

## Авторска справка на научните приноси във всички трудове

По-долу е изложена авторска справка за основните приноси в представените научни трудове. В квадратни скоби след всеки принос са отбелязани номера, които адресират изследването, довело до приноса. Номерацията съответства на номерацията на трудовете в списъка с всички научни трудове на кандидата. Приносите са обобщени в 4 направления.

### I. Систематични изследвания на влиянието на външни фактори върху кристализацията на белтъци.

I. 1. Изследване на влиянието от прилагането на **външно електрично поле** към експериментални кристализационни системи (*феритин, апоферитин*), които са конфигурирани като течна капка по парнодифузионния метод за кристализация на белтъци. Показано е, че електричното поле възбужда устойчиви конвективни потоци в капката, което води до повлияване на зародишообразуването на белтъчните кристали. Предположено е, че съществува оптимална скорост на конвективните потоци, при която скоростта на зародишообразуване е максимална. [2]

I. 2. Изследване на кристализацията на белтъци (*феритин, апоферитин, лизозим*) в условия на **хипергравитация** в ниския килогравитационен диапазон. Разработен е експериментален метод, който притежава следните основни предимства:

- Разделяне на процесите на зародишообразуване на белтъчни кристали от тези на последващ растеж на кристалната фаза. Това се постига и контролира чрез манипулация на центробежните импулси по отношение на тяхното времетраене и големина на ускорението, което действа върху белтъчните молекули в разтвора. Използването на ускорена седиментация води до локално повишаване на концентрацията на макромолекулите и респективно пресищането във водния кристализационен разтвор. [3, 6, 11, 15, 17]

- Използване на малки обеми белтъчен разтвор (*няколко десетки микролитра*), предвид високите цени на търговските белтъчни субстанции. Това се постига чрез съобразен дизайн на кристализационните съдове, които в случая представляват стъклени тръбни капилляри. [3, 6, 11, 15, 17]

- Разделяне на белтъчните макромолекули в разтвори на разнородни (*феритин и лизозим*) или еднородни (*феритин и апоферитин*) многокомпонентни системи, с последваща кристализация на желания белтъчен компонент. [5, 11]

- Предоставя възможност за анализ на радиалното разпределение на хетерогенно зародени кристали чрез пряка съпоставка между адхезията на кристалите и действащата върху кристалите центробежна сила. [4, 11]

**I. 3.** Изследване на кристализацията на моделни белтъци (*феритин, инсулин*) в условия на **температурен градиент** (*създаден посредством термоелектрически охладител и нагревател*) в кристализационния разтвор. Показано е, че този метод може да служи за бърза оценка на кристализационни условия, тъй като разтворимостта на повечето белтъци е силно зависима от температурата. Дори и в случаи на слаба температурна зависимост на разтворимостта е демонстрирано, че методът може да осигури важни първоначални данни за кристализационното поведение на белтъците. [1, 14, 21]

## **II. Систематични изследвания на кристализацията на инсулин в моделни и физиологично-релевантни условия.**

Разработена е моделна експериментална система, която има за цел *in-situ* изучаване на кристализацията и разтварянето на инсулинови кристали в условия, наподобяващи *in-vivo* системите. Показано е, че човешката кръвна плазма винаги повишава най-силно (*в сравнение с всички други използвани течности за обтичане*) скоростта на разтваряне на инсулиновите кристали, независимо от това в каква кристална форма са получени последните (*тригонална, моноклинна, тетрагонална, кубична*). Използването на стабилизиращи кристалите компоненти в разтвора или промяната на други фактори (*pH, температура, скорост на обтичане, химичен състав*) води до възможност за прецизно контролиране на скоростта на разтваряне на кристалите. [9, 12]

## **III. Изследвания на процеси на агрегация, зародишообразуване и растеж на белтъчни кристали в разтвори.**

**III. 1.** Разработен е експериментален подход, който позволява моделирането на зародишообразуването като Поасонов процес. От измерване на експерименталните вероятности за откриване на кристал са изчислени скоростите на зародишообразуване за набор от пресищания в разтвори на лизозим. Пресметнати са и редица други величини на зародишообразуването, като размер на зародиш, кинетичен фактор, термодинамичен фактор, ефективна свободна повърхностна енергия, работа за зародишообразуване, време за израстване на кристалите до минимални за отчитане размери. Предложена е формула за изчисляване на вероятност за образуване на кристал в произволен обем на експерименталната система и за произволно вещество. [13]

**III. 2.** Направен е паралел между зародишообразуването на белтъчни кристали и постъпковата линейна неразклонена полимеризация. Показано е, че при малки времена за асоциация на молекулите малките клъстери следва да доминират в системата, независимо от пресищането, като тези клъстери са най-многобройни

при високите пресищания. Тъй като критичните клъстери при зародишообразуването на белтъци обикновено съдържат малък брой молекули и предвид зависимостта на големината на критичния клъстер от пресищането, това разглеждане частично обяснява и много по-малките времена за зараждане на кристали при големи пресищания. [7]

**III. 3.** Разгледана е кристализацията на лизозим от гледна точка на съществуването на растежни единици, които се различават от мономерите. Изчислено е разпределението на молекулните клъстери като функция от произволна обща белтъчна концентрация и съобразно съществуващ модел за двучастичково равновесно агрегиране. Съпоставката с експериментални резултати за измерени линейни скорости на кристален растеж води до заключението, че мономерът не е предпочитаната растежна единица в разтвори с високо пресищане (*висока концентрация на белтъчни молекули*). Като най-вероятна растежна единица е установен лизозимният тетрамер. Тъй като тетрамерите са доминиращият олигомер за изследвания интервал от пресищания, е предположено, че кристалният растеж се ръководи от олигомера с най-голяма обемна фракция в разтвора. На основата на експериментални резултати е показано, че най-малкият критичен клъстер не може да бъде съставен от по-малко от 4 лизозимни молекули. [20]

**III. 4.** Установено е, че зародишообразуването в кристалizacionни разтвори на инсулин протича предпочитано в обема на разтвора, а не в области от разтвора, където съществуват и фазови граници (*например стъкло/разтвор, разтвор/въздух, стъкло/разтвор/въздух*). Предположено е, че това се дължи на наличието на хетерогенни нуклеанти в обема на разтвора (*молекулни олигомери, агрегати, разнородни белтъчни или небелтъчни компоненти*). Изчислената работа за зародишообразуване е от един и същ порядък за различните случаи на зародишообразуване, но се оказва близо два пъти по-ниска за зародени в обема на разтвора кристали. [10]

**III. 5.** При систематично изследване на кристализацията на инсулин чрез титрационен анализ е показано, че агрегационното и кристалizacionното поведение на белтъците може силно да зависи от начина, по който се приготвя многокомпонентната система (*ред на добавяне и количество на химичен компонент*), тъй като от него зависи доброто контролиране на важни кристалizacionни параметри като рН на разтвора например. Използваният подход позволява и по-добро следене на възможните обратими или необратими фазови преходи в белтъчната система, в рамките на постоянни други условия. [19]

#### **IV. Изследвания на кристализацията на белтъци в присъствие на макромолекулни онечиствания, хомогенни и хетерогенни кристални фази.**

Разработен е експериментален метод за нарастване на единични кристали от еднородни белтъци, които са съставени от отделни кристални фрагменти

(*апоферитин и феритин*). Методът доказва, че за образуването на белтъчна кристална фаза са от значение единствено външните области на белтъчната молекула (*в частност тези, които са отговорни за образуването на кристалните контакти*). Демонстрирано е, че при подходящ набор от условия и чрез заместване на първоначалната матерна течност с нова, съдържаща втория белтък, в една единствена система могат да бъдат получени кристали от два разнородни белтъка, при които дори може да се наблюдава хетерогенно зародишообразуване, което е предпочитано пред хетерогенното зараждане на белтъчните кристали върху стъклена подложка. Чрез допълнителна промяна на кристализационни условия е показано, че може да бъде контролирана появата на кристали само от един вид белтък в присъствие на друг, хетерогенен белтък, както и да бъдат предизвикани друг тип фазови преходи (*тежка аморфна преципитация, течно-течно фазово разделяне*). Наличието на други органични (*валин*) или неорганични (*зеолити*) хетерогенни добавки с кристална структура също може да повлияе процеса на зародишообразуване при белтъчните кристали. [5, 8, 16, 18]