

**СПРАВКА**  
**за научните и научно-приложните приноси в трудовете на**  
**д-р Румяна Пейнова Христова**

Приносите са базирани върху 19 от общо 21 научни публикации, 18 от които в западни списания и 3 в български (14 в списания с IF и 7 в списания без IF). Общият IF на научната продукция е 23.871, а IF за лично участие – 3.480.

Включени са изследвания в областта на биоорганичната химия, свързани главно с изучаването на структурата, функцията и стабилността на:

- високомолекулни белтъчни съединения – хемоцианини (Hcs), играещи ключова роля в биологичните процеси;
- супероксид дисмутази (SOD), притежаващи антиоксидантно действие.

Хемоцианините влизат в състава на хемолимфата на голям брой безгръбначни моллюсков и артроподни организми. Те са респираторни мед-съдържащи протеини, чиято първостепенна функция е преноса на кислород в тъканите. Наред с това някои от тях проявяват и ензимни свойства, доближаващи се до тези на тирозиназата и фенолоксидазата. Резултатите от тези изследвания са публикувани в 15 от научните трудове, 7 от които са съставна част на дисертацията за научна и образователна степен „доктор”.

Известна е пагубната роля на окси-радикалите върху живите организми, както и антиоксидантната роля на супероксид дисмутазите, което ги прави обект на сериозни проучвания и обстойни изследвания през последните 40 години. Проведени са изследвания върху структурата и стабилността на тази важна група биокатализатори. Получените резултати са представени в 4 от статиите.

**Обект на изследване са:**

1. Артроподни хемоцианини от вида Crustacea, подвидове Astacidea, с представител *Homarus americanus*; Brachyura – *Carcinus aestuari* (*Carcinus maenas*) и *Maia squinado*; Palinura – *Palinurus vulgaris* и вида Chelicerata, с представител *Limulus polyphemus*.

2. Молюскови хемоцианини от гастроподни организми - морският охлюв *Rapana venosa* (наричан в миналото *Rapana thomasi*), Keyhole Impet (KLH), изолиран от гигантския охлюв *Megatura crenulata* и градинския охлюв *Helix vulgaris*.

В активния център на изграждащите ги субединици са разположени два медни йона, свързващи обратимо молекула кислород. Наред с общите си характеристики, двата вида Hcs притежават и редица структурни различия [7].

Артроподните Hcs са хексамери или мултихексамери с молекулна маса от  $0.45 \times 10^3$  до  $3.9 \times 10^3$  kDa. Макромолекулата им е изградена от 6 полипептидни вериги (структурни субединици), асоциирани в хексамерни структури от по 1, 2, 4, 6 или 8 хексамерни блока.

Молюсковите Hcs представляват цилиндрични комплекси, изградени от 10 (декамери), 20 (дидекамери), или повече субединици, всяка съдържаща седем или осем функционални единици (FU) с молекулна маса 45-65 kDa. Средната молекулна маса на субединицата им е около 450 kDa, което е приблизително 1/20 от общата маса на молекулата ( $9 \times 10^3$  kDa).

3. Друг обект на изследвания са SOD, изолирани от фунгални щамове *Humicola lutea* 103, *Humicola lutea* 110 и *Aspergillus niger* 26, продуценти на Mn- и Cu/Zn- SOD.

Използвани са голям набор съвременни методи от областта на биоорганичната химия и биохимия за изясняване структурата и стабилността на белтъчната молекула и изследване функцията ѝ при различни условия с цел приложение в медицината.

### **Експериментите обхващат няколко основни направления:**

1. Изолиране и пречистване на протеините и на изграждащите ги структурни и функционални единици (FU).
2. Изследване на структурата, включващо определяне на молекулните маси на изследваните обекти, аминокиселинния състав и N-крайната аминокиселинна последователност и в частност пълната аминокиселинна последователност.

3. Изследване стабилизиращият ефект на калциевите и магнезиеви йони върху белтъчната молекула. Изучаване влиянието на медните йони в активния център и изследване на конформационната стабилност на молекулата, при въздействие на различни фактори.
4. Определяне въглехидратното съдържание на някои от изследваните обекти, както и местата на свързване на въглехидратните вериги.
5. Определяне на ензимната активност на моллюскови Hcs, чрез активиране с подходящи субстрати.
6. Изследване на антитуморния ефект на моллюскови Hcs.

## НАУЧНИ ПРИНОСИ

**1. Изолиране и пречистване на протеините и на изграждащите ги структурни и функционални единици (FU), при специфични за всеки протеин условия.**

**1.1.** Изолирани и пречистени са хемоцианини от артроподните организми: *Homarus americanus*, *Carcinus aestuari*, *Maia squinado*, *Palinurus vulgaris* [2] и *Limulus polyphemus* [11]. От тях чрез хроматографски методи, като: йонообменна хроматография, високоскоростна течна хроматография (FPLC) и течна хроматография с високо налягане (HPLC), са получени и пречистени структурни субединици: от Hc *H. Americanus* – 6 (Ha1 – Ha6) [4], *M. squinado* – 7 (Ms1 – Ms7) [5], *L. polyphemus* – 5 [11], *C. aestuarii* – 3 (Ca1 – Ca3) [3,12].

**1.2.** От моллюсковия Hc *Rapana venosa* са изолирани структурни субединици RvH1 и RvH2 и изграждащи ги функционални единици: RvH1-a, RvH1-f, RvH2-a и RvH2-e [10]. От Hc KLH са изолирани субединиците KLH1 и KLH2, както и FU KLH2-c [14].

**1.3.** За първи път са получени и охарактеризирани електрофоретично чисти, ензимни препарати Mn- и Cu/Zn- SOD от щам *Humicola lutea* 110. Доказано е, че Cu/Zn- SOD е около 80% от общата ензимна активност [8].

**1.4.** Получена е нова информация за необичайното локализиране на Cu/Zn-SOD при филаментозната гъба *Humicola lutea* 103, представител на нисшите еукариоти [15]. Доказано е наличието на този ензим в междумембранното пространство на митохондриите.

**1.5.** Изолирани и пречистени са Mn- и Cu/Zn- SOD от щама *Aspergillus niger* 26 [17].

**2.** Изследване на структурата включващо определяне на молекулните маси на изследваните обекти, аминокиселинния състав, N-крайната аминокиселинна последователност и в частност пълната аминокиселинна последователност.

За целта са приложени електрофоретични методи, Едманово деградиране, MALDI – секвениране.

**2.1.** Електрофоретично е установено, че молекулната маса на всяка от изолираните структурни субединици от артроподни Hcs е между 65 и 85 kDa [3-5,11].

**2.2.** Определени са аминокиселинният състав и N-крайната аминокиселинна последователност на изолираните и пречистени полипептидни вериги от артроподни Hcs [2,11,12] и е установено, че степента на идентичност, изчислена въз основа на тази последователност е по-ниска (50 - 75% [2]) в сравнение със степента на идентичност, определена от пълните аминокиселинни последователности, известни от литературни данни. Поради това, последователностите определени от аминокрая на веригите може да се използват, като тяхна специфична характеристика за идентифициране на отделните подвидове.

**2.3.** Определена е около 95% от аминокиселинна последователност на структурната субединица CaеSS2 (650 аминокиселинни остатъка), изолирана от Hc *Carcinus aestuari* и е доказана високата степен на хомоложност (30-70%) с други Hcs, представители на вида Crustacea. Получена е допълнителна

информация за структурата на протеина (високо съдържание на ароматни аминокиселини, брой дисулфидни групи и др.) [12].

**2.4.** Определена е молекулната маса, аминокиселинния състав и N- крайната аминокиселинна последователност на Mn- и Cu/Zn- SOD от *H. lutea* 110 и е доказана високата степен на хомоложност на ензима с други Mn-СОД-зи, изолирани от еукариотни организми [8].

**2.5.** Доказано е, че Cu/Zn- SOD *A. niger* е хомодимер с молекулна маса 30 кDa и чрез Едманово деградиране е определена пълната му аминокиселинна последователност [17]. Установено е, че всяка полипептидна вериги съдържа 153 аминокиселинни остатъка, а молекулната ѝ маса, определена посредством MALDI-MS и ESI-MS е 15 821 Da.

**2.6.** Установено е, че Mn- SOD *A. niger* е тетрамер с молекулната маса на всяка субединица 22 340 Da [17].

**2.7.** **За първи път** е изолиран и охарактеризиран природно гликозилиран ензим Cu/Zn- SOD от междумембранното пространство на митохондриите при еукариотни клетки [15].

**3. Изследване стабилизиращият ефект на калциевите и магнезиеви йони върху белтъчната молекула, с помощта на спектроскопски методи и електронен микроскоп. Изучаване влиянието на медните йони в активния център и изследване на конформационната стабилност на молекулата, при въздействие на различни фактори: температура, рН и денатуранти, чрез абсорбционна и флуоресцентна спектроскопия и кръгов дихроизъм (CD).**

**3.1.** С помощта на електронен микроскоп е **получена нова информация** за структурата на артроподните Hcs. Доказано е, че свързването на калциеви йони към хемоцианиновите агрегати и изолираните от тях структурни субединици, значително повишава стабилността им и води до асоцииране на субединиците. Установено, е че в стабилизиращ буфер с рН 7.0, съдържащ калциеви и магнезиеви йони, артроподните Hcs най-често се срещат под формата на

тетрамери (4x6), които след повишаване на рН до 9.5 се дисоциират до структурни субединици [4,5].

**3.2.** Известна е ролята на мед-свързващия център в молекулата, за биологичната функция на протеините. Доказано е, че системата мед-кислород гаси излъчването на триптофановите остатъци, локализирани в близост до активния център, които са източник на 73-87% от индоловата флуоресценция. [1]. Установено е, че отстраняването  $\dot{\epsilon}$  (апо-форма) води до увеличаване на квантовия добив на флуоресценция (Q) и отместване на емисионния максимум към по-големите дължини на вълната [1,4-6,11,14,17].

**3.3.** Проучена е ролята на триптофановите остатъци и влиянието на разстоянието им от активния център върху флуоресценцията на апо- и оксиформите на протеиновата молекула [12,14].

**3.4.** В резултат на проведените изследвания, в артроподните Hcs са идентифицирани от 6 до 8 триптофанови остатъка във всяка структурна субединица, групирани в три различни класа: **а)** триптофани „погребани” в хидрофобната вътрешност на протеина, недостъпни за гасители; **б)** триптофани с хидрофобно обкръжение, но достъпни за молекулите на разтворителя; **в)** триптофани разположени на повърхността на молекулата [1,4,6,11,12].

**3.5.** Установено е наличието само на 1 триптофанов остатък в Cu/Zn- SOD от *A. niger* (позиция 32 в модела на тридименционалната структура), отговорен за абсорбция в ултравиолетовата област при 280 nm и флуоресцентна емисия при 310-450 nm [17].

**3.6.** Чрез въздействието на гасители, като акриламид, цезиев хлорид и калиев йодид е изследвано специфичното разположение на триптофановите остатъци. Механизмът на гасене включва пренос на електрон от възбуденото индолово ядро към гасителя. Стойностите за константата на Щерн-Фолмер ( $K_{sv}$ ), служеща като маркер на триптофановата флуоресценция, са много по-ниски при молекулните агрегати, в сравнение с тези на изолираните от тях структурни субединици и свободен триптофан [4-6,11,12].

**3.7.** Получени са нови данни относно конформационната стабилност на Hcs и SOD, при различни рН стойности на средата. Титруването в алкалната и кисела област дава информация за различни паралелни процеси, протичащи в тези макромолекули [4-6,8,11,17].

**3.8.** Проследено е разгъването на белтъчната молекула при различни концентрации на гуанидин хидрохлорид и урея и чрез определяне на свободната енергия на стабилизация в разтвор ( $\Delta G_D^{H_2O}$ ) е потвърден стабилизиращия ефект на комплекса мед-кислород [1,3-6,11].

**3.9.** Температурното разгъване е подходящ и често използван подход за определяне на термодинамичните параметри, характеризиращи изследвания белтък, в частност стабилността му. Чрез проведени паралелни изследвания с метода на кръговия дихроизъм, проследяващ измененията на вторичната структура и абсорбционна и флуоресцентна спектроскопия, даващи представа за измененията на третичната структура, са определени термодинамичните параметри: свободна енергия  $E_a$ , критична температура  $T_c$  и средната температура на термично денатуриране  $T_m$ , както за цялата молекула, така и за изграждащите я структурни субединици [3-5,8,14,17].

**3.10.** Проучена е връзката между оксидативния и температурния стрес при щам *A. niger* 26 [13]. Установена е ролята на първите антиоксидантни ензими SOD и каталаза в защитата на спори от моделния щам срещу температурно въздействие. Доказана е повишена активност на двата ензима в зависимост от степента на стреса и времето на въздействие. Щам *A. niger* 26 синтезира Cu/Zn-SOD и не променя изоензимния си профил след въздействие с висока температура.

**4.** Определяне въглехидратното съдържание на някои от изследваните обекти, както и местата на свързване на въглехидратните вериги, чрез съвременни методи, като: капилярна електрофореза, електроспрей-йонизационна мас-спектрометрия (ESI-MS), MALDI-MS и прилагане на различни ензимни методи.

**4.1.** Потвърдена е концепцията за гликозилираната природа на повечето хемоцианини, както и съществуващите разлики във въглехидратното съдържание и монозахаридния им състав. От литературни данни е известно, че при моллюсковите Hcs техният дял е между 2 и 9%, а при артроподните между 0.1 и 2.0%.

**4.2.** Доказано е наличието на въглехидратни структури в артроподния Hc *C. aestuarii* (1.6%), а също така и мястото им на свързване към основната полипептидна верига (три O-свързващи центъра и един N-свързващ център). Установено е необичайно високо за артроподните Hcs въглехидратно съдържание (6.3%) в едната от структурните му субединици – Ca2 (CaеSS2) [9].

**4.3.** Опеделено е въглехидратното съдържание на 2 функционални единици (RvH1-a и RvH1-f), изолирани от едната структурната субединица на Hc *R. venosa* (RvH1). Установено е наличието на две N-свързани въглехидратни структури във FU RvH1-a и една във FU RvH1-f [10].

**4.4.** За първи път е доказана гликозилираната природа на фунгална Cu/Zn-SOD от *Humicola lutea* 110 и е установено, че тя е локализирана в цитозола и митохондриите [8].

**4.5.** За първи път е доказана гликозилираната природа на Cu/Zn-SOD, локализирана в междумембранното пространство на митохондриите [15].

## **5. Определяне на ензимната активност на моллюскови Hcs, чрез активиране с подходящи субстрати.**

Интерес представлява факта, че хемоцианините имат сходна структура и функция с фенолоксидазите. Връзката между тях е базирана на сходството както в кислород-свързващия център, така и по отношение на физикохимичните им свойства и активиране на ензимната им активност, чрез разкъсване на N- или C-края със серинови протеази. Докато функцията на хемоцианините е свързана основно с транспортиране на кислород без промяна в структурата им, то при фенолоксидазите кислородната молекула участва в протичане на химична реакция. Тирозинази/фенолоксидази са открити във всички организми и са



включени в различни биологични функции. Те са в основата на синтеза на меланина. До сега са открити са два типа тирозинази, като единият тип (катехолоксидази) е специфичен за моллюсковите хемоцианини.

**5.1.** За първи път е доказана дифенолоксидазната активност на моллюсковите Hcs *Rana venosa* и *Helix vulgaris*, чрез проследяване кинетиката на процеса, след активиране с различни концентрации на *o*-diphenol и L-dopa (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine), като субстрати [16].

**5.2.** Установено е, че тези Hcs се активират в по-голяма степен в сравнение с артроподните Hcs, което се дължи на различията в структурата им.

**5.3.** С помощта на електронен микроскоп е потвърдена хипотезата за влиянието на активния център върху ензимната активност на хемоцианините и са обяснени различните отнасяния на Hcs към ензимно активиране не само между представителите на отделните видове, но и между изграждащите ги структурни субединици [16]. Докато Hc *H. vulgaris* показва ензимна активност по отношение на двата използвани субстрата, то Hc *R. venosa* се активира само след въздействие на *o*-diphenol.

**5.4.** Установено е, че ензимната активност на молекулата на Hc *R. venosa* се дължи изключително на едната му структурна субединица - RvH1. Другата субединица – RvH2 не проявява ензимни свойства, което е характерно и за други представители на Hcs [16].

## **6. Изследване на антитуморния ефект на моллюсковите Hcs.**

Известно е, че някои моллюсковите хемоцианини са мощни туморни антигени, най-вероятно поради високото им въглехидратно съдържание и специфична монозахаридна композиция. Хемоцианинът KLN е обект на научни изследвания повече от 30 години, поради значителните му имуностимулиращи свойства върху хуморалния и клетъчен имуноен отговор при животни и човек. Намира приложение като компонент в разработването на дендритно-клетъчни антитуморни ваксини, като фактор ускоряващ зреенето на дендритните клетки и в съвременната имунотерапия на злокачествени заболявания. KLN се прилага

клинично самостоятелно като терапевтичен агент при тумори на пикочния мехур поради обстоятелството, че съдържа монозахаридни последователности наподобяващи епитопи на туморни антигени от този вид тумор. Поради това имунитетът изграден при неговото инжектиране на пациенти е кръстосано реактивен с туморните антигени на пикочния мехур. KLH се използва като носител на малки антигенни молекули - белтъци, хормони, полизахариди, антиидиотипни антитела в създаването на синтетични ваксини срещу някои тумори.

**6.1.** Изследван е ефектът на Hc *Rapana venosa* върху антитяло-зависимата клетъчна цитотоксичност (ADCC) на лимфоцити от хамстери с прогресиращ миелоиден тумор. Установен е 3-5% по-висок стимулиращ ефект на този Hc, в сравнение с ефекта от Hc KLH [18].

**6.2.** Доказано е, че Hc *R. venosa* стимулира матурацията на дендритните клетки, атакува директно туморните клетки и стимулира продукцията на цитокини.

**6.3.** Установена е временна имуновъзстановяваща и имуностимулираща активност на Hc *R. venosa* върху функциите на далачни лимфоцити от Grafi тумор-носеци хамстери [18].

**6.4.** Изследван е стимулиращият ефект на Hcs *Rapana venosa*, *Helix vulgaris* и KLH върху имунната система на животни с асцитен тумор на Guerin. Установено е, че Hcs *R. venosa* и KLH стимулират популацията на Т-лимфоцитите, докато *H. vulgaris* – В-клетъчната популация (хуморалния имунитет), което вероятно се дължи на разликите в свързването на въглехидратните вериги (О-гликозилирани при *H. Vulgaris* и N-гликозилирани при KLH) [21].

## **НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ**

**1.** Разработена е методика за изолиране и пречистване на хемоцианини, супероксид дисмутези и изграждащите ги структурно-функционални единици в лабораторни условия, което представлява първа стъпка към по-нататъшното им изследване и охарактеризиране.

2. Изграден е набор от методи за изследване молекулната стабилността на хемоцианини и супероксид дисмутази и за проследяване на конформационните промени, настъпващи в нея, като резултат от различни въздействия, което е принос в изясняване на един от основните проблеми в съвременната биоорганична химия - проблема за връзката между структура и функция.
3. Разработен е нов метод за идентифициране и охарактеризиране на въглехидратното съдържание и специфичната монозахаридна композиция в молекулата на хемоцианините, на които най-вероятно се дължат имуностимулиращите им свойства.
4. Разработен е метод за доказване на общите ензимни отнасяния на моллюсков хемоцианини с тирозинази и фенолоксидази.
5. Разработена е схема за третиране на експериментални животни с Hcs *Rapana venosa* и *Helix vulgaris*, с цел доказване на имуностимулиращите им свойства и протективен ефект срещу миелоиден тумор на Grafí и асцитен тумор на Guerin, което е крачка в доказване на терапевтичния му ефект и приложение в медицината.

### **УЧАСТИЕ В НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ**

Представените научни и научно-приложни приноси са резултат от участие на Р. Христова в разработване на проекти, финансирани от МОН и международни организации, като: DLR, NATO, ЕБР, DAAD в сътрудничество с учени от Германия – Университета в гр. Тюбинген, Белгия – Университета в гр. Гент и Италия – Университета в гр. Падуа.

### **Членство в научни организации**

Съюз на учените в България, секция „Биохимия, биофизика и молекулярна биология”

Дружество по алергология в България