

ПРОЕКТ

за бъдещо научно и кариерно развитие на инж. Ася Влкимирова Даскалова,
асистент в лаб. „Химия и биофизика на протеини и ензими“

Тема: Доказване на структурата на хемоцианини от молюски чрез ензимна хидролиза с дрожди
Saccharomyces cerevisiae

Анотация

Едни от представителите на кислород-пренасящите металопротеини са хемоцианините, които се съдържат в хемолимфата на мекотели и членестоноги. Те представляват голям интерес за науката и медицината поради тяхната комплексна четвъртична въглехидратна структура и имуностимулиращи, антимикробни, антивирусни и антитуморни свойства [1, 2, 3, 4]. Хемоцианините притежават сложна структура и са разделени в два основни класа: хемоцианини от мекотели и хемоцианини от членестоноги. В литературата са представени структурите на хемоцианини от членестоноги: *Limulus polyphemus* [5, 6], *Carcinus aestauri* [7, 8], *Eriphia verucosa* [9] и др., както и на мекотели - черноморска рапана *Rapana venosa* [10], градински охлюв *Helix aspersa* [11] и др. Те се различават съществено във въглехидратното съдържание и структури. Доказано е, че хемоцианини от мекотели имат по-високо въглехидратно съдържание и сложни структури в сравнение с хемоцианини от артроподи [7].

С цел характеризиране на четвъртичната структура на хемоцианин от мида *Haliotis tuberculata* ще бъде приложен нов подход за доказване на въглехидратната им структура. Това ще бъде постигнато чрез култивиране на дрожди *Saccharomyces cerevisiae* в хранителна среда, съдържаща хемоцианин от *H. tuberculata*. Изказана е хипотеза, че дрождите продуцират ензими - гликозидази, които разграждат въглехидратните връзки в комплексните структури на гликаните в хемоцианините [10].

Изследванията попадат в тематично направление 3 „Индустрия за здравословен живот и биотехнологии“ на ИСИС 2020, както и в няколко от направленията на НСРНИ 2017-2030, а именно здраве, опазване на околната среда, нови и зелени технологии.

Текущото изследване ще бъде включено в дисертационния труд на асист. инж. Ася Даскалова и ще допринесе за кариерното ѝ развитие. Също така проектът е с научно-приложен характер и има за цел да бъдат разработени нови продукти за козметичната и/или фармацевтична индустрия.

Работен план за бъдещата изследователска работа и кариерно развитие

Работата по темата ще бъде организирана в четири Работни пакета (РП) и задачи в изпълнение на изследователския проект:

РП 1. Изолиране и пречистване на хемоцианин и изоформите му от мидата *H. tuberculata*

1. Събиране на хемолимфа от мида *H. tuberculata* и изолиране на хемоцианина (HtH).
2. Изолиране на структурни субединици от HtH чрез йонообменна хроматография с FPLC и HPLC системи.
3. Определяне електрофоретично на чистотата и молекулната маса на изолираните фракции, и протеиново съдържание по метода на Bradford.

РП 2. Определяне на структурата на хемоцианина след култивиране на дрожди *S. cerevisiae*

1. Култивиране на дрожди *S. cerevisiae* в присъствие на хемоцианин и субединици от HtH.
2. Изолиране и характеризиране на получени фрагменти след култивиране *S. cerevisiae* в присъствие на HtH чрез FPLC и HPLC системи.

РП 3. Структурно характеризиране на получените фракции

1. Установяване на молекулните маси на получените фракции след култивиране на *S. cerevisiae* в присъствие на HtH

- Провеждане на 10 % SDS PAGE електрофорези
- Провеждане на масспектрометрични анализи чрез MALDI TOF/MS
- Определяне на N-крайни аминокиселинни последователности на получените фракции

2. Идентифициране на гликозилираните фрагменти посредством орцинол/ H_2SO_4 тест.

3. Обобщаване на резултатите и сравняването им с резултати от вече получени данни по конвенционални методи.

РП 4. Разпространение на резултатите

1. Подготовка на публикация по темата на изследването.

2. Представяне на резултатите от изследванията в доклади и/или презентации на Национални и международни форуми.

3. Участие в подготовка на проектно-предложение, свързано с тематиката.

4. Оформяне на отчет по тематиката.

Използвана литература:

1. Dolashki et al. "Antitumour activity of *Helix* hemocyanin against bladder carcinoma permanent cell lines." *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33:1 (2019) 20-32.

2. Kizheva et al. "Antibacterial activity of crab haemocyanin against clinical pathogens. " *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 33:1, (2019) 873-880.

3. Dolashka-Angelova et al. "Immunological potential of *Helix vulgaris* and *Rapana venosa* hemocyanins." *Immunological investigations* 37.8 (2008): 822-840.

4. Nesterova et al. "Antiviral activity of hemocyanin isolated from marine snail *Rapana venosa*." *Antiviral Research* 90.2 (2011): A38

5. Dolashka-Angelova et al. "Structure and stability of arthropodan hemocyanin *Limulus polyphemus*." *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 61,6 (2005): 1207-17.

6. Martinet al. "Limulus polyphemus hemocyanin: 10 A cryo-EM structure, sequence analysis, molecular modelling and rigid-body fitting reveal the interfaces between the eight hexamers." *Journal of molecular biology* 366,4 (2007): 1332-50.

7. Dolashka-Angelova et al. "Carbohydrate composition of *Carcinus aestuarii* hemocyanin." *Archives of biochemistry and biophysics* 389.2 (2001): 153-158.

8. Dolashka-Angelova et al. "Structure of hemocyanin subunit CaeSS2 of the crustacean Mediterranean crab *Carcinus aestuarii*." *Journal of biochemistry* 138.3 (2005): 303-312


9. Dolashki et al. "Structure and characterization of *Eriphia verrucosa* hemocyanin." *Marine Biotechnology* 17.6 (2015): 743-752.

10. Dolashka-Angelova et al. "A challenging insight on the structural unit I of molluscan *Rapana venosa* hemocyanin." *Archives of biochemistry and biophysics* vol. 459,1 (2007): 50-8.

11. Georgieva et al. "Hemocyanins from *Helix* and *Rapana* Snails Exhibit in Vitro Antitumor Effects in Human Colorectal Adenocarcinoma." *Biomedicines* 8.7 (2020): 194.

Дата: 03.02.2021

Изследовател:


/ ас. Ася Даскалова /

Аз, долуподписаната проф. дн.Павлина Долашка декларирам, че кандидатът Ася Даскалова е вече назначен в звеното като допълнителното и възнаграждение съобразено с изискванията на програмата.

Дата: 03.02. 2021

Научен ръководител:

/ проф. дн Павлина Долашка /
