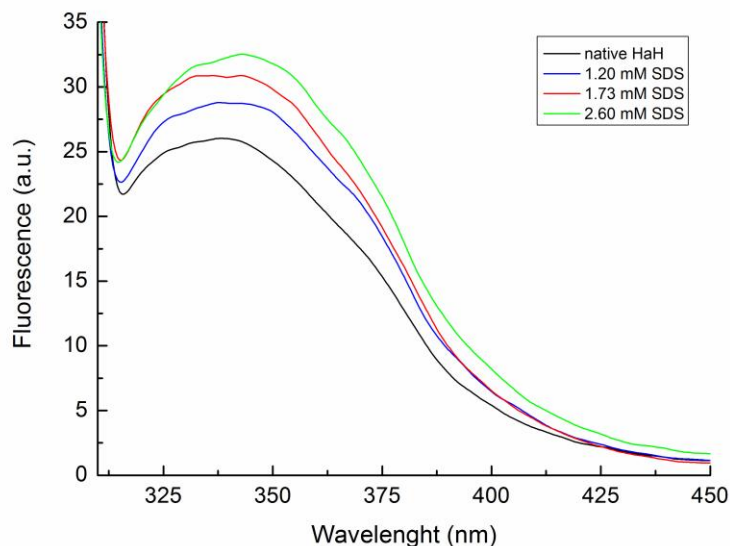
Фиг. 22. CD спектри в далечната UV област на NaH в 25 mM фосфатен буфер, pH 7.2, след инкубиране в продължение на 3 мин с различни концентрации на SDS (1.2 – 2.6 mM).

6.3.2.2. Ефект на SDS върху третичната структура на NaH.

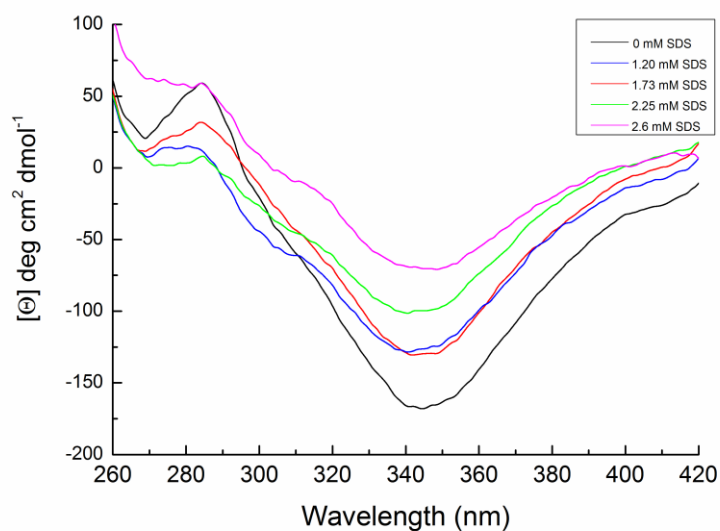
SDS-индуцирани промени в третичната структура на NaH, бяха проследени с флуоресценция и кръгов дихроизъм в близката UV-област. След възбуждане при 295 nm, флуоресцентният спектър на нативен NaH се характеризира с максимум при около $337 \pm$ nm, дължащи се на остатъци от триптофан „погребани“ в хидрофобната вътрешност на протеиновата молекула. При флуоресцентните максимуми на NaH, третиран с SDS (0.62 - 2.6 mM) в продължение на 3 минути, беше наблюдавано батохромно отместване, както и повишаване на интензитета на флуоресценция (фиг. 23).

Хемоцианини и фенолоксидази при свързан към активните центрове кислород, притежават характеристична спектрална ивица при ~ 345 nm. При свързване на молекула кислород CuI CuI се окислява до CuII CuII при съпътстваща редукция на O₂ до пероксид, кислородните атоми се свързват странично $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ към Cu (II) йоните. На активния център при хемоцианини се дължи характеристичния CD спектър в близката UV-област при 345 nm. Беше установен значителен спад на интензитета на ивицата при CD спектрите снети в близката UV-област (260 до 320 nm) за NaH, предварително третиран с SDS (1.2 – 2.6 mM) в продължение на 3 минути (фиг. 24) в съответствие с конформационни

промени, които променят микрообкръжението при поне част от ароматните остатъци на протеина.



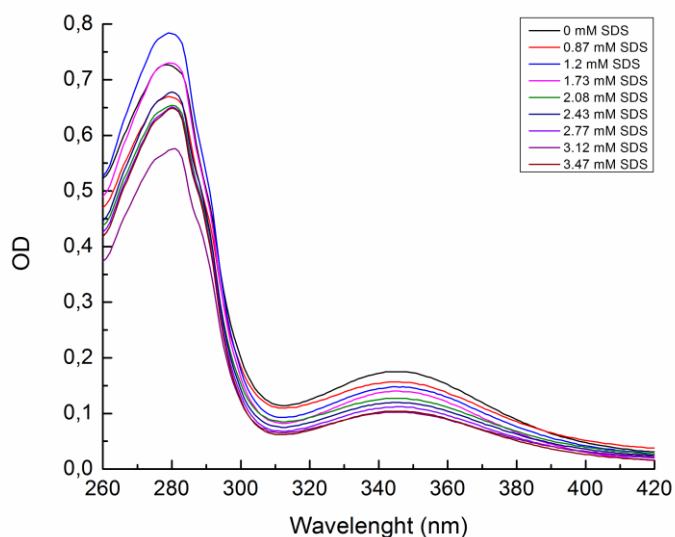
Фиг. 23. Флуоресцентни спектри на HaH в 25 mM фосфатен буфер, pH 7.2, след инкубиране в продължение на 3 мин с различни концентрации на SDS (1.2 – 2.6 mM).



Фиг. 24. CD спектри в близката UV-област (260 до 320 nm) на HaH в 25 mM фосфатен буфер, pH 7.2, след инкубиране в продължение на 3 мин с различни концентрации на SDS (1.2 – 2.6 mM).

Абсорбционните спектри на HaH при увеличаване на концентрацията (0.87 - 3.4 mM) SDS показват, че интензитетът на ивицата при 345 nm, леко намалява като функция от концентрацията на SDS (Фиг.25) Следователно, SDS-предизвиканите конформационни промени не оказват влияние върху целостта на активните центрове в хемоцианиновата молекула.

Въз основа на проведените изследвания установихме, че оптималните условия за активиране на ензимна активност в HaH са: 1.73 mM концентрация на SDS и време на третиране 3 минути.



Фиг. 25. Абсорбционни спектри на HaH в 25 mM фосфатен буфер, pH 7.2, след инкубиране в продължение на 3 мин с различни концентрации на SDS (0.87 – 3.47 mM).

6.3.2.3. Кинетичен анализ на ензимната активност на HaH след активиране с SDS.

Беше извършен кинетичен анализ на *o*-дифенолоксидазната активност на HaH, активиран с SDS, при субстрати катехол (от 0.1 до 1.2 mM), L-Dopa (от 0.5 до 12 mM) и допамин (от 0.015 до 0.3 mM). Кинетичните параметри V_{max} и K_m бяха изчислени посредством анализ на зависимостта на началните скорости от субстратната концентрация с използване на програмата Нурег. Данните са представени в таблица 5.

Беше постигнато повишаване на активността към субстрат катехол след третиране с SDS. V_{\max} се увеличи до $629 \pm 0.002 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, съответстващо на $k_{\text{cat}} = 31.45 \text{ min}^{-1}$ (табл. 5.). Ензимната активност на HaH, третиран с 1.73 mM SDS, е сравнима с тази, наблюдавана при протеолитично активиран хемоцианин ($k_{\text{cat}} = 40.15 \text{ min}^{-1}$) (таблица 4). Афинитетът на SDS-активиран HaH към субстрат катехол е по-висок ($K_m = 0.91 \pm 0.2 \text{ mM}$), отколкото този наблюдаван при нативен HaH ($K_m = 11.8 \pm 0.5 \text{ mM}$) и протеолитично активиран HaH ($K_m = 6.8 \pm 0.2 \text{ mM}$). Освен това, ензимната ефективност ($k_{\text{cat}}/K_m = 34.56 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) на SDS-активиран HaH към субстрат катехол е значително по-висока от тази, постигната чрез протеолиза ($k_{\text{cat}}/K_m = 5.9 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Този факт показва, че SDS-активиран HaH притежава дори по-висок потенциал за разработване на биосензори и проучванията в тази насока продължават.

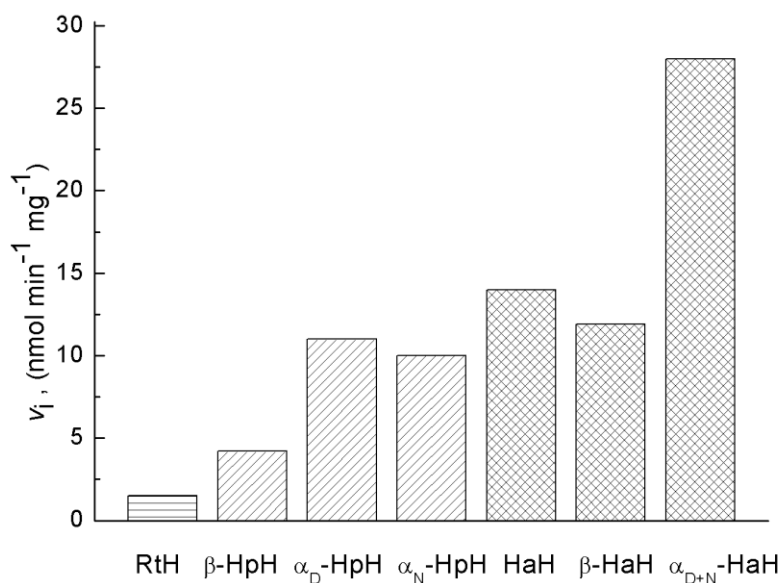
След активиране с SDS, HaH проявява ензимна активност дори към по-обемистите субстрати L-Dopa и допамин (табл. 5). Стойността на V_{\max} възлиза на $192 \pm 0.001 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, $k_{\text{cat}} = 9.58 \text{ min}^{-1}$. Константата $K_m = 15.26 \pm 0.98 \text{ mM}$ характеризират афинитета на SDS-активиран HaH спрямо субстрат L-Dopa. Най-висока ензимна активност и ензимна ефективност ($k_{\text{cat}}/K_m = 60.94 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) на SDS-активиран HaH след инкубиране в продължение на 3 минути с 1.73 mM SDS, беше постигната към субстрат допамин. Установено беше, че допамин е предпочитан субстрат за SDS-активиран хемоцианин от рак *C. pagurus* (таблица 2) и други хемоцианини от артроподни организми. Както споменахме по-горе, допаминът е важен метаболит при процеса на склеротизация и меланогенеза на епидермиса.

Въз основа на анализ на получените от нас експериментални резултати и литературните данни за хемоцианини от артроподни организми, ние предположихме съществуването на корелация между конформационна стабилност и проявяваната от тези протеини ензимна активност. При хемоцианините от гастроподни организми, обаче, не се наблюдава подобна зависимост. Тези кислород-пренасящи протеини не се различават в тяхната структурна организация – цилиндрична молекула, която е изградена от двадесет структурни субединици (дидекамер). Нещо повече, изследванията с помощта на ДСК показват, че всички изследвани гастроподни хемоцианини са термостабилни протеини с близки стойности на T_m от 80 – 84 °C.

Таблица. 5. Кинетични параметри на *o*-дифенолоксидазна активност на нативен и SDS-активиран хемоцианин от *Helix aspersa* maxima спрямо субстрати катехол, L-Dopa и допамин.

Хемоцианин	Катехол			L-Dopa			Допамин		
	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ min ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ min ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ min ⁻¹)
Нативен HaH	11.8	1.1	0.093	–			–		
SDS-активиран HaH	0.91±0.23	31.45	34.56	15.26±0.98	9.58	0.62	0.53±0.12	31.95	60.28

k_{cat} е изчислена за един активен център



Фиг. 26. *o*-дифенолоксидазна активност на хемоцианин от *R. thomasi* (RtH), изоформите на хемоцианин от *H. pomatia* (β -HpH, α_D -HpH, α_N -HpH), нативен хемоцианин от *H. aspersa maxima* (HaH) и неговите изоформи (β -HaH, α_{D+N} -HaH), изразена като начална скорост (v_i) на формиране на хинон при субстрат 8 mM катехол и концентрация на хемоцианин 0.5 mg/ml. Анализите са проведени в 25 mM фосфатен буфер, pH 7.2, при 25 °C.

Най-висока конформационна стабилност при повишена температура е показал β -HpH (T_m 84 °C), следван от RtH (T_m 83 °C) и HaH (T_m 80 °C). От друга страна хемоцианините показват различия в проявяваната от тях *o*-дифенолоксидазна активност – тези от видовете *Helix* катализират окислението на катехол с по-висока скорост от хемоцианина от *Rapana* (фиг. 26). Тези различия в ензимната активност най-вероятно са обусловени от различия в конформационната подвижност в областта на активните центрове.

7. Приложение на протеолитично-активиран HaH.

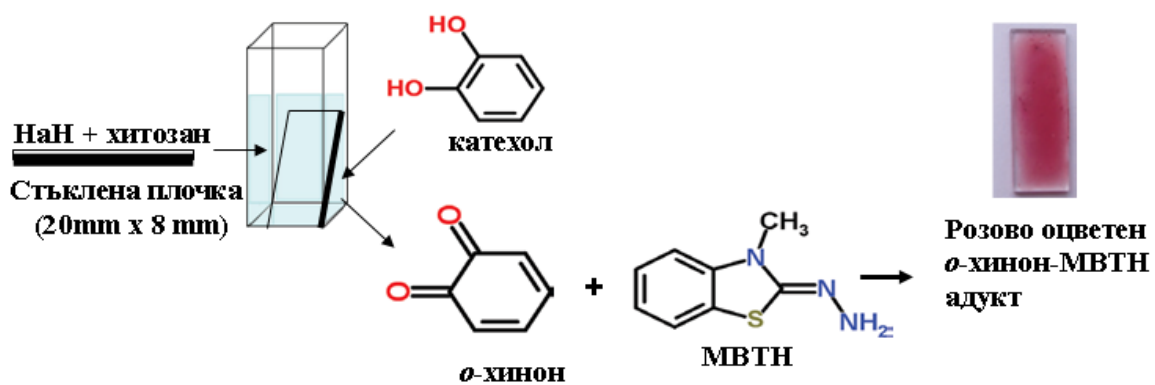
Ние създадохме образец на биосензор, въз основа на имобилизиран HaH (предварително активиран със субтилизин DY) във филм от хитозан, подобно на процедурата описана за имобилизирана тирозиназа.

7.1. Имобилизирание на NaN в хитозан.

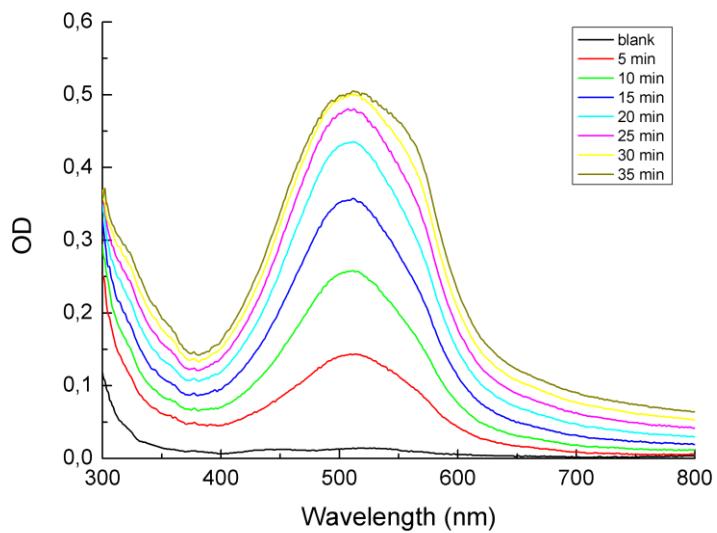
Хитозан е природен биополимер. Хитозан и модифициран хитозан имат силен афинитет към имобилизирание на биомолекули, като показват голям потенциал в приложение за получаване на биосензори. Филм от хитозан не поглъща ултравиолетова и видима светлина и е подходящ материал при оптична детекция. Приготвен беше 1 % (w/v) разтвор на хитозан (Sigma) в 50 mM оцетна киселина. Разтвор на NaN в 25 mM фосфатен буфер, рН 7.2, с концентрация 43 mg/ml, беше подложен на ограничена протеолиза със субтилизин DY [E/S = 1/100, w/w], в продължение на 1 час 30 мин (съгласно процедурата описана в 6.4.1). Приготвена беше хомогенна смес от горните два разтвора в отношение 1:1.

7.2. Приготвяне на биосензор.

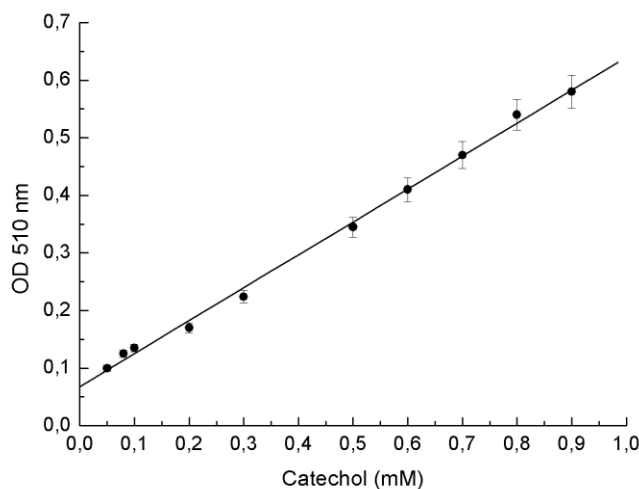
По 20 μ l от сместа (NaN/хитозан) беше нанесена под формата на много тънък филм върху стъклено препаративно стъкло (20 mm x 9 mm) и оставена да изсъхне при стайна температура. Така приготвения биосензор се поставя в кювета, съдържаща разтвор на катехол. Определянето на катехол е спектрофотометрично при 510 nm. На фиг. 27 е представена схема на принципа на работа с биосензора. Имобилизираният във филм от хитозан NaN катализира окислението на субстрата катехол. Полученият продукт *o*-хинон реагира с 0.2 mM МВТН, който присъства в кюветата и се получава специфично съединение с розов цвят.



Фиг. 27. Схема на принципа на работа с биосензора.



A.



Б.

Фиг. 28. А. Абсорбционни спектри на имобилизиран *HaN* в 1 % хитозан, в присъствието на 0.2 mM MBTH и 1 mM катехол. Спектрите са записани в интервал през 5 минути за 35 мин реакционно време. **Б.** Линеен отговор към катехол в концентрации, вариращи от 0.05 до 0.9 mM и време за реакция от 5 мин.

Наблюдавахме повишение на оптичната плътност при 510 nm във времето (фиг. 28 А). Пикът при 510 nm отсъства, когато в сензора няма хемоцианин (фиг. 28, бланк (контрола)). Биосензорът показва линеен отговор спрямо субстрат катехол при концентрации вариращи от 0.05 mM до 0.9 mM и реакционно време 5 мин (Фиг. 28Б).

Чувствителността на хемоцианиновия биосензор е 10 пъти по-висока от тази съобщена за други биосензори, напр. сензор на базата на имобилизирана. Като предимство при използването на хемоцианин трябва да се спомене негова значителна стабилност в сравнение с ензимите, които лесно се инактивират.

Благодарение на тези изследвания ние показахме, че *HaN* има потенциал за използването му в биосензори за количествено определяне на катехол във водна среда. Това са резултати от нашите първоначални опити за създаване на биосензор на базата на имобилизиран хемоцианин. Предстоят бъдещи изследвания върху възможностите за приложение на хемоцианина от *H. aspersa maxima* в тази насока.

ИЗВОДИ:

1. Получени са нови данни за структурната организация и конформационната стабилност на кислород-пренасящите протеини, изолирани от рак *Cancer pagurus* и охлюви *Helix aspersa maxima*.

2. Установено е, че нативен хемоцианина от рак *Cancer pagurus* (2 x 6 - мер) проявява *o*-дифенолоксидазна активност при субстрати катехол, L-Дора и допамин, докато нативен хемоцианин от рак *Limulus polyphemus* (LpH) (8 x 6 - мер) не проявява ензимна активност в нативно състояние. Кинетичният анализ показва, че най-специфичен субстрат за CpH е допамин ($K_M = 0.01$). Ензимната ефективност на CpH при субстрат допамин ($k_{cat}/K_M = 70.8 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) е значително по-висока от тази определена при другите субстрати.

3. Показано е, че посредством третиране на CpH с детергент SDS, ограничена протеолиза и повишаване на температурата, ензимната активност нараства в резултат на конформационни промени в протеина, които правят активните центрове по-достъпни за молекулите на субстрата.

4. Установено е, че съществува корелация между структурната стабилност на хемоцианините от артроподни организми и тяхната температурна стабилност, както и между конформационната стабилност и подвижност в областта на активните центрове и проявяваната от тези протеини ензимна активност.

5. Получена е нова информация за ензимната активност, която проявява хемоцианина от *Helix aspersa maxima* и неговите изоформи. Катехол е предпочитан субстрат за моллюсковите хемоцианини в нативно състояние. Посредством ограничена протеолиза на HaH със субтилизин DY е постигнато 60-кратно увеличение на ензимната ефективност на HaH ($k_{cat}/K_M = 5.9 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) при субстрат катехол.

6. Установени са оптимални условия на активиране на ензимната активност на HaH при третиране с детергент SDS (1.73 mM концентрация на SDS и време на инкубиране 3 минути), които водят до значително увеличение на ензимната ефективност на хемоцианина при субстрати катехол ($k_{cat}/K_M = 34.56 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) и допамин ($k_{cat}/K_M = 60.94 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

СПРАВКА ОТНОСНО ПРИНОСИТЕ 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 една важна група кислород-пrenaсящи протеини в безгръбначни, каквито са хемоцианините.

1. Получени са нови данни за структурната организация и конформационната стабилност на кислород-пrenaсящите протеини от представители на видовете *Arthropoda* и *Mollusca*, а именно рак *Cancer pagurus* и охлюв *Helix aspersa maxima*. Хемоцианините от тези организми са по-слабо изучени в структурно отношение в сравнение с тези, изолирани от други представители на съответните видове.

2. Детайлно е изследвана ензимната активност и субстратната специфичност на хемоцианина, изолиран от рак *Cancer pagurus*. Установено е, че третирането на СрН с детергент SDS, ограничена протеолиза и повишаване на температурата, води до нарастване на ензимната активност, в резултат на конформационни промени в хемоцианина, които правят активните центрове по-достъпни за молекулите на субстрата. Въз основа на анализ на експерименталните данни, за първи път е изказана хипотеза за съществуването на корелация между цялостната структурна стабилност на хемоцианините от артроподни организми и тяхната термична стабилност, както и между конформационната подвижност в областта на активните центрове и проявяваната от тези протеини ензимна активност.

3. Детайлно е изследвана ензимната активност и субстратната специфичност на хемоцианина, изолиран от охлюви *Helix aspersa maxima*. Постигнатото значително увеличение на ензимната ефективност на НаН, посредством ограничена протеолиза и третиране с SDS, разкрива възможност за приложение на ензимните свойства на хемоцианините. За първи път е създаден модел на биосензор, на базата на хемоцианин от *Helix aspersa maxima*, за количествен анализ на дифенол. С помощта на биосензора може да се бъде определена концентрация от $5 \cdot 10^{-5}$ М до $9 \cdot 10^{-4}$ М катехол във водна среда.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Raynova, Y., Idakieva, K., Doumanova, L. (2012) Enzyme properties of *Cancer pagurus* hemocyanin, Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci., 65, 3, 347-352.
2. Idakieva, K., Raynova, Y., Meersman, F., Gielens, C. (2013) Phenoloxidase activity and thermostability of *Cancer pagurus* and *Limulus polyphemus* hemocyanin, Comp. Biochem. Physiol. B, 164, 201-209.
3. Raynova, Y., Doumanova, L., Idakieva, K. (2013) Phenoloxidase activity of *Helix aspersa* maxima (garden snail, Gastropod) hemocyanin, Protein J., 32, 609-618
4. Raynova, Y., Todinova, S., Yordanov, D., Idakieva, K. (2014) SDS-induced phenoloxidase activity of *Helix aspersa* maxima hemocyanin, Bulg. Chem. Commun. , 46A, 111 – 116 .

УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ, КОНФЕРЕНЦИИ И СИМПОЗИУМИ:

- 2011г., IV-ти Пролетен семинар на младите учени и докторанти от БАН, доклад: Ю. Райнова, К. Идакиева, „Ензимни свойства на кислород-пренасящи протеини от артроподни организми”.
- 2011г., Microbiologia Balkanica 2011, 7th Balkan Congress of Microbiology, Belgrad, Serbia, постер: Y. Raynova, K. Idakieva, L. Doumanova, “Enzyme properties of *Cancer pagurus* hemocyanin”.
- 2012г., Third Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, Sofia. доклад: P. Genova-Kalou, Y. Raynova, K. Idakieva, “*In vitro* studies about the inhibition of the proliferation activities of some gastropodan hemocyanins”.
- 2012г., International Summer School Supramolecular Chemistry: Experimental and Theoretical Methods for Investigations, Sofia, постер: Y. Raynova, K. Idakieva, “Isolation and characterization of *Cancer pagurus* hemocyanin”.
- 2012г., FEBS Sofia School of Protein Science, постер: Y. Raynova, K. Idakieva, “Phenoloxidase activity of *Helix aspersa* hemocyanin”.

- 2013г., Microbiologia Balkanica 2013, 8th Balkan Congress of Microbiology, Veliko Tarnovo, Bulgaria, постер: Y. Raynova, K. Idakieva, L. Doumanova, “o-Diphenoloxidase activity of *Helix aspersa maxima* (gastropod) hemocyanin”.
- 2013г., Microbiologia Balkanica 2013, 8th Balkan Congress of Microbiology, Veliko Tarnovo, Bulgaria, постер: Y. Raynova, A. Marchev, L. Doumanova, A. Pavlov, K. Idakieva, “Antioxidant activity of *Helix aspersa maxima* (gastropod) hemocyanin”.
- 2014г., Семинар по екология, София, “Enzyme properties of *Helix aspersa maxima* hemocyanin”, доклад: Y. Raynova, K. Idakieva.

http://freyja.ecolab.bas.bg/~geri/WEBSITE/Program_abstract_all_za_pechat1.pdf

- 2014г., VII Пролетен семинар на младите учени и докторанти от БАН, доклад: Ю. Райнова, К. Идакиева, „Ензимни свойства на *Helix aspersa maxima* хемоцианин”.
- 2014г., XIII Национална конференция по химия за студенти и докторанти, София, „SDS-индуцирана фенолоксидазна активност в хемоцианин”, доклад: Ю. Райнова, К. Идакиева.

Забелязани цитати:

Idakieva, K., Raynova, Y., Meersman, F., Gielens, C. (2013) Phenoloxidase activity and thermostability of *Cancer pagurus* and *Limulus polyphemus* hemocyanin, Comp. Biochem. Physiol. B, 164, 201-209.

1. Coates, C.J., Nairn, J., Developmental and Comparative Immunology, 45, 1, 43-55, 2014.

Raynova, Y., Doumanova, L., Idakieva, K. (2013) Phenoloxidase activity of *Helix aspersa maxima* (garden snail, Gastropod) hemocyanin, Protein J., 32, 609-618

1. Coates, C.J., Nairn, J., Developmental and Comparative Immunology, 45, 1, 43-55, 2014.