



Povzetek projekta Po kreativni poti do praktičnega znanja za namen objave in predstavitve na spletni strani sklada.

1. Polni naslov projekta:

Razvoj tehnologije FRET za odkrivanje nedovoljenih učinkovin v športu in zlorabi v zdravstvu

2. V sodelovanju z:

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo in GenePlanet d.o.o.

3. Besedilo:

Zlasti v profesionalnem, v zadnjem obdobju pa celo v amaterskem športu, se srečujemo z zlorabo učinkovin, ki vplivajo na zmogljivost športnikov. Naš namen je bil razviti univerzalen test za detekcijo prisotnosti nedovoljenih učinkovin, ki z vezavo na določen receptor sprožijo aktivacijo ali izzovejo blokado slednjega.

Prenos energije z resonanco fluorescence FRET je fizikalen pojav, pri katerem sta udeležena dva fluorofora; če je razdalja med obema fluoroforoma ustrezno velika, donorski fluorofor emitira elektromagnetno valovanje, sicer pride do absorpcije s strani akceptorja (dušilca). Molekuli, ki vstopata v medsebojne interakcije, lahko označimo s parom fluoroforov. Če sta molekuli povezani v kompleks, sta tudi oba fluorofora blizu drug drugemu, zaradi česar ob poskusu ekscitacije ne beležimo svetlobnega signala. Nasprotno, če kompleks razpade (npr. pri kompetitivni vezavi druge molekule na enega od prvotnih vezavnih partnerjev), fluorofora nista več v neposredni bližini in ob ekscitaciji donor emitira svetlobo. Morebitna prisotnost alternativnega liganda receptorja (npr. v plazemskih ali urinskih vzorcih) bi tako izzvala razpad prvotnega kompleksa in porast fluorescence. Kot modelni sistem smo izbrali z dušilcem označen rekombinantni miostatatin, signalni protein, ki zavira proces miogeneze, in z donorskim fluoroforom označeno proregijo miostatina, ki z zrelim miostatonom tvori nekovalentne interakcije in ga tako inaktivira. Alternativne ligande miostatina (kot simulacijo nedovoljenih učinkovin za blokiranje učinkov miostatina) smo nameravali izolirati iz bakteriofagnih predstavitev knjižnic fragmentov protiteles ali naključnih peptidov. Prednost takšnega pristopa detekcije nedovoljenih učinkovin pred obstoječimi (kromatografske ali elektroforezne metode, imunski testi) je univerzalnost – teoretično je namreč mogoče z opisano metodo zaznati vse spojine, ki za vezavo na določen receptor tekmujejo z izbranim ligandom.

Pripravili smo ekspresijsko kaseto za izražanje promiostatina in dosegli njeno integracijo v genom metilotrofne kvasovke *Pichia pastoris*. Vzporedno smo z usmerjeno mutagenezo vnesli zaključni kodon neposredno za proregijo miostatina v genu za promiostatatin in tako pripravili še ekspresijsko kaseto za izražanje proregije miostatina. Potrdili smo izražanje rekombinantnega promiostatina in njegovo sproščanje v gojišče, a smo pri poskusu preparativne izolacije (pro)miostatina naleteli na težavo, saj je rekombinantni produkt v gojišču le slabo topen. Tako smo s kombinacijo ionsko-izmenjevalne kromatografije in gelske



filtracije uspeli izolirati le relativno nizke količine rekombinantnega produkta (prenizke za nadaljnje delo), a smo pri tem pridobili pomembno znanje o proteinu, ki nam bo v pomoč pri optimizaciji postopka izolacije. S procesom identifikacije ligandov miostatina iz bioloških knjižnic nismo pričeli, saj za afinitetne selekcije potrebujemo približno 500 µg rekombinantnega miostatina. V laboratoriju za biotehnologijo na Katedri za farmacevtsko biologijo (UL, FFA) imamo bogate izkušnje na tem področju in večjih težav pri tej aktivnosti ne pričakujemo. Peptidne ligande bomo pripravili sintezno, enoverižne variabilne fragmente protiteles pa izrazili v bakteriji *E. coli*. Alternativno bomo kot ligande uporabili komercialno dostopne naravne vezavne partnerje miostatina (folistatin ali peptide dekorina). Končna predvidena aktivnost je označevanje obeh vezavnih partnerjev s fluoroforoma (TAMRA in QSY-7) ter vrednotenje modelnega sistema - vzpostavitev in optimizacija testa FRET za detekcijo nedovoljenih učinkovin v telesnih tekočinah. Zaradi zaostanka pri doseganju zgodnejših načrtovanih rezultatov končni cilj še ni bil dosežen.

Študenti, vključeni v projekt, so ob pomoči delovnega mentorja pripravili tudi tržno analizo za načrtovan produkt.