

Opravljanje diplomskih nalog s področja tehnologije rekombinantne DNA

doc. dr. Marko Dolinar

(študijsko leto 2005/06)

Če vas tehnologija rekombinantne DNA zanima in želite opravljati diplomsko nalogo v zvezi s tem, se mi najprej javite, mesec ali dva pred začetkom dela pa si boste izbrali eno od tem, ki bodo takrat na voljo. Na naslednjih straneh so opisane teme za tekoče študijsko leto, postopek prijave pa je predstavljen na tej strani.

Laboratorijsko delo bo potekalo na Katedri za biokemijo FKKT na kateri od tematik, ki jih razvijamo sodelavci Katedre sami ali pa v sodelovanju z drugimi raziskovalnimi skupinami, npr. Odsekom za biokemijo in molekularno biologijo Instituta "Jožef Stefan" ali Zavodom za transfuzijsko medicino. Katedra je v februarju 2006 prenovila študentski laboratorij, ki bo odslej namenjen tudi pripravi diplomskih in raziskovalnih nalog. Teme diplomskih nalog so določene samo okvirno, saj so dogovori o sodelovanju z drugimi skupinami še v teku.

Vsako leto lahko diplomsko nalogo pod mojim mentorstvom opravljata največ dva diplomanta (a samo eden hkrati*). Če želite opravljati diplomsko nalogo pod mojim mentorstvom, se mi oglasite do 5. maja 2006. Če bo interesentov več, bosta imela prednost tista dva, ki bosta imela boljšo oceno iz TrDNA; pričakovana ocena je vsaj 8 [(vaje+predavanja)/2]. Če se do 5. maja ne bosta prijavila niti 2 interesenta, bo možnost dobil, kdor se bo prijavil do 1. septembra. Če bo kandidatov do septembrskega roka več, bo imel prednost, tisti, ki je do tega datuma dosegel višjo oceno pri TrDNA, če pa bo ocena enaka, pa kdor ima višjo povprečno oceno vseh izpitov in vaj. Z delom lahko začnete, ko imate do konca študija še največ 2 izpita ali kolokvija.

Zainteresirani za opravljanje raziskovalne ali diplomske naloge med študijem se mi javite čim prej. Takšno delo je smiselno opravljati samo v primeru, da si za eksperimentalno delo lahko rezervirate vsaj 4 x pol dneva tedensko (ali 1 dan + 2-krat pol dneva) skozi 2 semestra. Eksperimentalni del bo seveda trajal dalj, pač odvisno od tega, koliko časa boste laboratorijskemu delu lahko namenili. Raziskovalno/diplomsko delo med študijem lahko pod mojim mentorstvom opravljajo samo študenti s povprečno oceno vsaj 8,7 in z opravljenimi izpiti iz biokemije, mikrobiologije in molekularne genetike.

Pričakovano trajanje diplomskega dela je 3 mesece (brez morebitnih prekinitev zaradi dokončanja študijskih obveznosti in drugih odsotnosti) ob obremenitvi 40 ur tedensko.

Pred začetkom laboratorijskega dela je treba predelati več člankov iz revij, ki se tičejo posameznih proteinov in laboratorijskih postopkov, zato svetujem, da računate na 1-2 tedna študija še pred začetkom dela v laboratoriju.

* Hkrati naj bi pod mojim mentorstvom delal samo po 1 diplomant. To ne velja v primeru, ko en diplomant opravlja eksperimentalno delo med študijskim letom.

kje boste opravljali delo

roki

kriteriji za izbor

začetek dela

delo med študijem – izjemoma

trajanje

pred začetkom

Teme bodo z naslednjih področij:

- 1. Priprava neglikoziliranih imunoglobulinov v *E. coli***
 - 2. Razvoj bakterijskega ekspresijskega sistema za izražanje rekombinantnih rastnih faktorjev**
 - 3. Kloniranje in izražanje alergenov v bakterijskih celicah**
 - 4. Analiza topnih inkluzijskih teles v *E. coli***
 - 5. teme v dogovoru z Odsekom za biokemijo in mol. biologijo IJS**
-

1. Priprava neglikoziliranih imunoglobulinov v *E. coli*

Na Zavodu za transfuzijsko medicino se skupina prof. dr. Vladke Čurin Šerbec med drugim ukvarja s karakterizacijo protiteles proti različnim naravnim antigenom. Doslej so zelo dobro raziskali značilnosti vezavnih regij, zdaj pa bi želeli pridobiti protitelesa v *E. coli* in jih primerjati z naravnimi glikoziliranimi protitelesi.

Rekombinantna protitelesa so v bakterijah uspešno proizvedli že pred več kot 15 leti, tako da pri izbiri sistema ne bi smelo priti do večjih težav. Največ dela bo z vnosom točno določenega nukleotidnega zaporedja vezavnih (hipervariabilnih) regij na pravo mesto v zapisu za imunoglobulin.

Metode:

Med delom bomo uporabili postopke mutageneze, kloniranja zapisov v bakterijah, indukcijo izražanja genov, če pa bo šlo delo dobro, pa še izolacijo in po potrebi renaturacijo rekombinantnih proteinov. Analiza bo predvsem restrikcijska in elektroforezna. Praktično delo naj bi trajalo (vsaj) 3 mesece, v primeru nepričakovanih težav pri delu tudi dlje.

2. Razvoj bakterijskega ekspresijskega sistema za izražanje rekombinantnih rastnih faktorjev

Trombociti ob indukciji sproščajo različne rastne faktorje, ki imajo pomembno vlogo pri mnogih fizioloških procesih. Skupina doc. dr. Primoža Rožmana na Zavodu za transfuzijsko medicino pripravlja encimsko-imunski test za določanje koncentracij teh faktorjev, pri katerem potrebujejo kot standard ustrezen protein. Rekombinantni rastni faktorji so zelo dragi, zato je smiselno tudi manjše količine pripraviti v lastnem laboratoriju.

Rastne faktorje se da učinkovito pripraviti v bakterijah, vendar v naših laboratorijih še nimamo izdelanega sistema za njihovo proizvodnjo. Izbrati bo treba ustrezen vektor in pripraviti konstrukt z zapisom za enega ali več rastnih faktorjev ter izvesti indukcijo izražanja, nato pa analizirati dobljeni rekombinantni protein.

Metode:

Med delom bomo uporabili postopke kloniranja v bakterijskih celicah, indukcijo izražanja genov (morda v več vzporednih sistemih), če bo mogoče pa še izolacijo rekombinantnih proteinov in določitev njihovih lastnosti. Praktično delo naj bi trajalo 3 mesece, v primeru nepričakovanih težav pri delu tudi dlje.

3. Kloniranje in izražanje alergenov v bakterijskih celicah

Število ljudi, ki so alergični na različne antigene, v razvitem svetu stalno narašča, poznavanje alergenov pa je relativno slabo. Če se boste odločili za to temo, bomo za delo izbrali katerega od manj poznanih alergenov, pridobili cDNA in jo prenesli v ekspresijski sistem, nato pa vsaj delno očistili rekombinantni protein in določili njegove lastnosti.

Alergeni so strukturno zelo raznoliki proteini. Izbrali si bomo takega, da ga bo mogoče sorazmerno enostavno analizirati.

Metode:

Izvedli bomo postopke kloniranja (če bo potrebno, bomo najprej izolirali mRNA in jo encimsko pretvorili v cDNA) v bakterijskih celicah, indukcijo izražanja genov s pomočjo vektorja z močnim promotorjem in po možnosti delno izolacijo rekombinantnega proteina. Praktično delo naj bi trajalo 3 mesece, v primeru nepričakovanih težav pri delu tudi dlje.

4. Analiza neklasičnih inkluzijskih telesc v *E. coli*

Sodelavci Kemijskega inštituta v Ljubljani so ugotovili, da niso vsa inkluzijska telesa (IB) nujno sestavljena iz močno agregiranih proteinskih molekul, pač pa ob ustreznem postopku gojenja lahko vsebujejo že delno (pravilno) zvite proteinske molekule. Doslej pa so ta fenomen opisali le na enem primeru.

V raziskovalni/diplomski nalogi bi preverili, ali je pojav neklasičnih IB splošna lastnost, odvisna od pogojev gojenja celic, ali pa se pojavlja le pri določenih tipih proteinskih molekul. *Ta naloga pride v poštev šele, ko bomo imeli na voljo več različnih konstruktov, tako da bi lahko ob uporabi enakih ali zelo podobnih vektorskih sistemov preverjali značilnosti inkluzijskih telesc.*

Metode:

Če bo potrebno, bomo zapise prenesli v enake ali zelo podobne vektorje z močnimi promotorji in inducirali izražanje zapisov. Pri tem bomo spreminjali pogoje gojenja gostiteljskih celic ter spremljali stopnjo denaturacije proteinov, iz katerih so ta telesa sestavljena. S primerjavo pogojev, potrebnih za raztapljanje IB bi ugotavljali, do katere mere velja, da so neklasična IB splošen pojav, odvisen izključno od rastnih pogojev. Praktično delo naj bi trajalo 3 mesece, v primeru nepričakovanih težav pri delu tudi dlje.

5. teme v dogovoru z Odsekom za biokemijo in mol. biologijo IJS

Sodelavci Katedre sodelujemo v skupaj treh raziskovalnih programih na Institutu »Jožef Stefan«. Čeprav je na vseh programih na IJS mogoče delati raziskovalno nalogo v okviru njihovih raziskovalnih skupin, obstaja tudi možnost, da delo opravite v laboratoriju katedre. Za vsako konkretno nalogo je potreben predhodni dogovor, zato teme niso vnaprej določene.

Metode:

Na Katedri in pod mojim mentorstvom bi lahko potekale le diplome, ki vključujejo pripravo in analizo rekombinantnih proteinov. *Na IJS je spekter metod širši in vključuje tudi zahtevnejše imunološke, celično-biokemijske in strukturne analize.*