

DOBRODOŠLI V SVETU TOKSINOV

Ustanovitelj katedre za biokemijo je mednarodno priznani toksinolog in dolgoletni profesor biokemije na Oddelku za biologijo, **prof. dr. Drago Lebez**. Začetki katedre so bili zelo skromni, saj je imela katedra na razpolago le en prostor na hodniku 4. nadstropja Filozofske fakultete, kjer je dolga leta gostovala večina Oddelka za biologijo. Tudi opreme v tistem zasilnem lesenem boksu praktično ni bilo.



Sproščeno vzdušje v laboratoriju za biokemijo na Krekovem trgu v osemdesetih letih prejšnjega stoletja.

Razvoj katedre in zaposleni

Pa vendar je katedra rastla, kmalu sta si ji pridružila tudi sedanji prorektor UL **prof. dr. Peter Maček** in sodelavec današnjega Nacionalnega inštituta za biologijo **doc. dr. Bojan Sedmak**. Po nekaj letih je katedra dobila nove prostore v pritličju nekdanjega poslopja Biotehniške fakultete na Krekovem trgu 1, kjer je danes Teološka fakulteta. V teh prostorih je katedra doživela pravi razcvet, čeprav so bili prostori še vedno dokaj skromni. Takrat se je katedri kot mlad stažist priključil tudi njen sedanji predstojnik **prof. dr. Tom Turk**. Veliko tehničnih izboljšav in konstrukcij nove opreme (npr. kromatografskih kolektorjev, kolon in peristaltičnih črpalk) smo naredili kar sami in večinoma so te naprave, na splošno začudenje, zadovoljivo delovale. Pri teh delih je prednjačil dr. Sedmak, ki pa je seveda velikokrat tudi marsikaj pokvaril. Da se ne bi za tiste čase dragocena oprema preveč kvarila, so z njo lahko delali le "posvečeni". Velikokrat je bilo tako, da je diplomant sedel zraven edinega spektrofotometra, asistent pa je v strahu za kivete, sam opravljal meritve. Na

katedri nas je bilo v začetku šest, poleg že omenjenih tudi **prof. dr. Mojca Narat**, ki danes dela na Oddelku za Zootehniko, kjer vodi imunološki laboratorij ter tehnična sodelavka **Lidija Matičič**, zdaj zaposlena na Nacionalnem inštitutu za biologijo. To so bili časi, ko smo delali v zasilnih prostorih s skromno opremo, veliko improvizacije in malo denarja. A vendar je bilo to lepo obdobje, bili smo mladi in polni načrtov. Tudi zabav v tistih prostorih ni manjkalo. Včasih so se zavlekle pozno v noč. Profesor Lebez je kaj kmalu odšel v pokoj, mi pa smo se morali zaradi selitve Biotehniške fakultete pod Rožnik, na Krekovem trgu skupaj z genetiki preseliti nadstropje višje. Spet je bilo treba vse razmontirati in ponovno sestaviti. Vaje smo imeli v nezakurjenih prostorih. Lahko bi rekli, da če si takrat potreboval poskusno žival, si jo lahko počakal kar na hodniku, saj so se po njih veselo podile podgane. V novo, a skoraj popolnoma nedograjeno stavbo Biološkega središča, smo se vselili leta 1993. Tako smo se spet znašli na gradbišču, v nove prostore smo tako hodili kar po zidarskih lestvah. Dobro leto kasneje je bil zahodni trakt v celoti končan in življenje se je počasi normaliziralo. Od takrat je minilo več kot 13 let in v tem času se je katedra kadrovsko okrepila z novimi ljudmi. Od leta 1994 sta člana katedre tudi nekdanja sošolca, "molekularca" **prof. dr. Kristina Sepčič** in **prof. dr. Gregor Anderluh**, ki sta neumorna in predvsem vlečeta naš raziskovalni voz.



Kristina in Gregor nazdravljata s Salmonello leta 1994.

S svojim nepogrešljivim znanjem kemije, iznajdljivostjo in spretno roko pa nas že vrsto let spremlja tudi tehnična sodelavka **ing. Irena Pavešič**, katere rojstni dan je letos še posebej bučno praznoval celoten Oddelek za Biologijo. Najbrž je razumljivo, da so v vseh teh letih na naši katedri diplomirali številni diplomanti. Na

katedri so doktorirali tudi mladi raziskovalci: **Ariana Barlič, Petra Malovrh, Sabina Berne** in **Katarina Kristan**, ki danes uspešno nadaljujejo delo na področju biokemije v drugih delovnih organizacijah. Mlade moči, ki trenutno delujejo na katedri ter pridno in pogumno napredujejo proti doktorskem nazivu, so mlade raziskovalke **Mojca Beseničar, Katja Rebolj** in **Biserka Bakrač** ter njihova kolega **Andrej Razpotnik** in **Andrej Bavdek**.



Biserka Bakrač

Pri nas so gostovali tudi tuji študentje in sodelavci. Veseli smo, da so bili vse te kolegice in kolegi z nami in so pripomogli k razvoju in napredku naše katedre ter hkrati tudi vemo, da so se pri nas dobro počutili in nam je vsem bilo kar malo žal, ko so nas morali zapustiti. Ponosni smo, da sta profesorja Maček in Anderluh nosilca Zoisovih priznanj za pomembne raziskovalne dosežke, prof. Sepčičeva je nosilka mednarodne nagrade za raziskave naravnih produktov iz morskih organizmov "Daniel Jouvance", prof. Turk pa bil pred kratkim za soavtorstvo gimnazijskega učbenika od "Molekule do celice" razglašen za Prometeja znanosti. Vsi člani katedre pa smo bili najbolj veseli nedavne pohvale s strani vas študentov, ki ste pohvalili naše pedagoško delo. Lepšega plačila za naše delo si ne bi mogli želeli.

Raziskovalno delo

Raziskovalno delo katedre je že od vsega začetka usmerjeno v proučevanje toksinov in ostalih biološko aktivnih snovi, pri čemer so nas večinoma najbolj zanimali toksini iz morskih nevretenčarjev, v zadnjih letih pa smo se začeli ozirati tudi po drugih virih. Sesilni morski organizmi kot so alge, spužve,

ožigalkarji, mahovnjaki in plaščarji nimajo lokomotorne sistema, ki bi jim omogočil beg pred plenilci ali lovljenje plena. Razvili so drugo strategijo – proizvodnjo širokega spektra strukturno zanimivih kemičnih snovi z najrazličnejšimi biološkimi učinki (citotoksično in citolitično delovanje, inhibicija rasti bakterij, alg, gliv ali virusov, inhibicija različnih encimov). Omenjene snovi so potencialno uporabne za ljudi, npr. v medicini in farmaciji (zdravila) ter v kmetijstvu (npr. protivegetativna sredstva in insekticidi). V našem laboratoriju redno pregledujemo vodne in organske ekstrakte različnih morskih nevretenčarjev na vsebnost biološko aktivnih snovi. Morska organizma, ki sta naša »paradna konja«, sta konjska morska vetrnica *Actinia equina* in jadranska morska spužva *Reniera sarai*.

Od leta 1981 do danes je Katedra objavila 109 člankov in poglavij v knjigah. Z leti smo se na katedri precej opremili in sedaj imamo na voljo aparature predvsem za preparativno in tudi analitsko delo. Najpomembnejša pridobitev je gotovo aparat za merjenje interakcij bioloških molekul, ki deluje na osnovi površinske plazmonske resonance. Kupili smo ga leta 2003, naslednje leto pa smo ustanovili Infrastrukturni center za površinsko plazmonsko resonanco, ki deluje zelo uspešno. Pri nas so v dveh letih opravljali raziskave raziskovalci iz petnajstih akademskih inštitucij in podjetij iz Slovenije in tudi tujine. Letos in prihodnje leto nameravamo širiti dejavnosti centra z nakupom nove, še bolj zmogljive aparature, in preselitev v prostore vhodnega objekta.

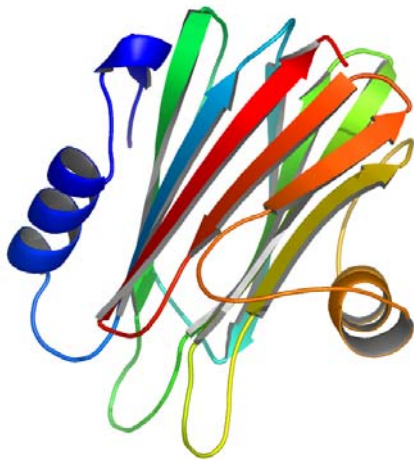


Del katedre leta 2007: stojijo: Peter Maček, Gregor Anderluh, Tom Turk, Andrej Bavdek, Andrej Razpotnik. Sedijo: Kristina Sepčič in Irena Pavešič.

V nadaljevanju so bolj konkretno predstavljena glavna področja naših raziskav:

Proteini, ki tvorijo pore v lipidnih membranah

Rdeča nit raziskovalnega dela na katedri so proteini, ki tvorijo pore v lipidnih membranah. Imamo predstavnike iz različnih organizmov, ki imajo različne strukturne in funkcionalne lastnosti. Najbolj nas zanima, kako se vežejo na lipidne membrane in prepoznajo specifične lipidne molekule v membrani. Poskušamo razumeti, katere so strukturne lastnosti proteinov, ki omogočajo specifično prepoznavanje lipidov. Najbolj proučevan protein na katedri je gotovo **ekvinatoksin II** iz konjske morske vetrnice. V strupu morskih vetrnic najdemo več farmakološko aktivnih snovi. Skupino proteinov, ki tvorijo pore, imenujemo aktinoporini. So zelo močni toksini z vrsto farmakoloških učinkov. Druži jih skupen mehanizem delovanja, ki poteka v večih stopnjah: vezava topnega monomera na membrano, oligomerizacija, vgradnja v membrano in oligomerizacija v končno poro, ki je prepustna za majhne molekule. V zadnjih letih poskušamo razumeti interakcijo ekvinatoksina z membranami na molekularnem nivoju. Predvsem nas zanima topologija membransko vezanega toksina ter kateri deli sodelujejo pri vezavi in oligomerizaciji. Ker se ekvinatoksin specifično veže na membranski lipid sfingomielin, bi lahko bil dobro molekularno orodje za označevanje regij celičnih membran, ki ga vsebujejo.



Ekvinatoksin II

Nedavno smo iz užitnih gob bukovih ostrigarjev (*Pleurotus ostreatus*) in njivnic (*Agrocybe aegerita*) izolirali dva nova membransko aktivna proteina, **ostreolizin** in **egerolizin**. Oba se specifično izražata v času tvorbe primordijev in plodnih teles, ter verjetno imata pomembno vlogo v razvojnem krogu gobe. Proteina sta toksična za glodalce, če jih vbrizgamo intravenozno (brez skrbi, še naprej uživajte v obari ali rižoti iz ostrigarjev: ostreolizin se hitro inaktivira s kuhanjem in nizko pH-vrednostjo v želodcu). Ugotovili smo, da se ostreolizin specifično veže na in lizira lipidne vezikle sestavljene ali iz holesterola in sfingomielina ali holesterola in nasičenih glicerofosfolipidov. V lipidnih membranah je takšna kombinacija lipidov v tekoči urejeni fazi, ki je značilna za lipidne rafte. Rafti so membranske domene z vrsto pomembnih bioloških funkcij (signalizacija, transmembranski transport, vezava in vstop toksinov, patogenov in ostalih ligandov). Zadnji poskusi z ostreolizinom nakazujejo na to, da bi protein v sublitni koncentraciji, ali njegova rekombinantna netoksična mutirana oblika, bil uporaben kot molekularno orodje za študij lipidnih raftov, trenutno ene najbolj proučevanih tem na področju biologije membran.

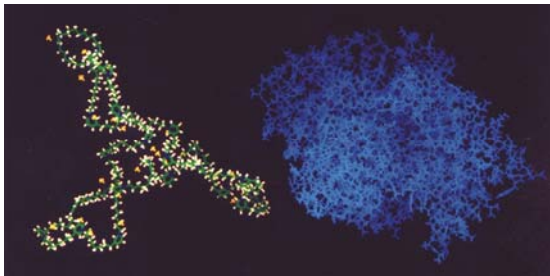


Bukov ostrigar (Pleurotus ostreatus)

Polimerne alkilpiridinijeve soli (poli-APS)

Vodotopne polimerne alkilpiridinijeve soli (poli-APS, na sliki), smo leta 1994 slučajno izolirali iz vodnega ekstrakta morske spužve *Reniera sarai*. V začetku smo bili prepričani, da gre za protein. Kljub temu da ni bilo tako, smo izolirali strukturno zelo

zanimivo polimerno organsko spojino - poli-APS, ki ima dve izraziti potencialno uporabni aktivnosti: tvori pore v lipidnih membranah in ireverzibilno inhibira encim acetilholinesterazo, ki je udeležena v prenosu živčnih impulzov v sinapsah. Inhibitorji acetilholinesteraze v višjih koncentracijah delujejo kot živčni strupi, v manjših odmerkih pa se lahko uporabijo za zdravljenje nekaterih živčno-mišičnih bolezni kot so glavkom, miastenija gravis ali Alzheimerjeva bolezen. V sodelovanju s skupino iz Aberdeena (Škotska) smo ugotovili, da poli-APS tvorijo prehodne pore v membranah sesalskih celic ter omogočajo njihovo stabilno transfekcijo s tujerodno DNA, zato so potencialno uporabni v genski terapiji. Na katedri trenutno podrobneje proučujemo interakcijo poli-APS z umetnimi in naravnimi lipidnimi membranami.



Poli-APS (levo) in acetilholinesteraza (desno)

Še en zanimiv vidik uporabe poli-APS je njihova protivegetativna aktivnost - zaviranje pritrjanja bakterijskega biofilma ter ličink fito- in zooplanktona. Pritrjevanje mikro- in makroorganizmov (predvsem školjk in rakov vitičnjakov) na podvodne površine predstavlja resen problem v industriji in pomorstvu, saj zmanjšuje hitrost plovil in povzroča škodo na potopljenih objektih. Zaščitni antivegetativni premazi, ki se uporabljajo za reševanje tega problema, vsebujejo večinoma aktivne snovi na osnovi kositra in bakra, ki so žal tudi toksične za različne vodne organizme. Novejše raziskave so usmerjene predvsem v izolacijo takih naravnih snovi, ki imajo majhno toksičnost (mednje pa sodijo tudi poli-APS), in so dovolj enostavne, da jih lahko pridobivamo z organsko sintezo. V sodelovanju s skupino iz Trenta (Italija) smo nedavno uspeli sintetizirati dimerne in tetramerne analoge poli-APS in jih testirali na protivegetativno aktivnost, s skupino iz Genove (Italija) pa razvijamo tudi tehnične rešitve vklapljanja poli-APS oziroma

njihovih sintetičnih analogov v različne premaze za preverjanje učinkovitosti zaščitne premazanih površin v morju.



Katja Rebolj, Mojca Beseničar, Katarina Kristan, Sabina Berne in Kristina Sepčič leta 2004

Kaj reči za konec? Čeprav se ukvarjamo s toksini, smo biokemiki zaenkrat še vedno vitalni (glej slike). V skupini nas veseli sodelovanje s študenti, ki jih zanimajo molekularni mehanizmi delovanja toksinov in njihova izolacija. Upamo, da se bo ta praksa uspešno nadaljevala tudi v prihodnje in vas vabimo, da nas obiščete tudi na spletnih straneh <http://www.bf.uni-lj.si/bi/biokemija/>