

Izveštaj o naučno-istraživačkom usavršavanju na CECAD institutu Univerziteta u Kelnu

dr Aleksandar Paunić
saradnik u nastavi na Katedri za imunologiju
Institut za mikrobiologiju i imunologiju
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Kao dobitnik nagrade Fondacije Miroslava Mirka Simića za 2024. godinu, pripala mi je izuzetna čast da se u periodu od 10. marta do 30. maja 2025. godine usavršavam na prestižnom Institutu za mitohondrijske bolesti i starenje u okviru CECAD istraživačkog centra, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Kelnu u laboratoriji profesorke Aleksandre Trifunović.



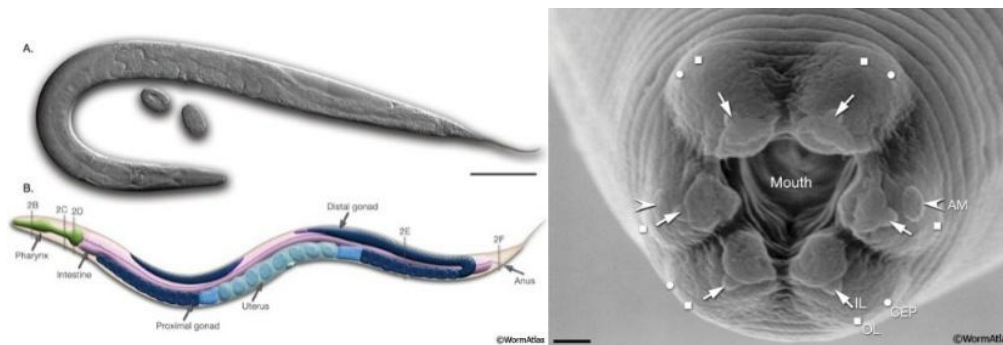
CECAD, Köln

Na institutu sam bio sjajno prihvaćen i ubrzo uključen u rad. Prvobitni plan je bio da aktivno učestvujem u projektu ispitivanja osnovnih signalnih kaskada koje dovode do aktivacije urođenog imunskog odgovora kod miševa sa nedostatkom kazeinolitičke proteazne proteolitičke subjediniće (engl. *caseinolytic protease proteolytic subunit* - CLPP). Međutim, s obzirom na činjenicu da nisam imao obuku za rad sa eksperimentalnim životinjama, a kako je bilo isuviše malo vremena da prođem istu i dobijem dozvolu, promenili smo pristup.

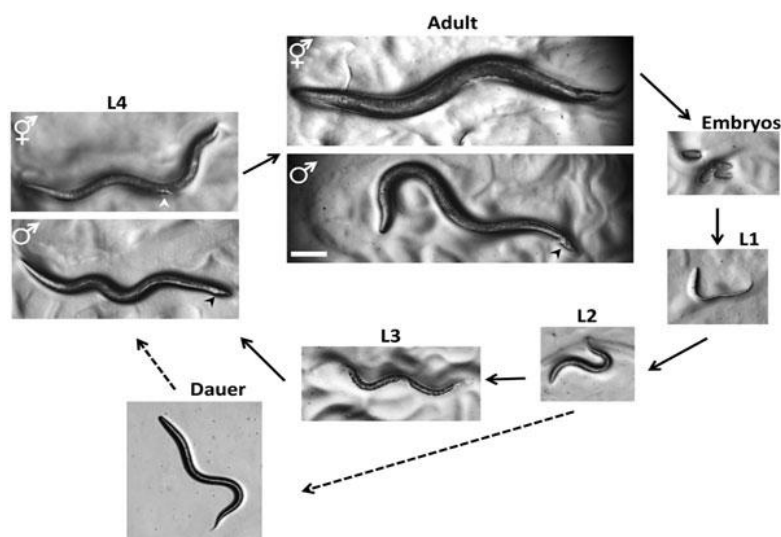
Rad sa *Caenorhabditis elegans* nematodama

U laboratoriji profesorke Trifunović, radi se takođe i sa *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), mikroskopskim nematodama. Ekspert na polju ovih veoma interesantnih crva je dr Aleksandra Zečić, koja me je upoznala s njima i bila mentor kroz čitav proces rada.

C. elegans crvi su prototip model organizama i nekoliko njihovih karakteristika čini ih izuzetno pogodnim za raznovrsna istraživanja kako na polju evolutivne biologije i starenja, tako i na polju ispitivanja uzroka neurodegenerativnih bolesti, pojedinih procesa urođene imunosti, ali i na polju autofagije. Njihova veličina, prosečni životni vek, transparentnost (prozirnost) njihovog tela, kao i lakoća rukovanja njima i lakoća izvođenja tehnika genetičkog inženjerstva i molekularno bioloških tehnika, samo su neke od karakteristika koje su navele biologa dr Sidnija Brenera da etablira *C. elegans* kao model organizam.



www.wormatlas.org

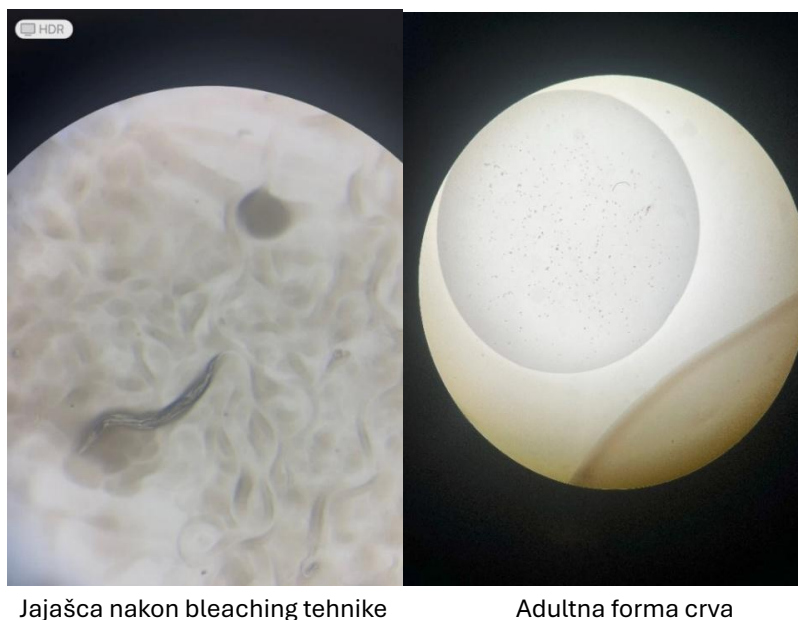
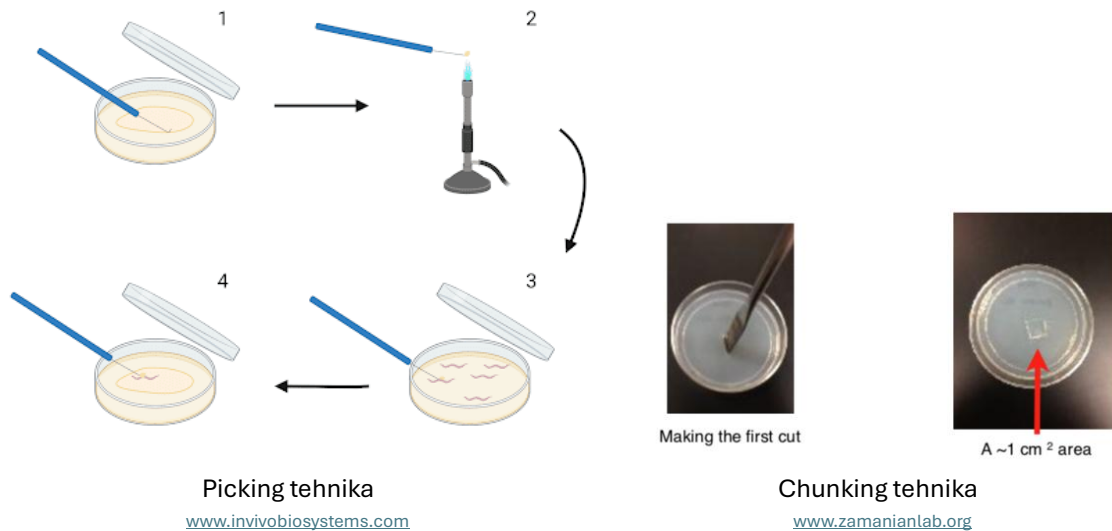


www.wormbook.org

Prvih nekoliko nedelja proveo sam učeći o samim *C. elegans*. Ovaj organizam je jednostavan, genetski dobro definisan model sa kratkim životnim ciklusom (u proseku 15-20 dana) i evolutivno očuvanim signalnim putevima, što omogućava brza istraživanja ključnih bioloških procesa, uključujući starenje, odgovor na stres i mehanizme urođene imunosti. Osim toga, providan je (proziran), što omogućava direktno posmatranje ćelijskih procesa u realnom vremenu. Takođe, vrlo je jednostavan za rukovanje, uz minimalne tehničke i etičke prepreke u poređenju sa složenijim modelima. *C. elegans* se u laboratorijskim uslovima hrane *E. coli* bakterijama, koje su neophodne za njihov razvoj i razmnožavanje. Smanjenje ekspresije gena (eng. *knock-down*), kao jedna od tehnika genetičkog inženjerstva, se postiže kod ovih crva izuzetnom lakoćom putem RNK interferencije, tačnije, hranjenjem ovih crva *E. coli* bakterijama modifikovanim da ekspimiraju velike dvolančane RNK (eng. *double stranded RNA – dsRNA*) specifične za gene od interesa. One potom u organizmu crva bivaju skraćene i obrađene tako da postanu male interferišuće RNK (eng. *small interfering RNA – siRNA*) koje onda „stišavaju“ gen od interesa odnosno smanjuju njegovu ekspresiju.

Prošao sam osnovnu, ali izuzetno detaljnu obuku rukovanja *C. elegans* crvima. Od prvog do poslednjeg koraka - pravljenje agara na kom crvi rastu i hrane se (eng. *nematode growth medium – NGM agar*); gajenje odgovarajućih bakterijskih kultura kao izvora hrane; tehnike rukovanja crvima kao

što su skupljanje larvi i adulta - **picking** i komadanje agara sa crvima – **chunking**; takođe i **bleaching** što predstavlja laboratorijsku tehniku u kojoj se larve i odrasli crvi tretiraju rastvorom natrijum-hipohlorita i baze kako bi se razgradila njihova tela, dok otporna jajašca preživljavaju i izdvajaju se za dalje eksperimente. Ova tehnika je pogodna ako želimo da pratimo razvoj svih crva od stadijuma jajašceta do odrasle forme simultano.



Privatna arhiva

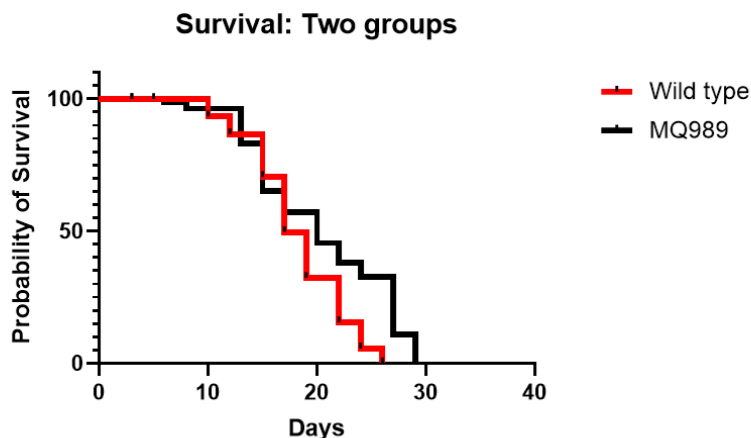
Dva soja s kojima sam vežbao pomenute tehnike, a i ostale funkcionalne eksperimente (o kojima će biti reči kasnije), bili su **N2 divlji soj** (eng. **wild type - WT**) *C. elegans* crva i **MQ989 soj** odnosno **isp-1; ctb-1 dvostruki mutanti**. Isp-1 je gen kod *C. elegans* koji kodira ključnu subjedinicu kompleksa III mitohondrijskog respiratornog lanca, tkzv. Rieske-Fe-S protein. Gen ctb-1 je, za razliku od isp-1 gena, deo mitohondrijske DNK i kodira citohrom b koji je takođe deo kompleksa III. Konkretno, ovi

dovostruki mutanti su pogodni za poređenje zato što su im razvoj, rast i reproduktivni stadijum usporeni u odnosu na divlji soj.

Naučio sam da radim osnovne funkcionalne eksperimente gde su upoređivani parametri između WT crva i MQ989 mutanata. Urađeno je poređenje prosečnog životnog veka – eng. ***lifespan assay***. Nakon analize dobijenih rezultata došli smo do zaključka da je prosečni životni vek WT crva bio 18 dana, dok je ta vrednost kod MQ989 soja iznosila 21+ dan.*

(* Znak + označava činjenicu da je od ukupno 100 posađenih crva, preostalo 13 u trenutku kad se moje usavršavanje privelo kraju. Tako da je 21 dan bio minimalni prosečni životni vek MQ989 mutanata u ovom eksperimentu.)

Dobijeni rezultati su u skladu sa očekivanjem, s obzirom na to da MQ989 crvi imaju usporen rast i metabolizam, pa samim tim i produžen životni vek.

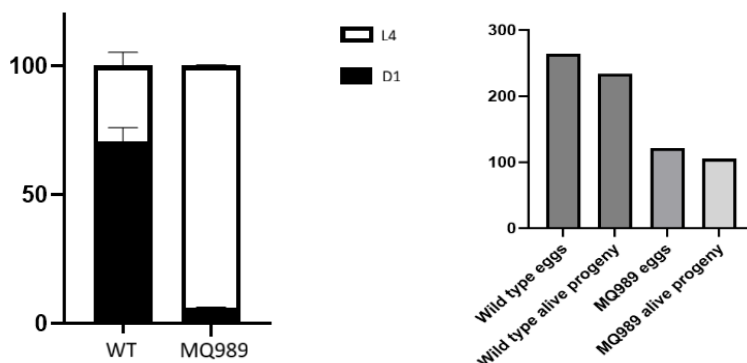


Rezultati obrađeni pomoću *GraphPad Prism10™*

Takođe je urađeno i poređenje broja otkucaja faringealne pumpe – neuromišićnog organa koji ima svoju autonomnu inervaciju (poput ljudskog srca). Ovaj organ služi *C. elegans* crvima za ishranu. Broj otkucaja faringealne pumpe bio je manji kod mutanata nego kod WT crva, iz istih razloga kao i kod *lifespan* eseja – usporeni rast, razvoj i metabolizam.

Upoređivane su vrednosti ***egg laying*** i ***development*** eseja. I tu su rezultati kao u prethodnim eksperimentima bili očekivani. MQ989 mutanti su za bar jedan dan kasnije sazrevali iz L4 larva forme u D1 adulta u odnosu na WT crve. Konkretno 71% WT je posle 3 dana razvika postalo D1 adult, dok je procenat odraslih crva za isto vreme kod mutanata iznosio svega 6%.

Kad je broj potomaka u pitanju, WT crvi su sneli od dva do tri puta više jajašaca nego mutanti. Takođe, mnogo veći broj crva se izlegao iz jajašaca kod divljih sojeva nego kod mutanata (zbog zastoja u razviću).



Rezultati obrađeni pomoću GraphPad Prism10™

DA2123 *lgg1::GFP* *C. elegans* soj

U bazi laboratorije profesorke Trifunović postoji veliki broj različitih sojeva *C. elegans* crva. Najveći broj eksperimenata sproveden je, kao što je već pomenuto, na **N2 WT** crvima i **MQ989** dvostrukim mutantima. Pored njih, koristio sam i soj **DA2123**, na kojem smo uradili dva eksperimenta primenom Western blot tehnike. Ovi crvi imaju *lgg-1* gen za koji je vezan gen koji kodira zeleni fluorescentni protein (eng. *green fluorescent protein* – **GFP**). Gen *lgg-1* je ortolog humanog gena *LC3*, koji kodira LC3 protein – jedan od ključnih markera autofagije. Naš cilj bio je da ispitamo nivo autofagije kod DA2123 crva kod kojih smo utišavali (eng. *knock down*) gene povezane sa ovim procesom (eng. *autophagy related genes* – ATG). Svrha ovih eksperimenata bila je da savladam i uvežbam kompletnu proceduru Western blot metode – od prikupljanja uzoraka do snimanja i analize rezultata – i da uporedim razlike u odnosu na Western blot koji se rutinski radi na humanim ćelijama u Laboratoriji za imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Budući da je izbor konkretnih gena za testiranje proizašao iz već postojećeg projekta koji se i dalje odvija u pomenutoj laboratoriji, a da rezultati još nisu objavljeni, u ovom trenutku nisam u mogućnosti da detaljnije govorim o dobijenim rezultatima.

Zaključak

Moj boravak u Kelnu i usavršavanje na CECAD istraživačkom centru predstavljaju dragoceno iskustvo, kako naučno i karijerno tako i životno. Verujem da mi je ovaj boravak otvorio mnoga vrata i da je značajna odskočna daska na početku moje naučne karijere. Imao sam priliku da se upoznam i sarađujem sa velikim brojem, pre svega, izuzetnih ljudi, ali i izuzetnih naučnika. Po prvi put sam se susreo sa model organizmom kakav je *C. Elegans* kojim sam postao opčinjen i očaran. Planiram da ovo iskustvo iskoristim kao temelj početka moje naučne karijere tokom koje se nadam da ću ostvariti

značajne rezultate i dati doprinos naučno-istraživačkom radu ne samo na Medicinskom fakultetu u Beogradu već i široj naučnoj zajednici. Vizija postoji, neophodno je samo popločati put.

Zahvalnica

Želim da se zahvalim svim članovima upravnog odbora Fondacije Miroslava Mirka Simića (FMMS) na ukazanoj prilici i poverenju, a posebno predsednici fondacije profesorki Radmili Mileusnić, takođe ćerki profesora Mirka Simića, Miroslavi Simić i Savi Panteliću na pruženoj pomoći dok sam boravio u Kelnu.

Veliko hvala i svim članovima Katedre za imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, profesorki Veri Pravici koja me je podstakla da se prijavim na konkurs za dodelu stipendije FMMS, profesoru Vladimiru Trajkoviću i mojoj mentorki docentkinji Marini Stamenković na dragocenoj podršci i dobronamernim savetima.

Orgomnu zahvalnost dugujem ljudima koji rade u laboratoriji profesorke Trifunović, koji su me od početka lepo prihvatili i od svakog od njih sam imao šta da čujem i naučim. Posebno bih se zahvalio dr Aleksandri Zečić, koja me je upoznala sa *C. elegans* crvima i koja mi je bila mentor kroz čitav proces. Takođe, zahvalio bih se tehničarki Lindi Bauman koja mi je do izuzetnih detalja pokazala kako se rukuje sa ovim crvima.

Na samom kraju želim da se zahvalim profesorki Aleksandri - Sandri Trifunović, koja me je od prvog dana očarala svojom pozitivnošću, toplotom i ogromnom energijom. Osećao sam se jako prihvaćeno, čemu je ona u velikoj meri doprinela.

U Beogradu 26.9.2025.

Aleksandar Paunić