



Prof. dr. Igor Križaj

Oddelek za kemijo in biokemijo

Katedra za biokemijo



**IJS, Odsek za molekularne in
biomedicinske znanosti (B2)**



Programska skupina

P1-0207

“Toksini in biomembrane”

Medinstitucionalna PS: IJS in UL (BF, FKKT)



Biološke membrane (BI2I01)

Izvedba predmeta	Predavanja + seminar + laboratorijske vaje: (5 ECTS). Izbirni predmet; bolonjski program 2. stopnje, magistrski študij biokemije in kemije na FKKT/UL.
Predavatelj	Prof. dr. Igor Križaj
Cilji	Seznanimi študente z gradniki bioloških membran, vlogo bioloških membran v celicah, s procesi, ki potekajo v in na membranah, pri prenosu snovi in signalov čez membrane. Predstaviti metode za analizo membran in posameznih membranskih komponent.
Urnik 2024/2025	<u>Predavanja</u> : vsak torek ob 15:00 v predavalnici 2074 (2C) na FKKT/UL <u>Seminar</u> : pisno poročilo + predstavitev in obramba <u>Konzultacije</u> : vsak torek po predavanju
Govorilne ure	V pisarni B402 na IJS po predhodnem dogovoru po e-pošti (igor.krizaj@ijs.si).
Seminarji	<u>Skupina 5 študentov</u> obdela posamezno temo z različnih plati (npr. biokemija, fiziologija, patologija, struktura, evolucija ...). <u>Pisno poročilo</u> : Seminarska naloga v obsegu 15 strani (A4, velikost pisave 12, robovi 3 cm). <u>Ustna predstavitev</u> : 2 skupini študentov/termin predstavi vsaka svojo seminarsko temo v maksimalno 45 minutah (PPT predstavitev z enakovrednim prispevkom vsakega študenta). Sledi navzkrižno izpraševanje med ekipama. Vsak član ekipe mora članom nasprotna ekipe zastaviti vsaj 1 vprašanje. Zaželeno je, da se v diskusijo vključuje tudi publika. Seminarji so tudi del izpitne snovi, zato bodo seminarske naloge in njihove PPT predstavitve javno dostopne na spletni strani predmeta (http://www-b2.ijs.si/people/krizaj/biological-membranes/).
Ocenjevanje	Izpitna snov zajema vse teme predstavljene na predavanjih in seminarjih. <u>Preverjanje znanja je pisno</u> . <u>Pogoja</u> za pristop k opravljanju izpita sta <u>opravljen seminar</u> in <u>laboratorijske vaje</u> . Kvaliteta izvedbe seminarske naloge je pomembna pri zaokrožanju končne ocene predmeta navzgor ali navzdol (bonus/malus). <u>Izpitni roki</u> : 3. julij 2025 (četrtek), 29. avgust 2025 (petek) in 11. september 2025 (četrtek).
Študijska literatura	Določenega učbenika za ta predmet ni. Poleg mojih predavanj in seminarskih nalog, bom na koncu vsakega predavanja predlagal tudi dodatno študijsko gradivo (knjige in znanstvene članke).

Razpored srečanj

Predavanje	Datum	Tema	Študijski viri poleg zapiskov predavanj
1.	18.2.	Uvod s predstavitvijo	
2.	25.2.	Struktura in dinamika bioloških membran	Stryer, Voet, Lodish ...
3.	4.3.	Transport ionov in malih molekul čez biološke membrane	Lodish ...
4.	11.3.	Čiščenje membranskih proteinov	Lodish, znanstveni članki
5.	18.3.	Struktura in funkcija lipidnih mikrodomen	znanstveni članki
6.	25.3.	Medcelična signalizacija – 1. del (signalne molekule in receptorji)	znanstveni članki
7.	1.4.	Medcelična signalizacija – 2. del (prenos živčnega signala, ukrivljanje in zlivanje membran)	Lodish, znanstveni članki
8.	8.4.	Povezovanje celic v tkiva	Lodish, Alberts, znanstveni članki
9.	15.4.	Lipidi in signalizacija	znanstveni članki
10.	22.4.	Distribucija in dinamika lipidov v celici: lipidne kapljice in uravnavanje membranske sestave	znanstveni članki
11.	6.5.	Seminar	2 x 5
12.	13.5.	Seminar	2 x 5
13.	20.5.	Seminar	2 x 5
14. & 15.	27.5.	Seminar	3 x 5

B2

@ JOŽEF STEFAN
INSTITUTE

Institut Jožef Stefan

Odsek za molekularne in biomedicinske znanosti (B2)



Vodja: Prof. dr. IGOR KRIŽAJ; igor.krizaj@ijs.si

<http://www-b2.ijs.si/>

Toksinologija in farmakološko aktivne snovi



ANTITROMBOTIKI
ANTIKOAGULANTI

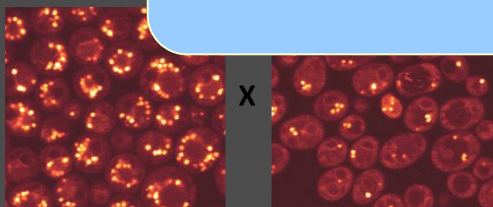
- kardiovaskularne b. (kap, infarkt, hipertenzija)
- nevro-degenerativne b. (AD, PD)



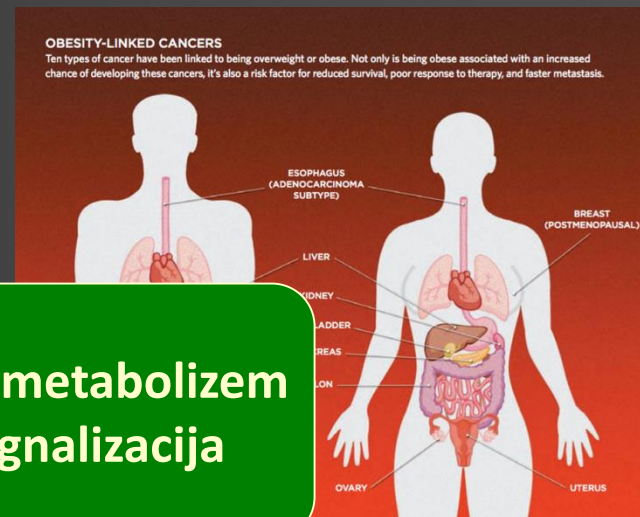
ZELENE KEMIČALIJE

- celične tovarne, delovanje zdravil, stranski učinki zdravil, učinki polutantov

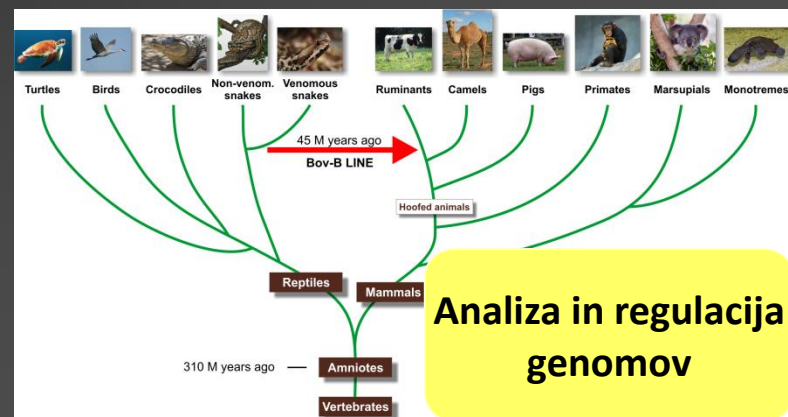
Kvasna genomika in genetika



Lipidni metabolizem in signalizacija

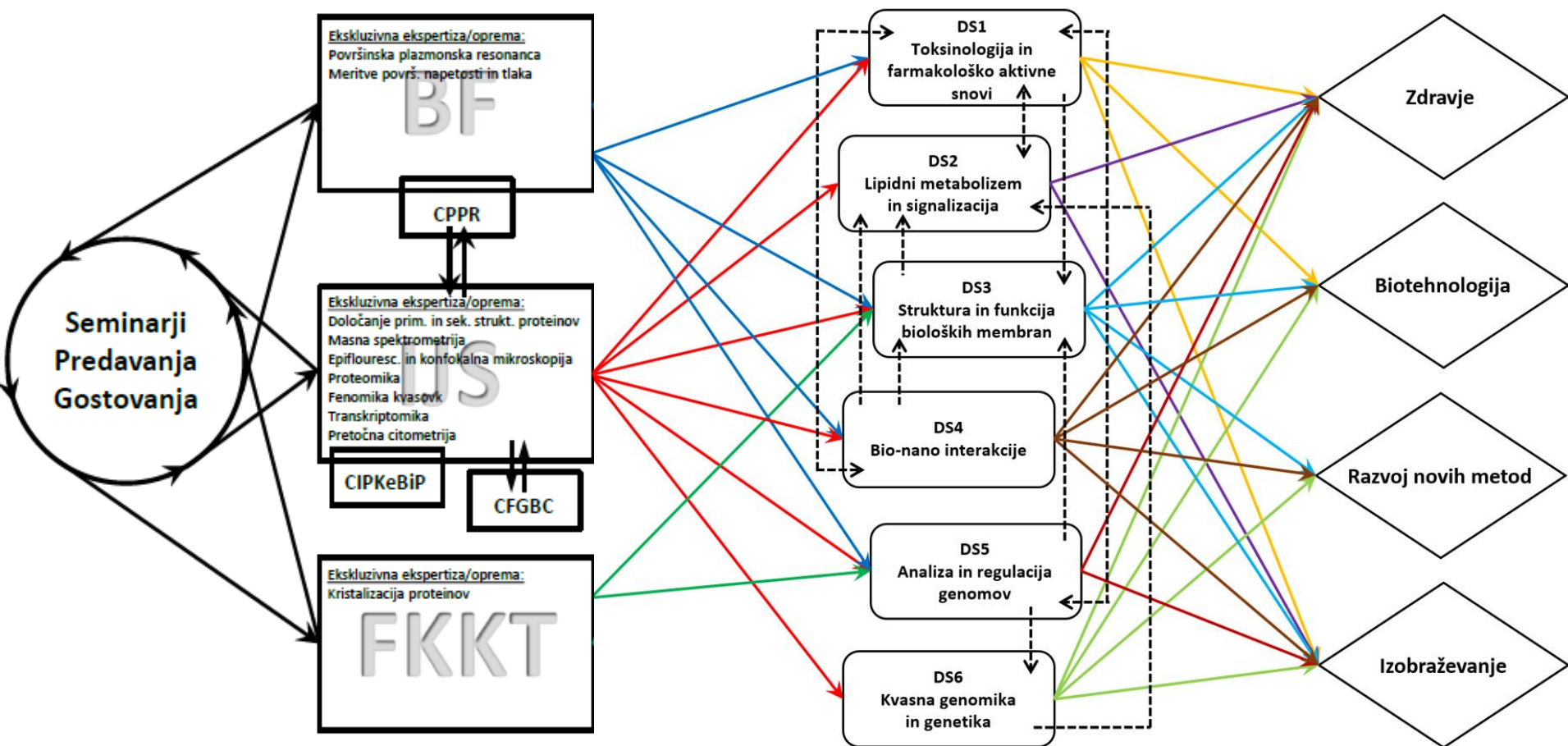


- rak, debelost, sladkorna b., metabolni sindrom, kardiovaskularne b.



- novi antimikrobiki in terapevtske tarče
- evolucija odpornosti na antibiotike

B2 predstavlja osrednji del PS P1-0207



Legenda:

BF – Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

IJS – Institut „Jožef Stefan“, Ljubljana

FKKT – Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

CPPR – Center za površinsko plazmonske resonanco, Ljubljana

CIPKeBiP – Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov, Ljubljana

CFGBC – Center za funkcijsko genomiko in bio-čipe, Ljubljana

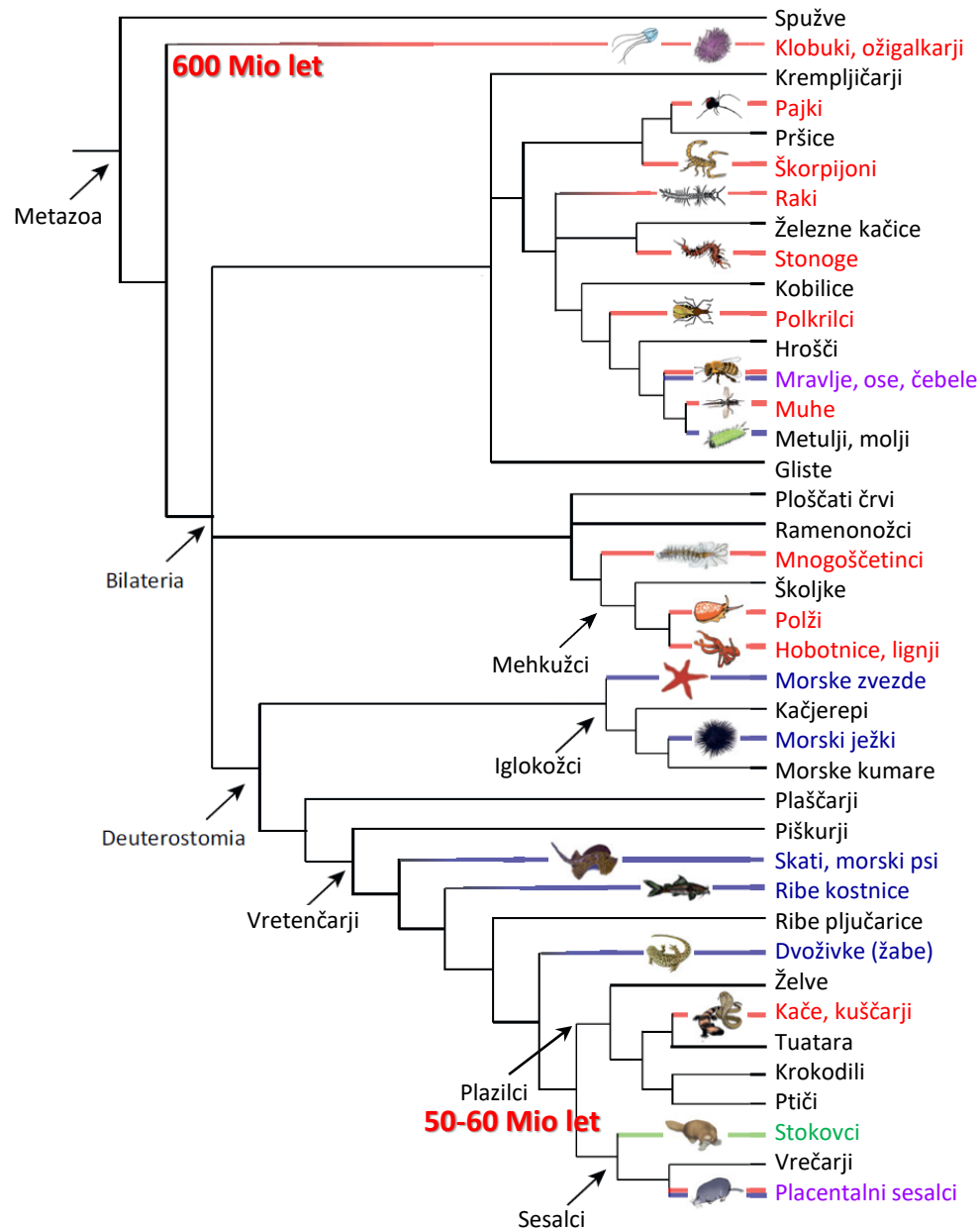
S čim se raziskovalno ukvarjam ...

Toksinologija in farmakološko aktivne snovi: živalski strupi; zastrupitve; nevrotoksini; antikoagulant; prokoagulant; antitrombotiki; hemoragini; miotoksini; molekularni mehanizmi delovanja; toksinski receptorji; venomika; zdravila iz strupov.

Sekretorne fosfolipaze A₂, njihovi inhibitorji in aktivatorji: fiziološka in patofiziološka vloga.

Proteomika in struktura proteinov: strukturno-funkcijske povezave.

Razširjenost strupenih živalskih vrst



Funkcije strupa:

- lov
- obramba
- tekmovanje ...



Katere organske sisteme živalski strupi prizadenejo?

Sistemske učinki

- vročina
- bolečina
- splošna krvavitev

CŽS

- povečana žeja
- glavobol
- omotica
- nezavest

PŽS

- paraliza
- krč

Pljuča

- težavno dihanje

Lokalni učinki

- krvavitev
- razbarvanje kože
- pekoč a bolečina
- oteklina
- nekroza

Koža

- podkožna krvavitev
- potenje
- otopelost
- ščemenje

Vid, okus, sluh

- meglenost
- okus po kovini

Srce in krvni sistem

- pospešen utrip
- nizek krvni pritisk
- moteno strjevanje krvi
- trombocitopenija

Skeletne mišice

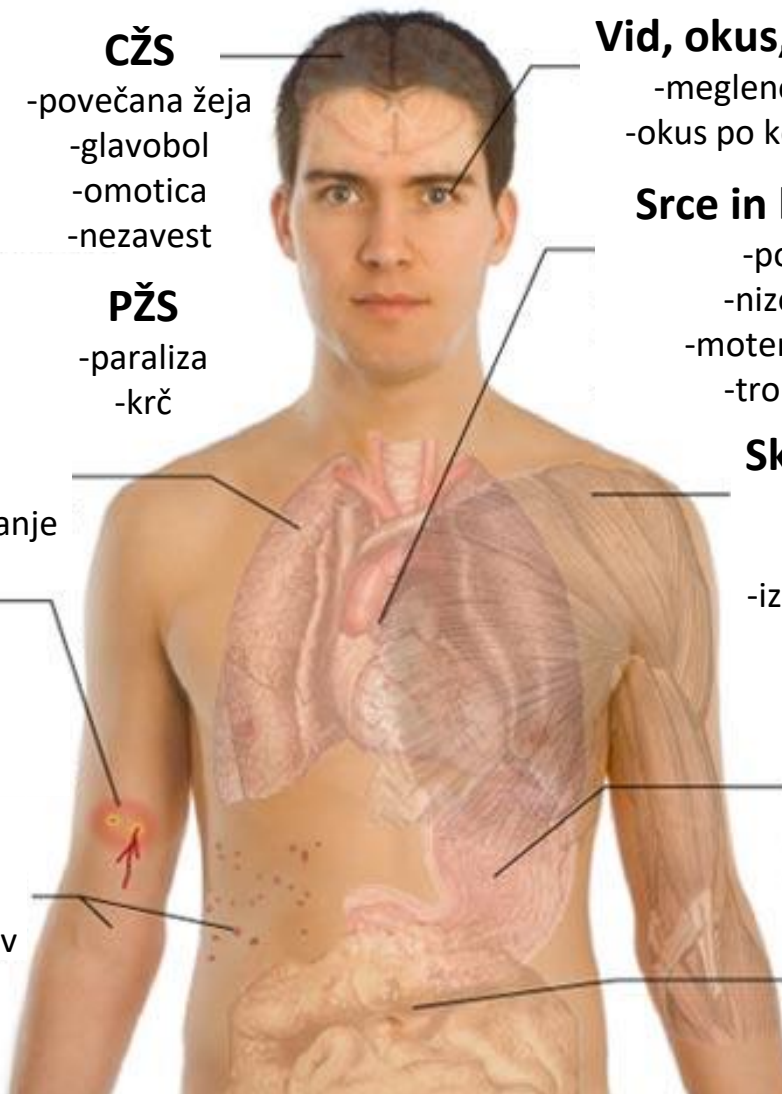
- paraliza
- krč
- izguba koordinacije
- šibkost
- nekroza

Prebavila

- slabost
- bruhanje

Črevesje

- driska



Katere organske sisteme živalski strupi prizadenejo?

Sistemske učinki

- vročina
- bolečina
- splošna krvavitev

CŽS

- povečana žeja
- glavobol
- omotica
- nezavest

PŽS

- paraliza
- krč

Pljuča

- težavno dihanje

Lokalni učinki

- krvavitev
- razbarvanje kože
- pekoč a bolečina
- oteklina
- nekroza

Koža

- podkožna krvavitev
- potenje
- otopelost
- ščemenje

Vid, okus, sluh

- meglenost
- okus po kovini

Srce in krvni sistem

- pospešen utrip
- nizek krvni pritisk
- moteno strjevanje krvi
- trombocitopenija

Skeletne mišice

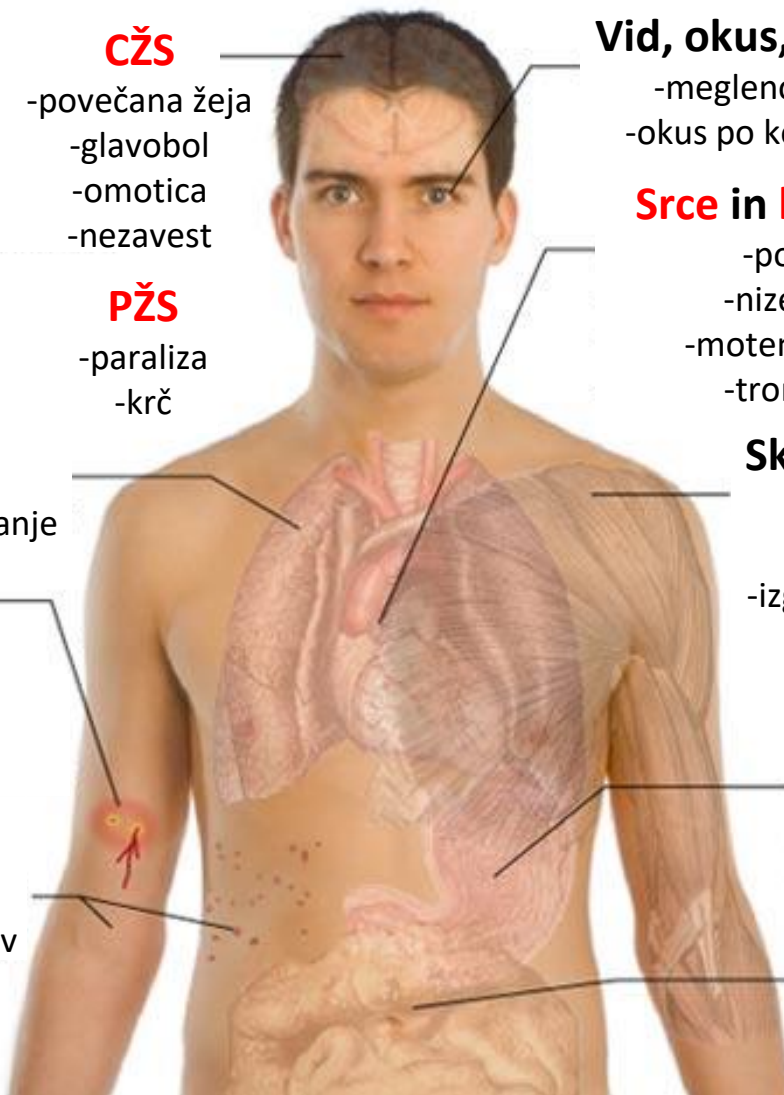
- paraliza
- krč
- izguba koordinacije
- šibkost
- nekroza

Prebavila

- slabost
- bruhanje

Črevesje

- driska





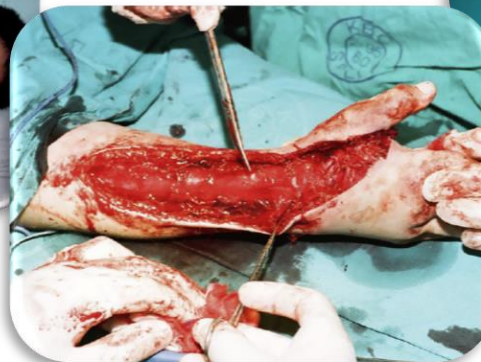
Navadni krajc
(*Bungarus caeruleus*)

Mišična paraliza



Modras
(*Vipera ammodytes*)

Edem (fasciotomija)



Hemoragija



Koagulacija krvi



Ameriška suličarka
(*Bothrops asper*)

Nekroza, gangrena



Mehurjenje, dermonekroza



Indijska kobra
(*Naja naja*)



Toksinološke raziskave vplivajo na različna področja znanosti in življenja

Bazične biomedicinske raziskave

Molekularna orodja

Raziskovalni modeli

Pospešena evolucija

Toksinološke raziskave

Patofiziologija

Terapevtska sredstva

Diagnostična sredstva

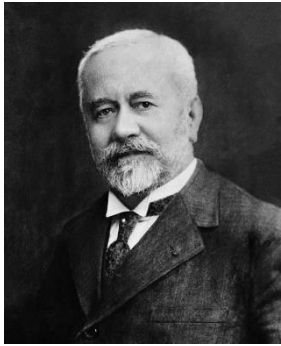
Ciljna dostava učinkovin

Medicina, farmacija, biotehnologija

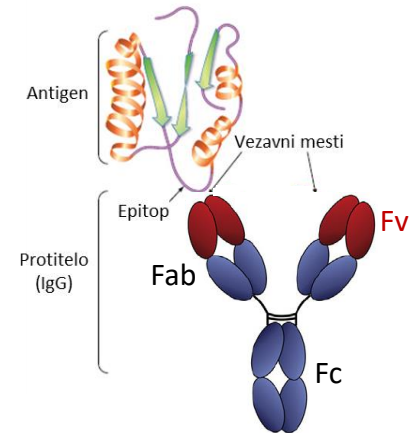
Fitofarmacevtska sredstva

ANTIVENOMIKA: seroterapija zastrupitev

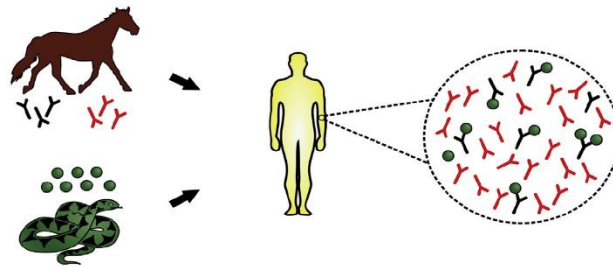
1894 - prvi protistrup proti kačjemu strupu



Priprava protistrupa
z imunizacijo živali

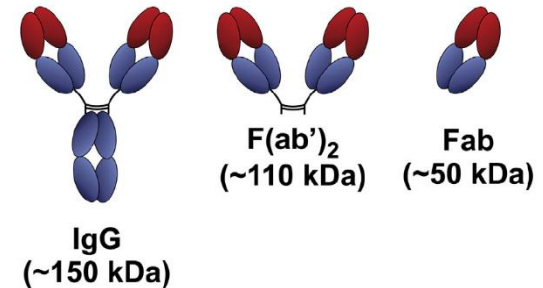


Albert Calmette (1863–1933),
francoski zdravnik, bakteriolog, imunolog in pionir toksinologije
na **Institutu Pasteur** v Parizu

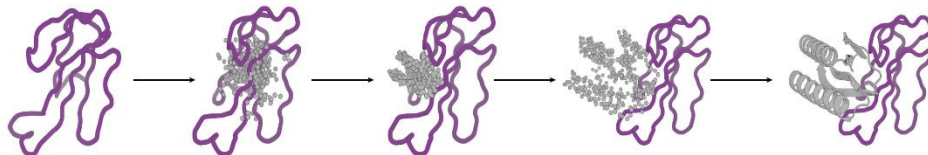


≥70% IgG ne nevtralizira toksinov, izzovejo pa lahko
serumsko slabost ali celo anafilaktični šok

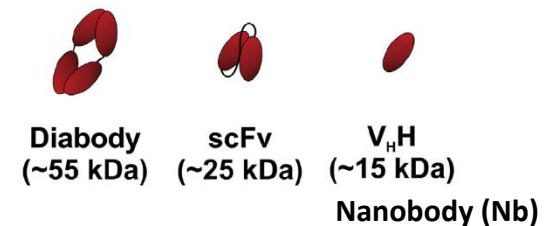
Priprava iz protistrupa



Priprava s tehniko rekombinantne DNA

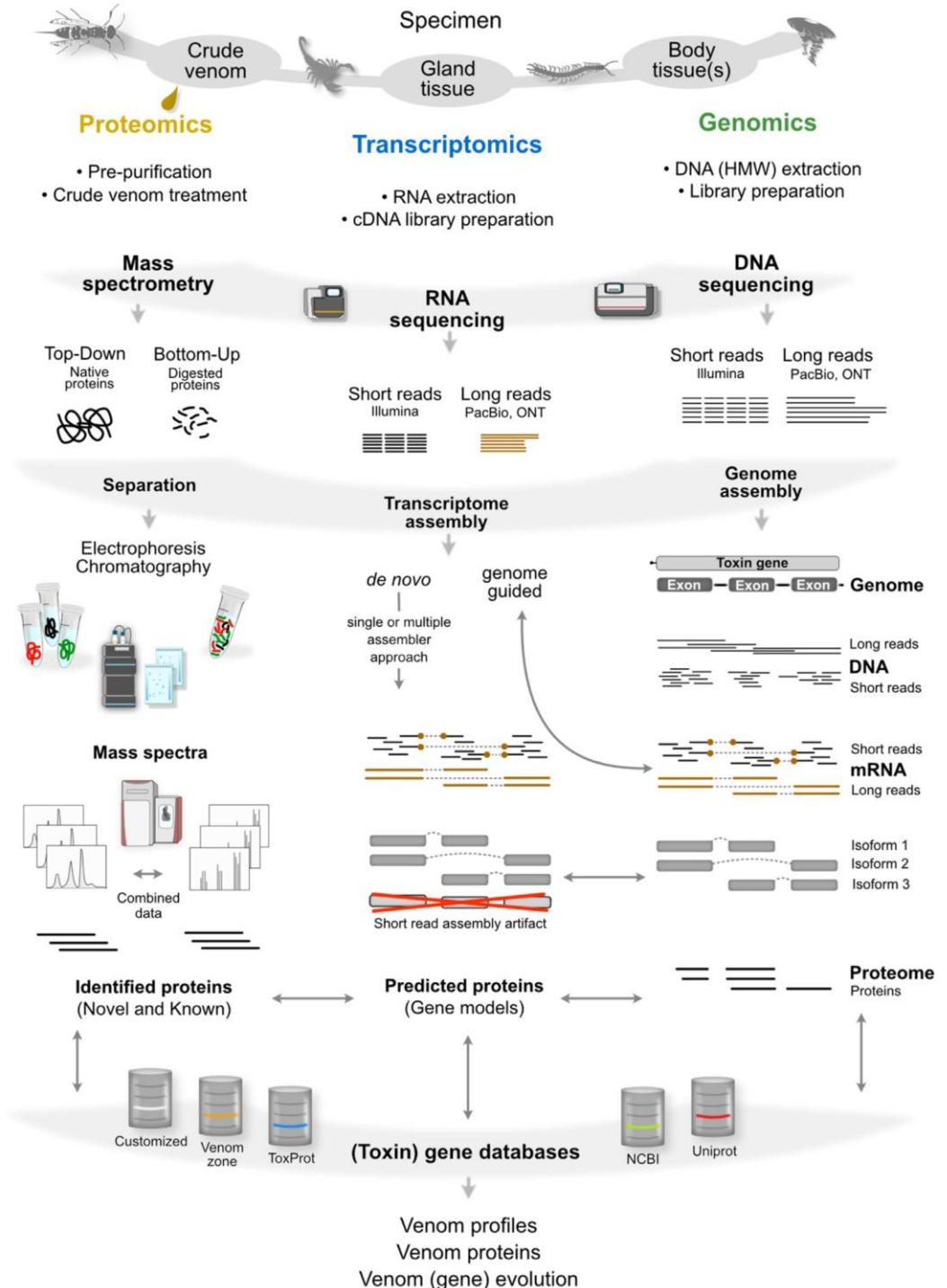


Načrtovanje z
uporabo UI



Analiza sestave strupov, za optimizacijo zdravljenja zastrupitev in še marsikaj drugega.

Integracija PROTEOMIKE, TRANSKRIPTOMIKE in GENOMIKE

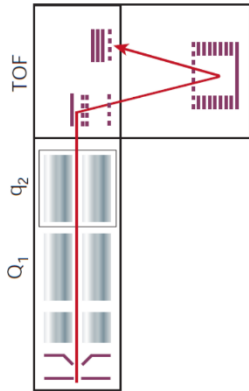


Določili smo popolne proteinske sestave strupov

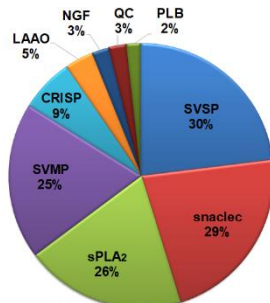
Optimizacija
seroterapije

Novi bioinsekticidi

ESI-Q-TOF



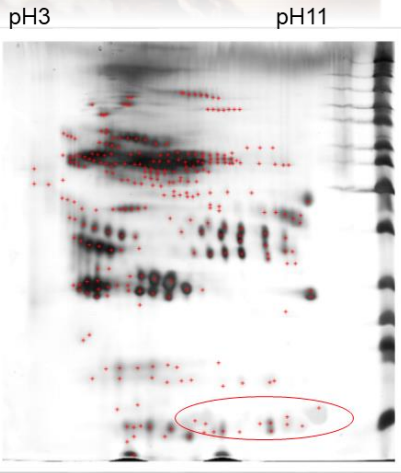
nano-UPLC



modrasa



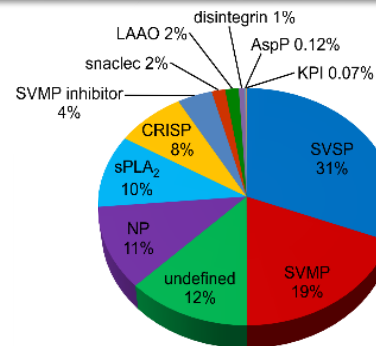
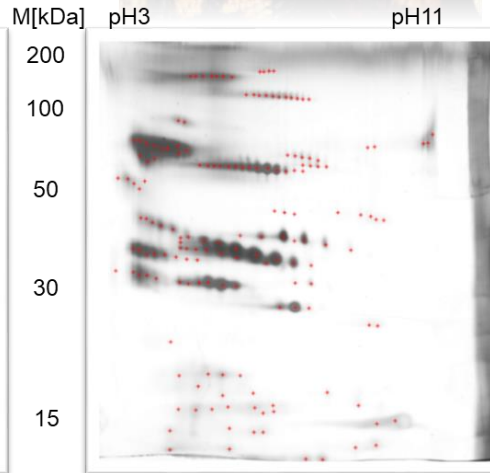
Vipera a. ammodytes



navadnega gada



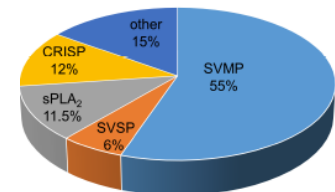
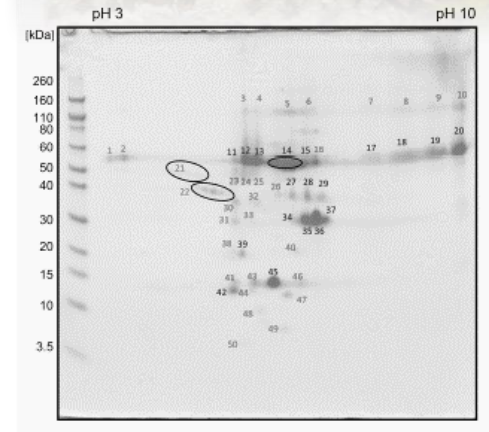
Vipera b. berus



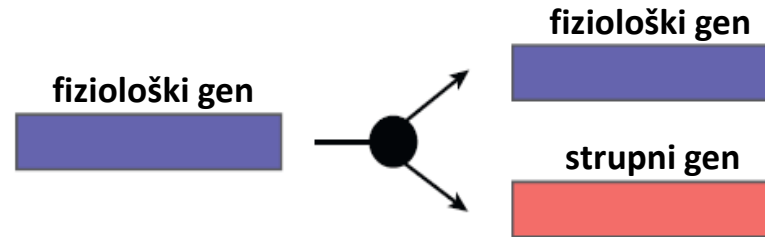
malega gada



Vipera ursinii ssp.



Toksini izvirajo iz molekul s fiziološkimi vlogami



Zaradi strukturne in funkcijske podobnosti s fiziološkimi proteini so toksini lahko uporabni kot

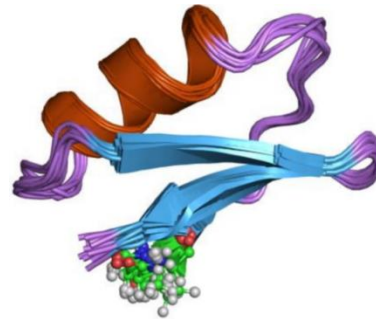
- **molekularna orodja** za bazične biomedicinske raziskave
- **zdravila** ali **izhodne spojine** za **pripravo zdravil**
- **diagnostična sredstva**
- **fitofarmacevtska sredstva**

Uporabni pa so tudi v **biotehnologiji**.

Toksini so MOLEKULARNA ORODJA v bazičnih biomedicinskih raziskavah

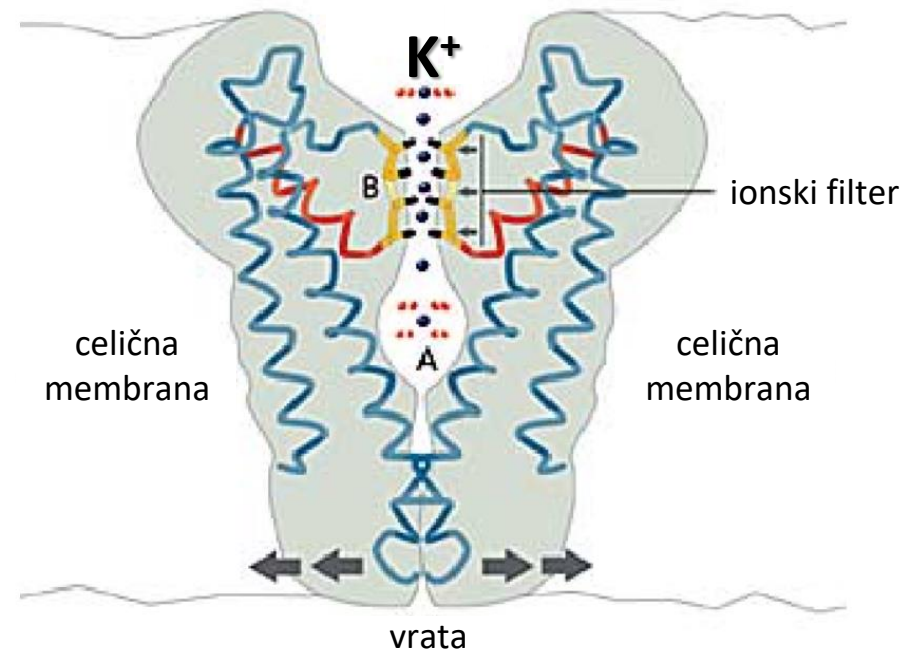


Palestinski rumeni škorpion
(*Leiurus quinquestriatus*)



charybdotoxin

S pomočjo
nevrotoksina iz strupa
škorpijona so opisali
strukturo prvega
ionskega kanala





Tajvanski progasti krajt (*Bungarus multicinctus*)



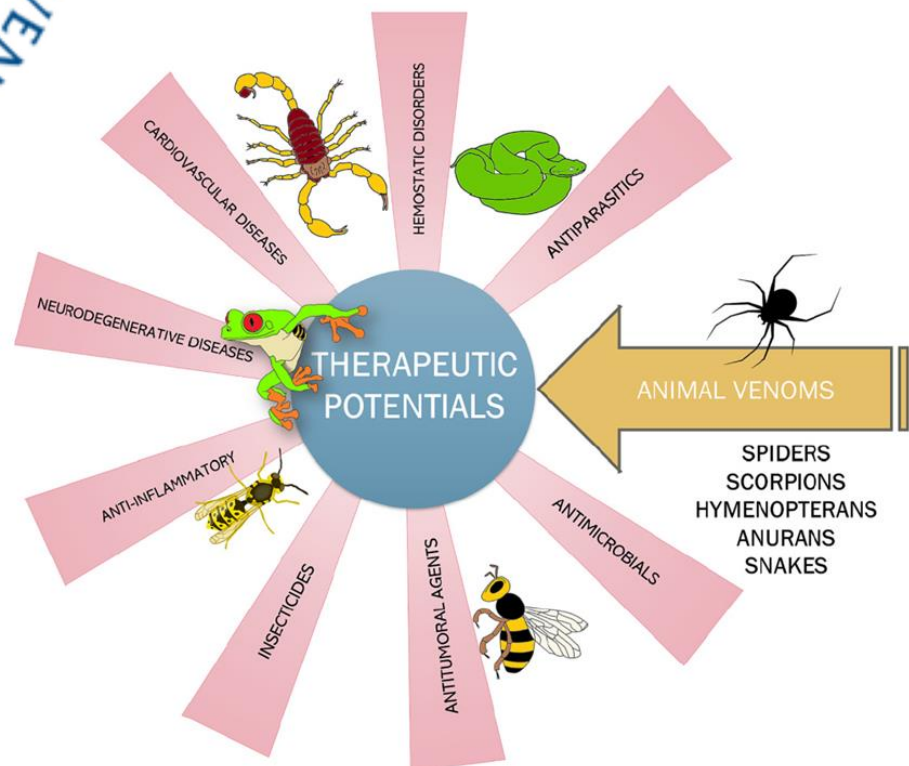
α -Butx



Toksini v MEDICINI in VETERINI



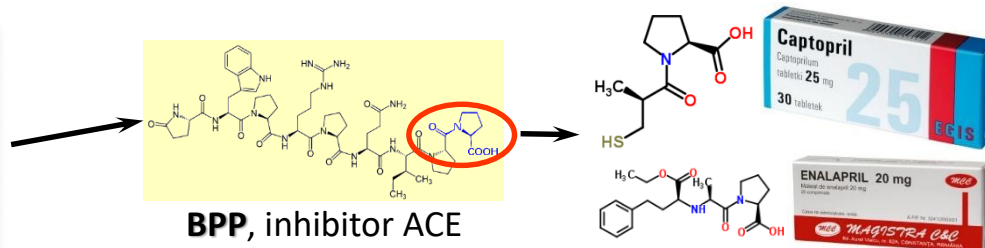
Asklepij-grški bog zdravilstva



Prvo komercialno zdravilo na osnovi naravnega toksina (1981): CAPTOPRIL® – antihipertenzik za zdravljenje visokega krvnega pritiska



Brazilski gad (*Bothrops jararaca*)

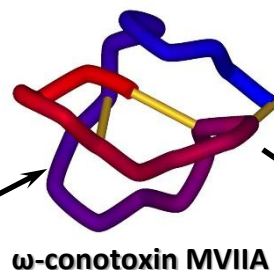


bradikinin (**vazodilator**) $\times$ degradacija
angiotenzin-I $\times$ angiotenzin-II (**vazokonstriktor**)

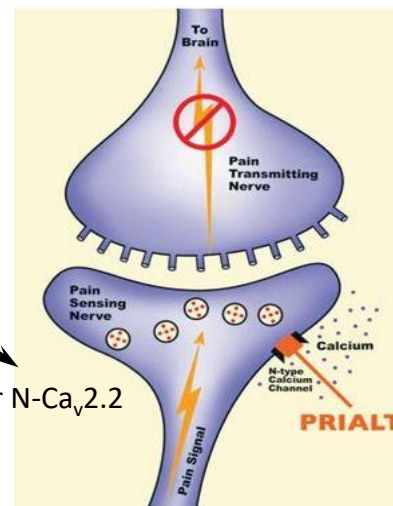
Eno zadnjih registriranih zdravil pri FDA na osnovi naravnega toksina: PRIALT® (ziconotide) – analgetik za zdravljenje kronične, neznosne bolečine



Magični stožec (*Conus magus*)



blokator N-Ca_v2.2

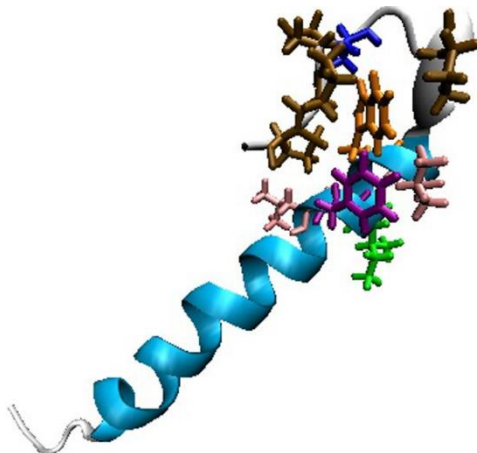


Zdravila za lajšanje sladkorne bolezni



Gilska pošast (*Gila monster*)

Exendin-4



močan agonist GLP-1R

Zaužitje hrane izzove
izločanje **glukagonu
podobnega peptida 1**
(GLP-1) v črevesju



↓ GLP-1 = diabetes tipa 2



Byetta®, AstraZeneca: FDA 2005
Ozempic®, Novo Nordisk: FDA 2017

DPP-4



razgradnja

GLP-1

exendin-4

(odporen na razgradnjo)



trebušna slinavka

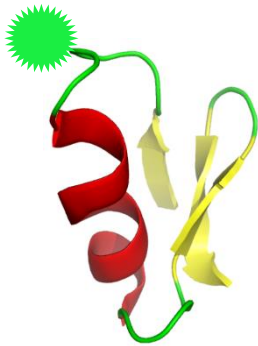
Tako kot **GLP-1** tudi
exendin-4 povzroči:

- ↑ izločanje insulina
- ↓ sproščanje Glc iz jeter
- ↓ praznjenje želodca
- ↓ apetit

DIAGNOSTIKA gliomov, raka na prostati, črevesnega raka in sarkomov

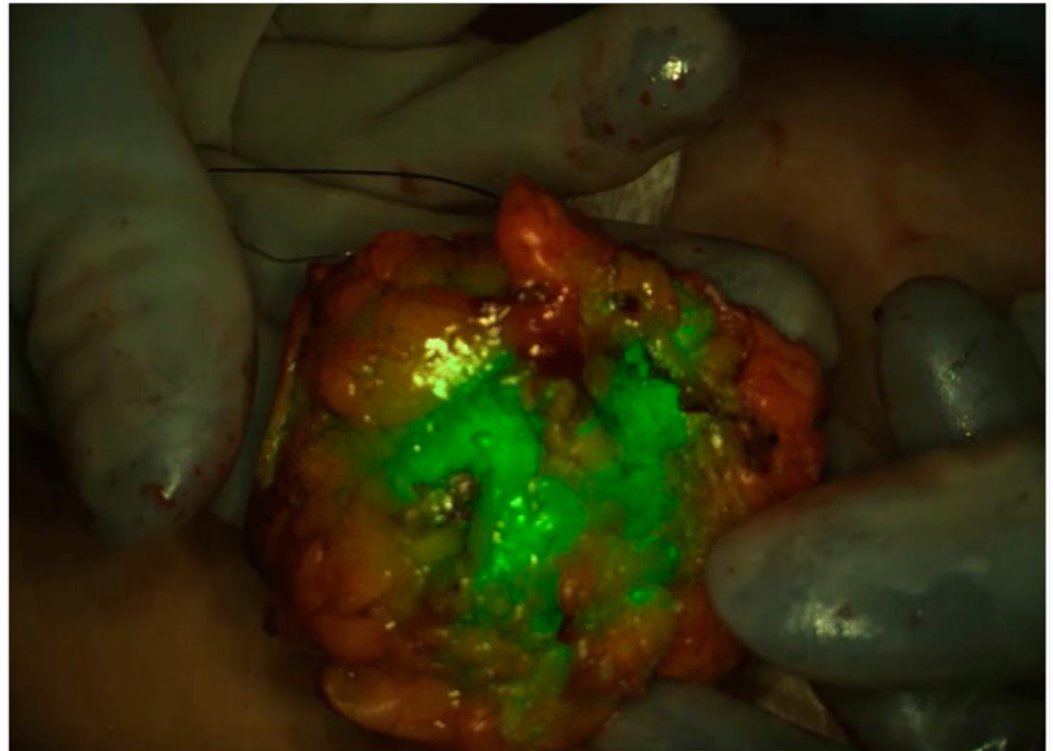


Palestinski rumeni škorpion
(*Leiurus quinquestriatus*)



Chlorotoxin (Toxaleristide - Tumor Paint)
inhibitor glioma-specifičnih Cl^- kanalov
in MMP-2

**500-krat bolj občutljiva detekcija rakastih celic kot
detekcija z magnetno resonanco**



Toksini v AGRONOMIJI:

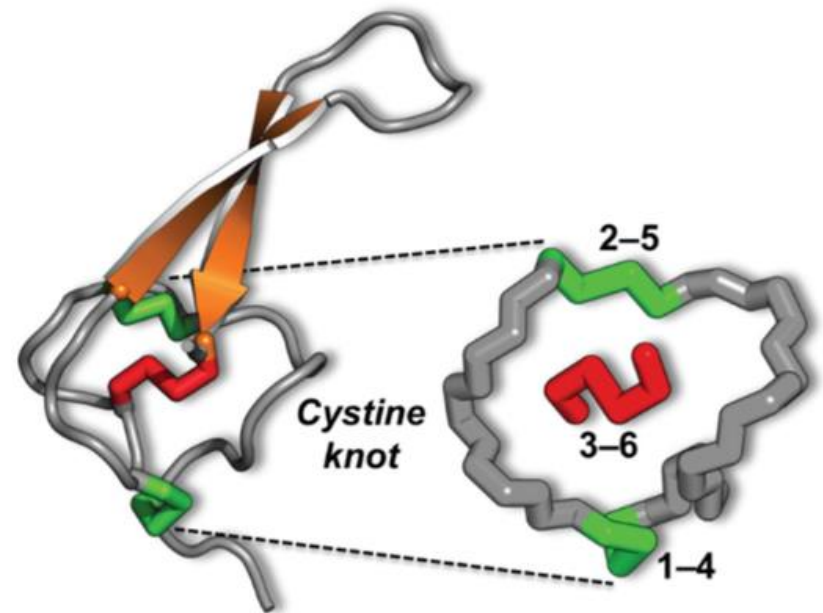
priprava ekoloških biopesticidov



Avstralski lijakasti pajek (*Hadronyche versuta*)

Pajki so “profesionalni morilci žuželk”. Njihovi strupi vsebujejo **insekticidne toksine**, npr. **knotine**, ki delujejo na različne tarče v živčnem sistemu žuželk: nevronske receptorje in transporterje ter ionske kanale.

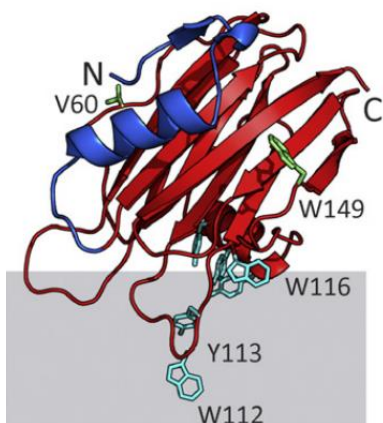
Knotini so nevrotoksični za žuželke, so zelo stabilni **bioinsekticidi**, ne-nevarni za ljudi.



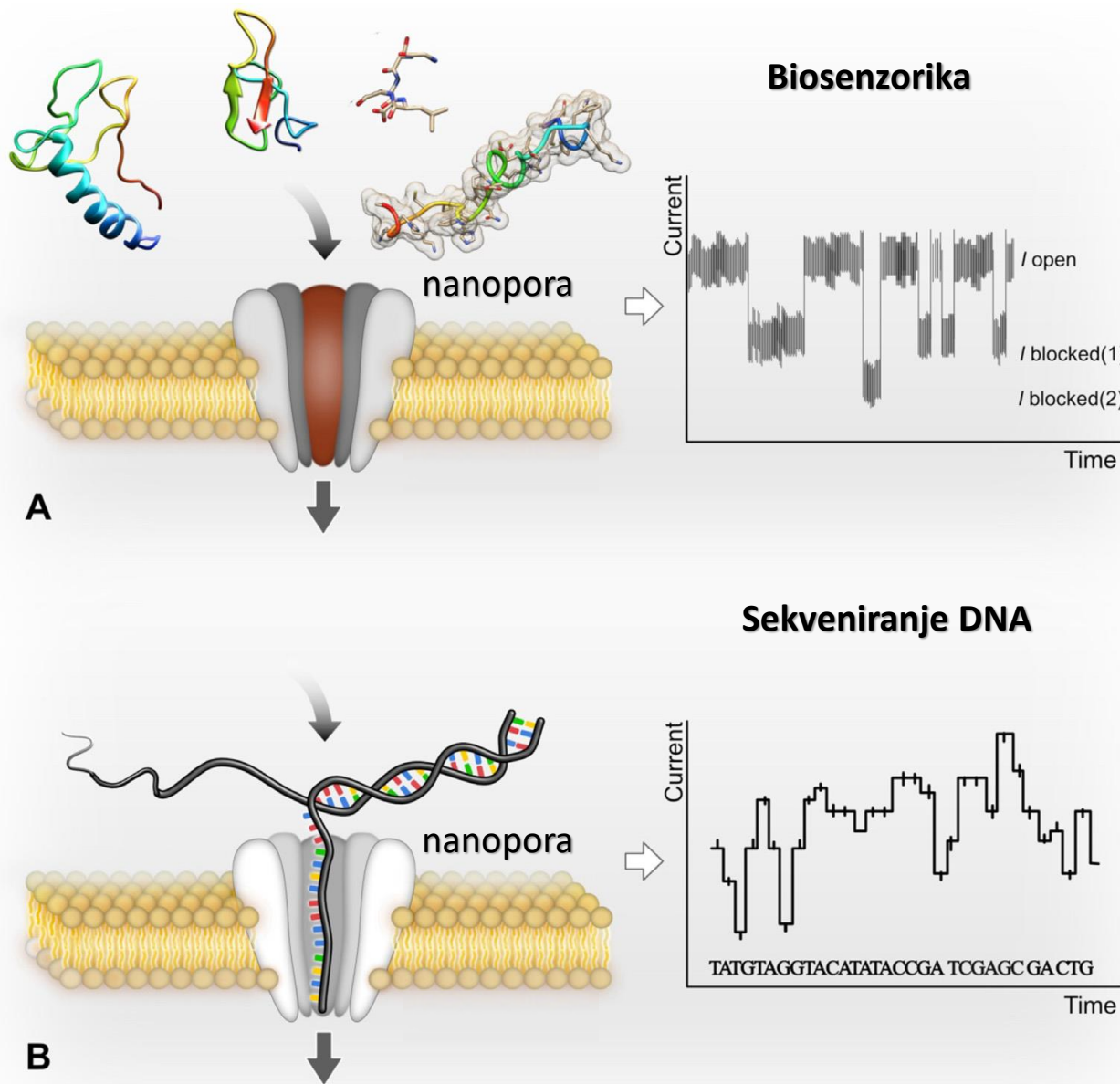


Konjska vetrnica (*Actinia equina*)

Aktinoporini - citolitični toksini, tvorci nanopor lipidnih membranah



Toksini v BIOTEHNOLOGIJI



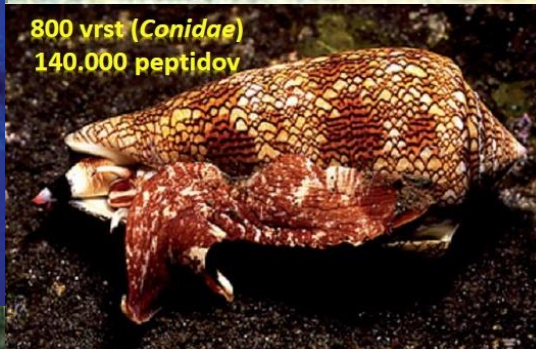
Živalski strupi skupaj vsebujejo **>20 Mio toksinov**: do neke mere je raziskanih le nekaj 1000



Vsak strup vsebuje v povprečju 100
farmakološko aktivnih polipeptidov
ali toksinov



Poznamo ~220.000 strupenih živalskih vrst



800 vrst (*Conidae*)
140.000 peptidov



1.400 vrst
140.000 peptidov/proteinov



>2.900 vrst
290.000 peptidov/proteinov



>55.000 vrst
več milijonov peptidov



Naši najbolj vroči temi

<http://www-b2.ijs.si/>

B2

@ JOŽEF STEFAN
INSTITUTE

HOME / RESEARCH / PEOPLE / PUBLICATIONS / EQUIPMENT / SEMINARS
/ STUDENT INFO / ALUMNI / NEWS / LINKS

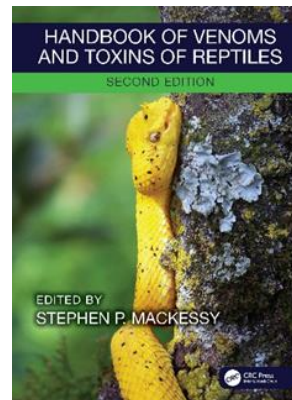
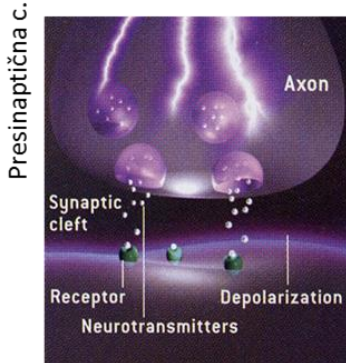
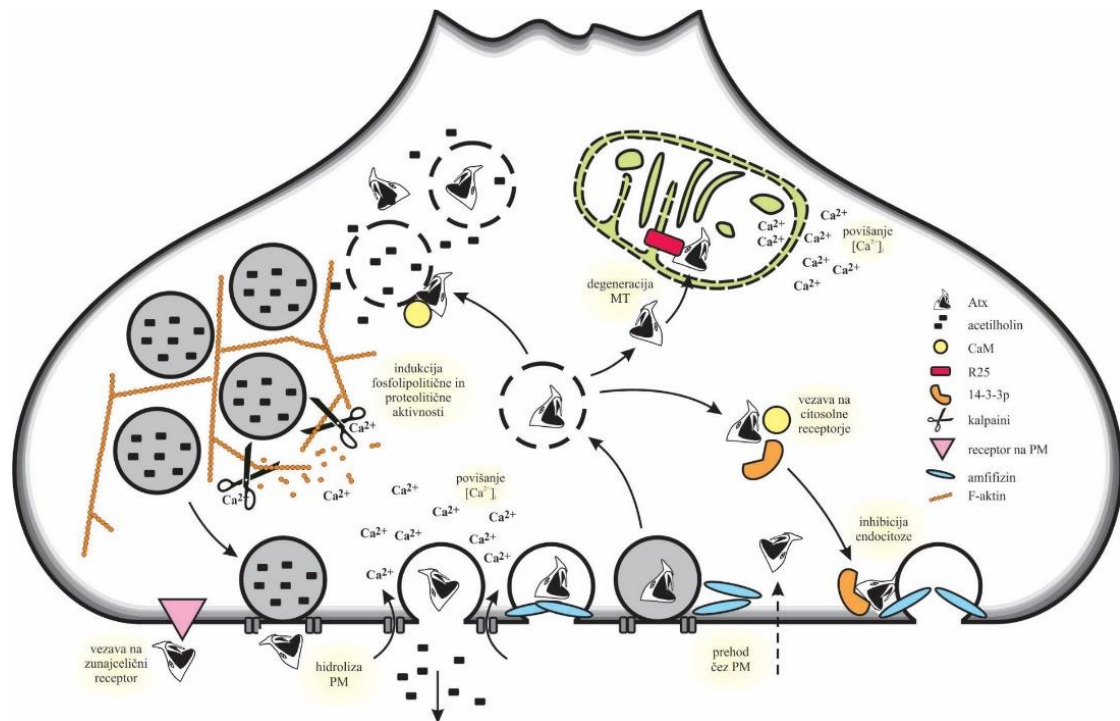
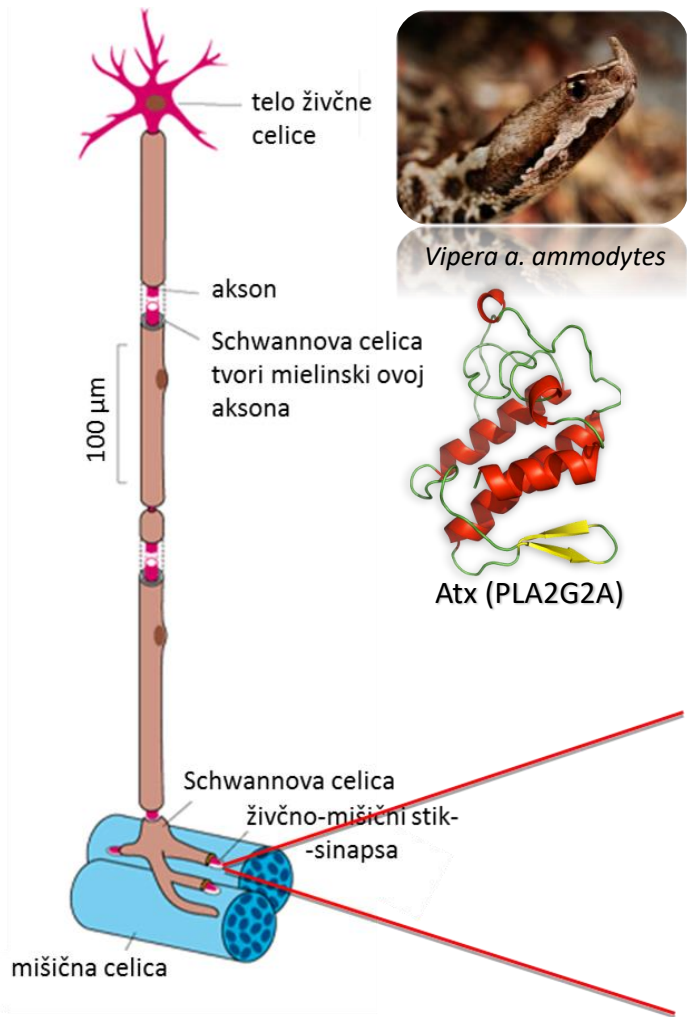


Toxinology
to improve human and animal health



Department of Molecular and Biomedical Sciences (B2), Jožef Stefan Institute

Opis molekularnega mehanizma delovanja nevrotoksične sPLA₂ iz modrasovega strupa



Lomonte & Križaj (2021):
Snake Venom Phospholipase A₂ Toxins;
Chapter 26, pp. 389–411.

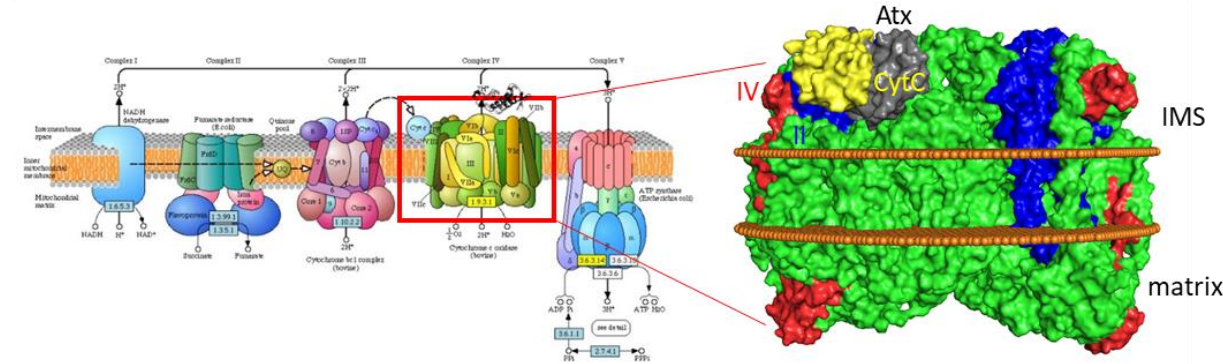
Mitohondrij je ena od tarč Atx v živčni celici

SCIENTIFIC REPORTS
(2019) 9:283 | DOI:10.1038/s41598-018-36461-6

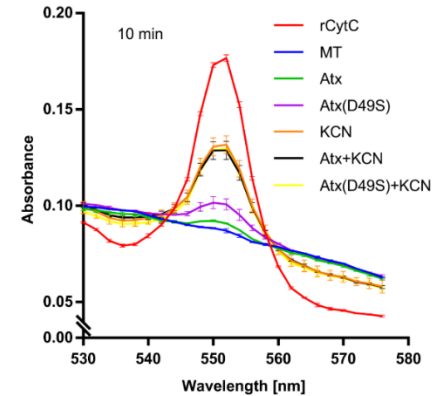
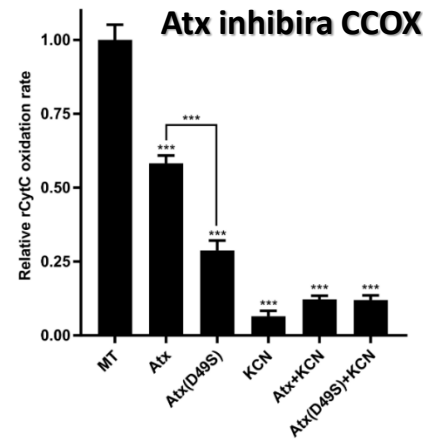
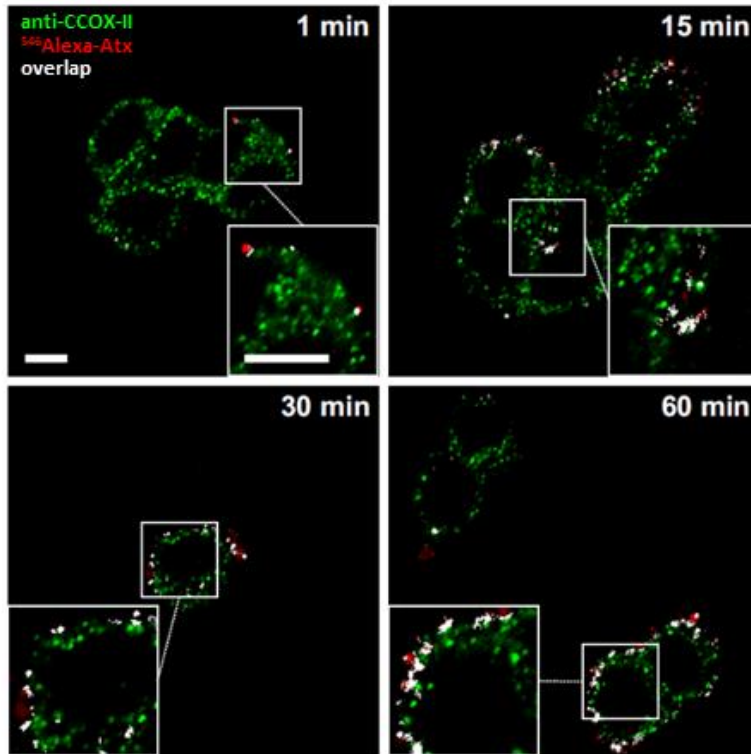
OPEN

The neurotoxic secreted phospholipase A₂ from the *Vipera a. ammodytes* venom targets cytochrome c oxidase in neuronal mitochondria

Jernej Šribar¹, Lidija Kovačič¹, Jernej Oberžkal¹, Adrijan Ivanušec^{1,2}, Toni Petani¹, Jay W. Fox³ & Igor Križaj¹



Atx doseže CCOX v živih PC12 celicah



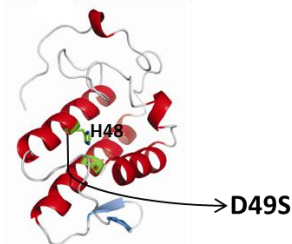
Toxins 2022, 14, 375. <https://doi.org/10.3390/toxins14060375>



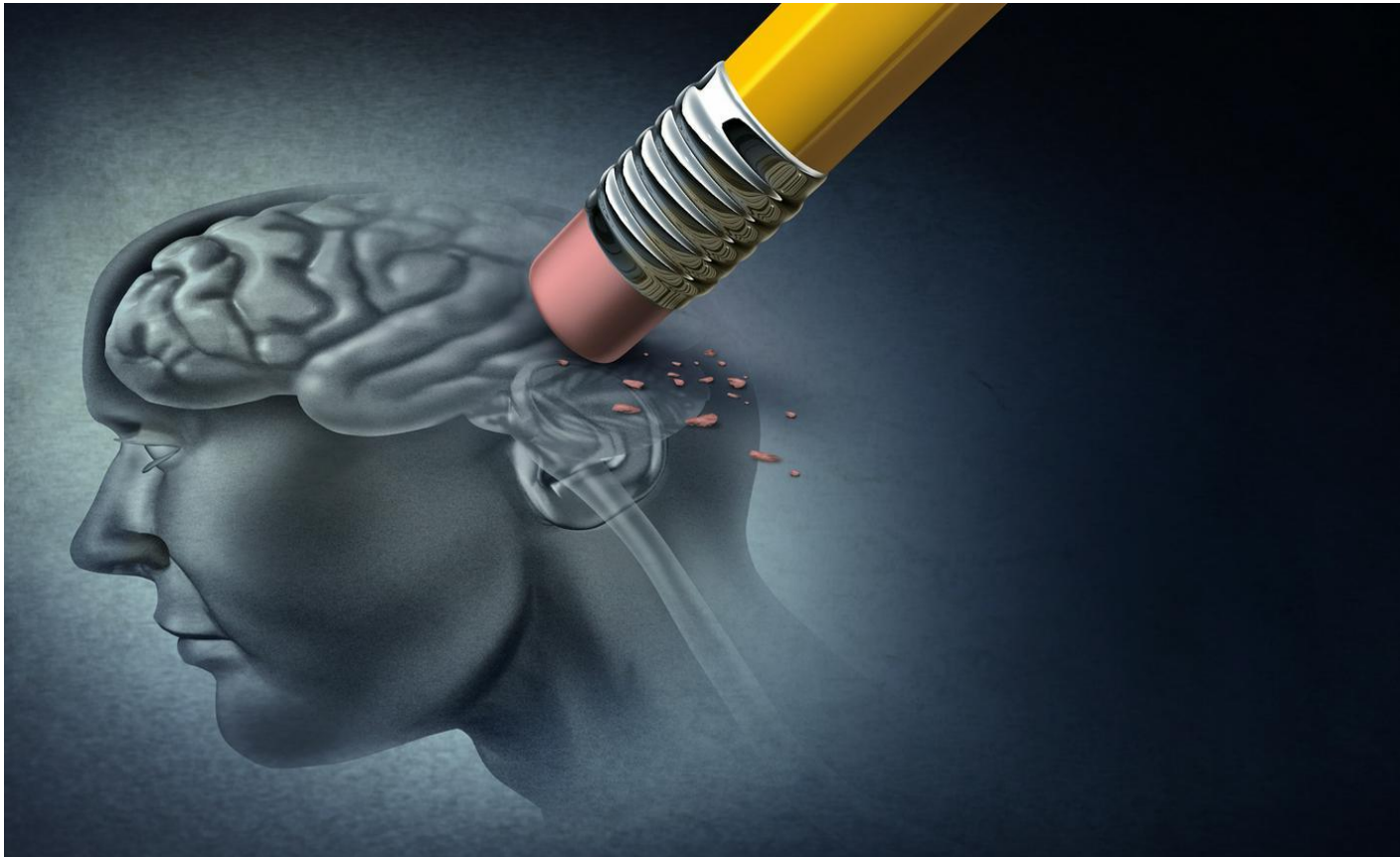
Article

The Phospholipase Activity of Ammodytoxin, a Prototype Snake Venom β -Neurotoxin, Is Not Obligatory for Cell Internalisation and Translocation to Mitochondria

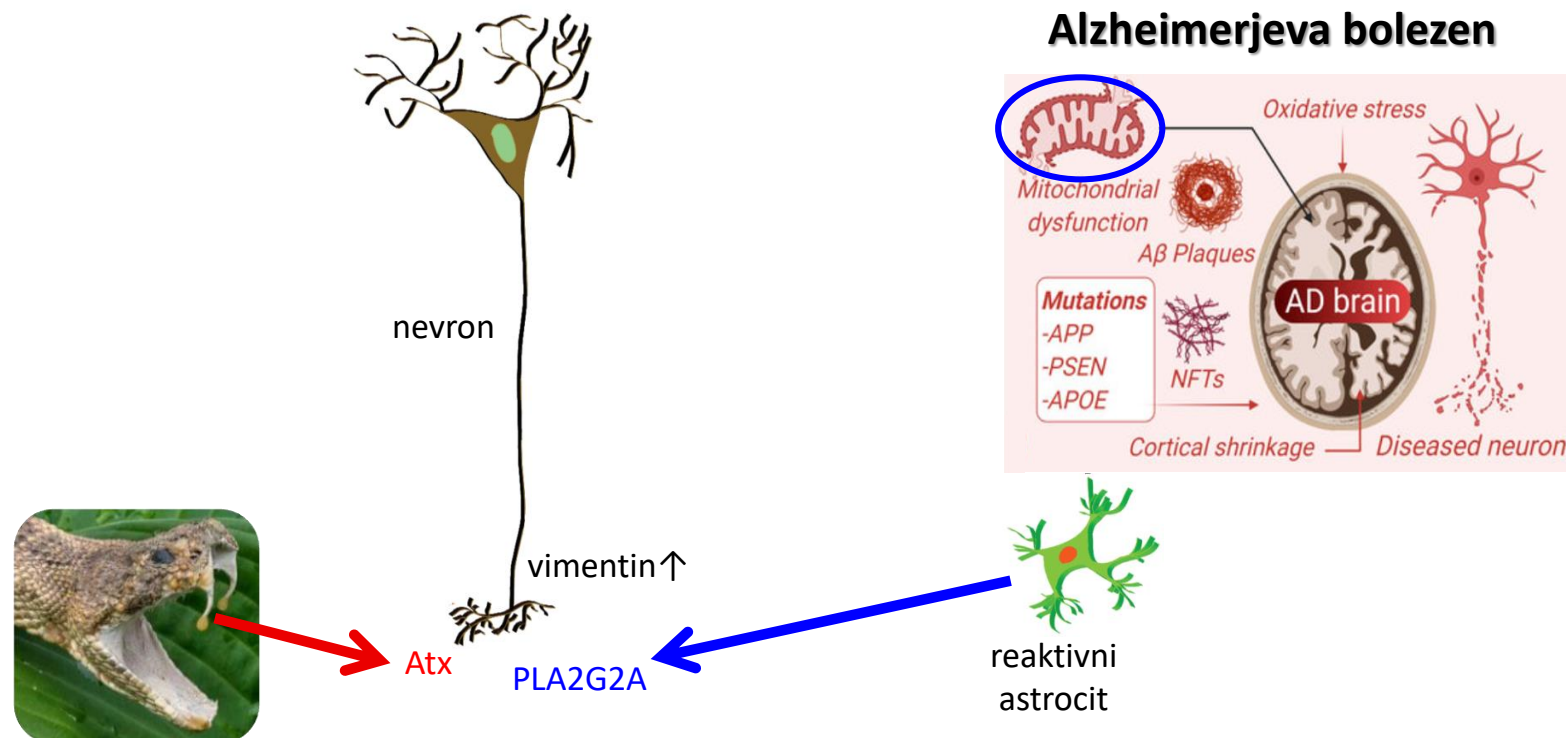
Adrijan Ivanušec^{1,2}, Jernej Šribar¹, Peter Veranič^{3,*} and Igor Križaj^{1,*}



Povezava z Alzheimerjevo boleznijo

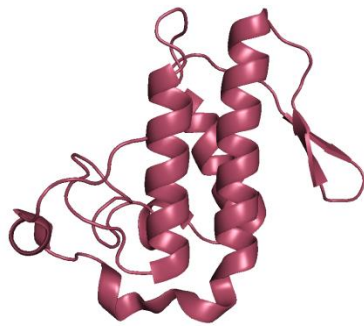


- najpogostejše diagnosticirana napredujoča oblika demence
 - molekularni mehanizem je NEZNAN
 - zdravila NI

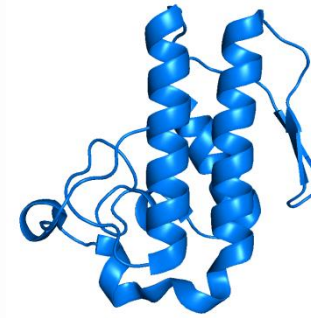
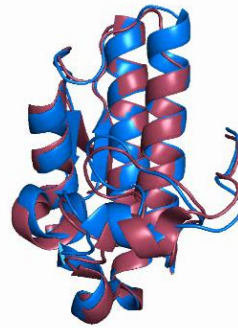


HIPOTEZA

Povišana koncentracija zunajcelične PLA2G2A v možganih bolnika z AD zastrupi živčno celico na podoben način kot jo zastrupi nevrotoksična PLA2G2A iz kačjega strupa.



Atx



rGIIA

PREIZKUS KONCEPTA ⇒



International Journal of
Molecular Sciences

Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 12368. <https://doi.org/10.3390/ijms232012368>



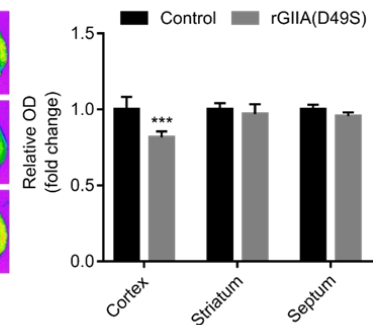
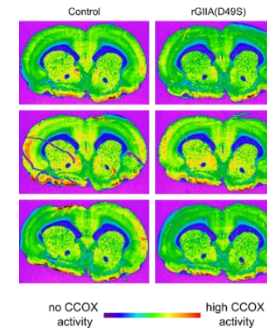
Article

Rat Group IIA Secreted Phospholipase A₂ Binds to Cytochrome c Oxidase and Inhibits Its Activity: A Possible Episode in the Development of Alzheimer's Disease

Adrijan Ivanušec ^{1,2}, Jernej Šribar ¹, Adrijana Leonardi ¹, Maja Zorović ³, Marko Živin ³ and Igor Kržaj ^{1,*}



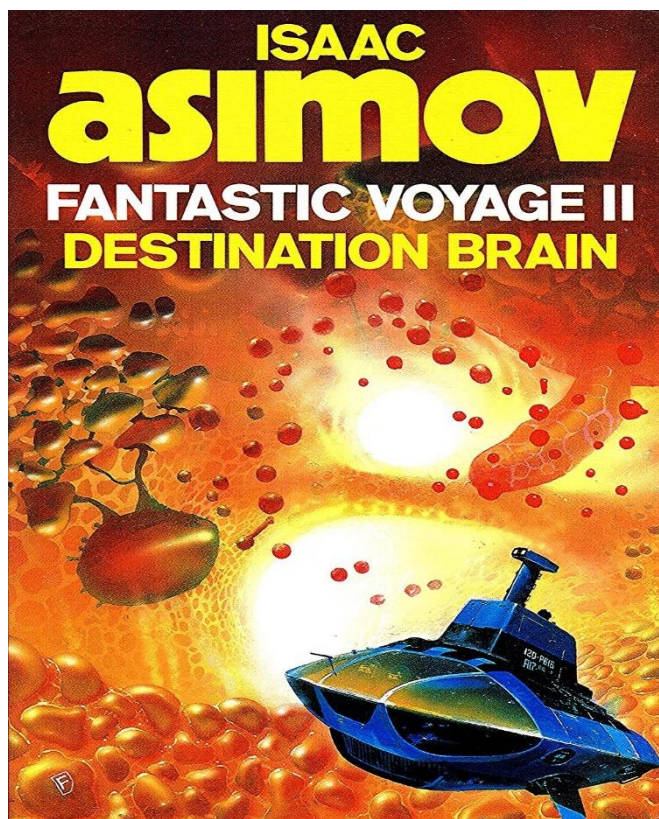
+ rGIIA(D49S)
+ CytC_{red}
+ DAB



Podganja, torej sesalska PLA2G2A, deluje na podganje nevronske mitohondrije na enak način kot kačji nevrotoksin. Tudi *ex vivo*, na rezinah podganjih možgan, je PLA2G2A zavrla delovanje CCOX.

SKLEP

Utemeljili smo prvi originalni predlog za razlago nastanka AD na molekulskem nivoju, s tem pa ponudili nova izhodišča tako za zdravljenje kot diagnostiko te hude nevrodegenerativne bolezni.



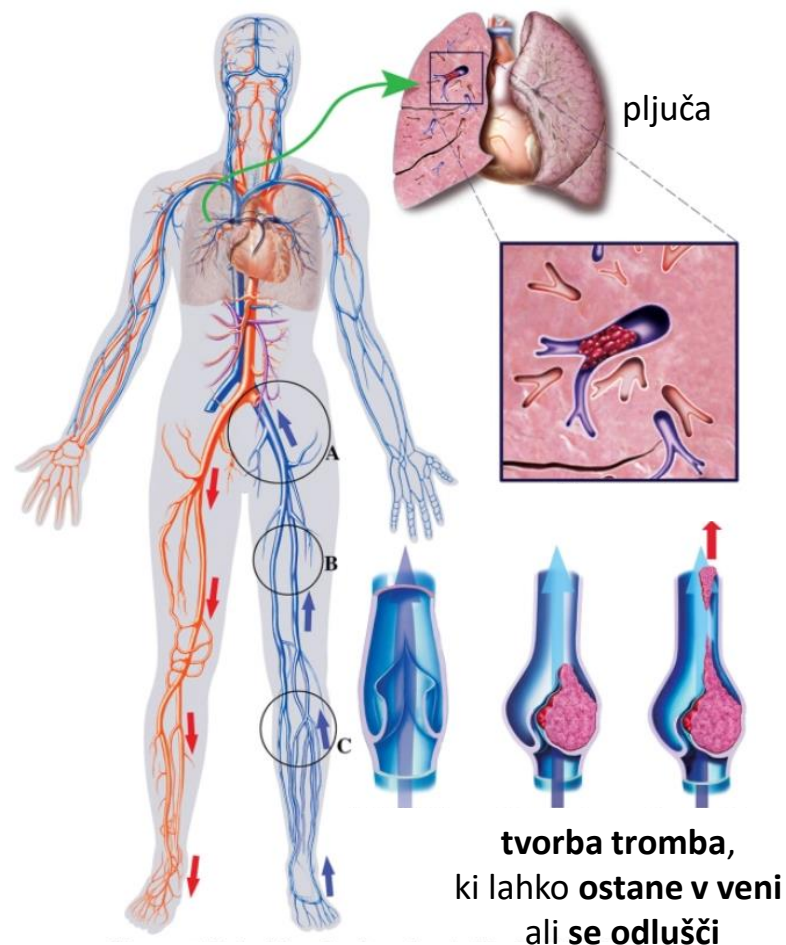
Srčno-žilne bolezni – glavni vzrok za umiranje ljudi

Globalno: 31% vseh smrti (17.7 mio/leto)

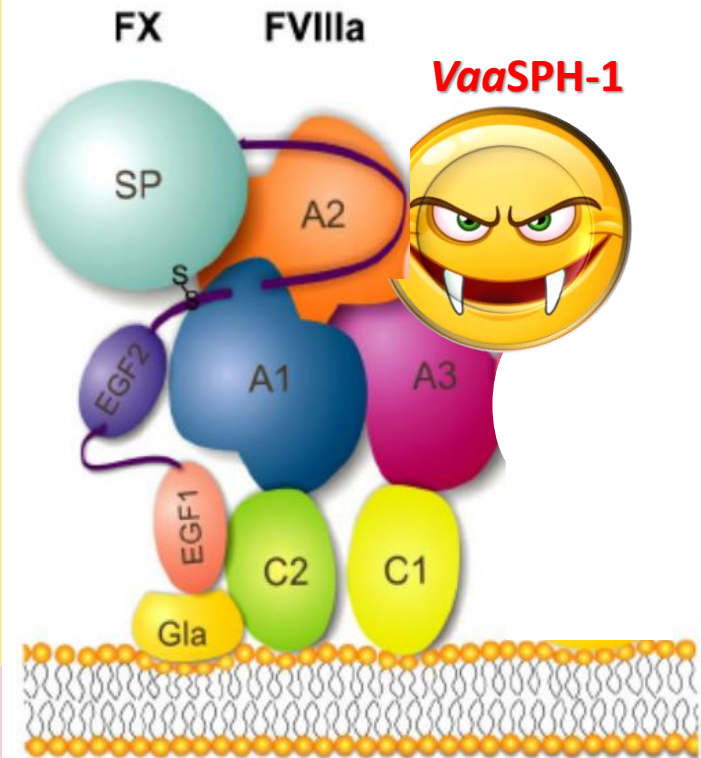
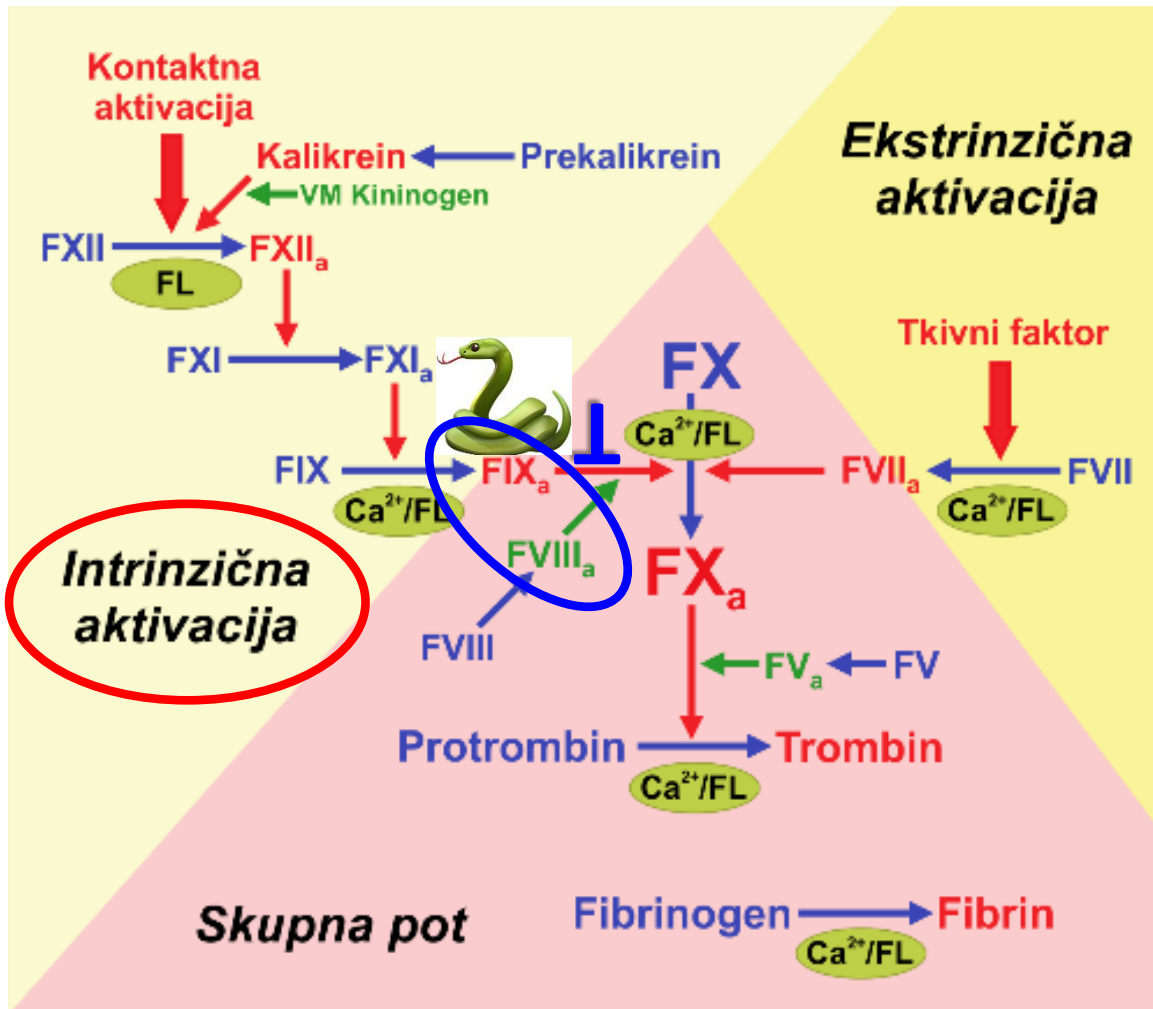
Evropa: 45% vseh smrti (3.9 mio/leto),

85 milijonov ljudi trpi zaradi SŽB

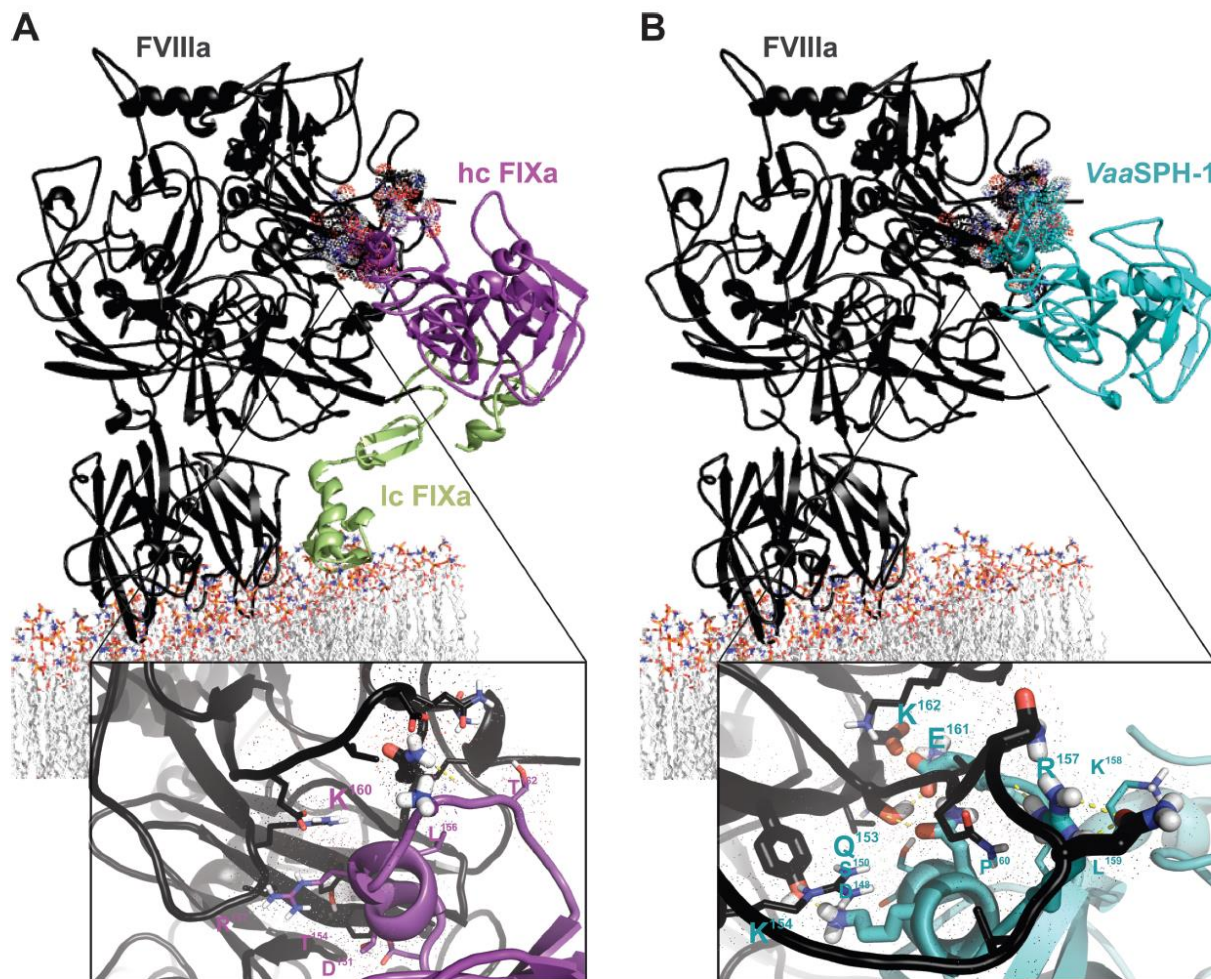
IZZIV: neustrezna terapija
venske trombembolije in
posledično z njo povezanih SŽB
– tromboze globokih ven in
pljučne embolije



Vzrok za vensko trombembolijo je v prekomernem strjevanju krvi po notranji poti



Natančen opis stične površine med FVIIIa in *VaaSPH-1*: temelj za načrtovanje nizkomolekularnih antikoagulantov, specifičnih le za preprečevanje strjevanja krvi po notranji poti



Thrombosis and Haemostasis

International Journal for Vascular Biology and Medicine

Coagulation and Fibrinolysis 1713

The First Intrinsic Tenase Complex Inhibitor with Serine Protease Structure Offers a New Perspective in Anticoagulant Therapy

Zorica Latinović^{1,2} Adrijana Leonardi¹ Lidija Kovačič^{1,3} Cho Yeow Koh^{4,5} Jernej Šribar¹
Alenka Trampuš Bakija⁶ Divi Venkateswarlu⁷ R. Manjunatha Kini⁴ Igor Krizaj¹

¹Department of Molecular and Biomedical Sciences, Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia

²Jožef Stefan International Postgraduate School, Ljubljana, Slovenia

³Global Drug Development, Novartis Ireland Ltd, Dublin, Ireland

⁴Protein Science Laboratory, Department of Biological Sciences, Faculty of Science, National University of Singapore, Singapore, Singapore

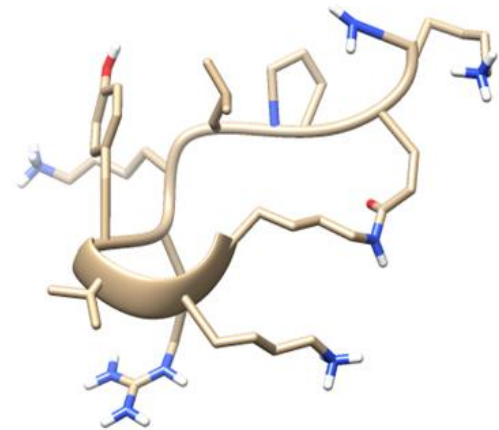
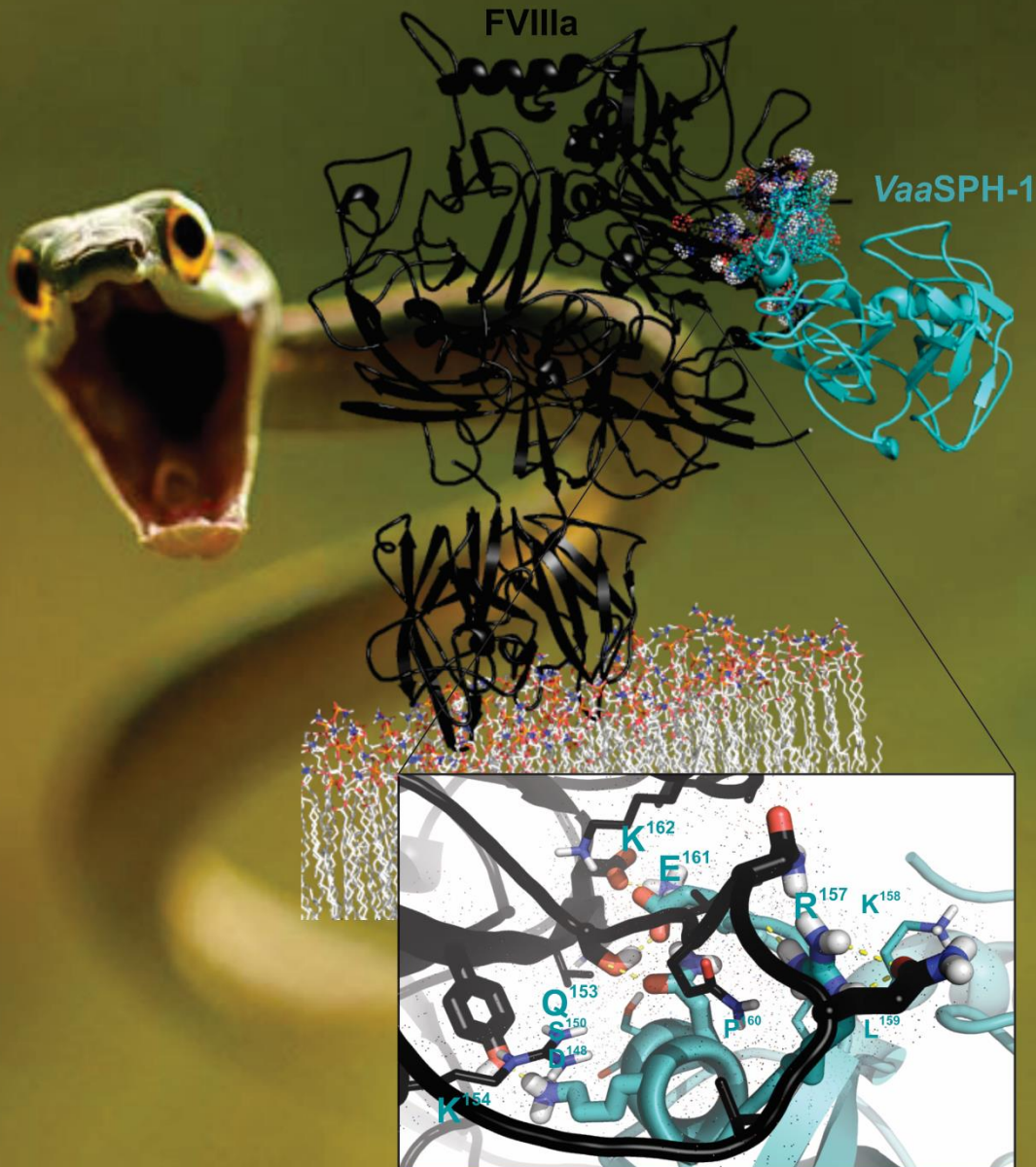
⁵Department of Medicine, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore, Singapore

⁶Division of Pediatrics, University Medical Center Ljubljana, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

⁷Department of Chemistry, North Carolina Agricultural and Technical State University, Greensboro, North Carolina, United States

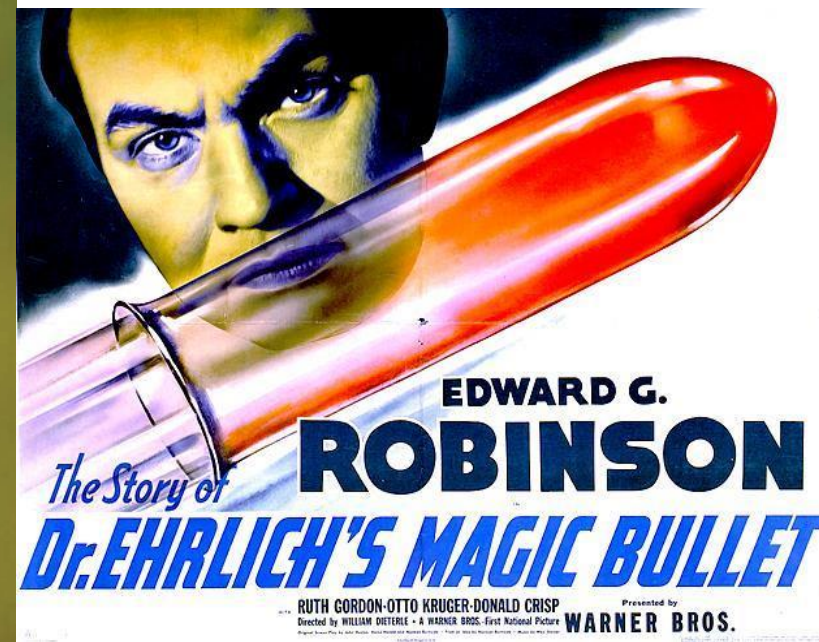
Address for correspondence: Igor Krizaj, PhD, Department of Molecular and Biomedical Sciences, Jožef Stefan Institute, Jamova 39, 1000 Ljubljana, Slovenia (e-mail: igor.krizaj@ijs.si).

Thromb Haemost 2018;118:1713–1728.



- specifičen za notranjo pot
- 25x šibkejši inhibitor od VaaSPH-1

Odkritje, ki veliko obeta!



Seminarji

Seminarska tema	Seminar pripravijo	Na dan
1 - Metabotropni receptorji	Tinkara Korošec, Teo Trost, Zara Bunc, Živa Flego, Zarja Doberšek	6.5.2025
2 - Ionotropni receptorji	Ula Mikoš, Urša Lah, Lara Zupanc, Nika Frelih, Maša Karčovnik	6.5.2025
3 - Receptorji z lastno encimsko aktivnostjo	David Valte, Lev Jošt, Martin Stanonik, Marko Kovačić, Peter Gričar Vintar	13.5.2025
4 - Napetostno-odvisni ionski kanali	Mia Kobal, Gal Kastelic, Leila Bohorč, Pia Trošt, Suzana Kučuk	13.5.2025
5 - Mehansko-občutljivi ionski kanali	Teja Spruk, Klara Razboršek, Maja Deutsch, Mark Loborec, Nuša Brdnik	20.5.2025
6 - Transport proteinov čez biol. membrane	Kostadin Mitkov, Ela Kovač, Alliana Kolar, Lana Kores, Luka Hafner	20.5.2025
7 - Modifikacije proteinov z lipidi	Nataša Vujović, Miljan Trajković, Ena Kartal, Irina Kostadinowska, Erik Štromberger	27.5.2025
8 - Regulacija membr. proteinov s šedazami	Tinkara Butara, Gaja Starc, Petja Premrl, Pia Špehar, Zarja Weingerl	27.5.2025
9 - Biološke membrane in imunski odziv	Ana Maučec, Rebeka Jerina, Lucija Pišek, Jan Trebušak, Anja Moškrič, Vanja Ivošević	27.5.2025

Spletna stran predmeta:

<http://www-b2.ijs.si/people/krizaj/biological-membranes/>

People → Igor Križaj – *More ...* →
→ Teaching Assignments/BIOLOGICAL
MEMBRANES

BIOLOGICAL MEMBRANES

[Home](#) / [People](#) / [Krizaj](#) / Biological Membranes

BIOLOŠKE MEMBRANE - Gradiva za študente

Predavanja

- Uvod in predstavitev
- Struktura in dinamika bioloških membran
- Transport ionov in malih molekul čez lipidne membrane
- Čiščenje membranskih proteinov
- Struktura in funkcija lipidnih mikrodomen
- Medcelična signalizacija - 1. del (signalne molekule in receptorji)
- Medcelična signalizacija - 2. del (prenos živčnega signala, ukrivljanje in zlivanje membran)
- Povezovanje celic v tkiva
- Lipidi in signalizacija
- Distribucija in dinamika lipidov v celici: lipidne kapljice in uravnavanje membranske sestave

Seminarji - poročila

- Metabotropni receptorji
- Ionotropni receptorji
- Receptorji z lastno encimsko aktivnostjo
- Napetostno-odvisni ionski kanali
- Mehansko-občutljivi ionski kanali
- Transport proteinov čez biološke membrane
- Modifikacije proteinov z lipidi
- Regulacija membranskih proteinov s šedazami
- Biološke membrane in imunski odziv

Seminarji - predstavitve

- Metabotropni receptorji
- Ionotropni receptorji
- Receptorji z lastno encimsko aktivnostjo
- Napetostno-odvisni ionski kanali
- Mehansko-občutljivi ionski kanali
- Transport proteinov čez biološke membrane
- Modifikacije proteinov z lipidi
- Regulacija membranskih proteinov s šedazami
- Biološke membrane in imunski odziv

Izpiti

- 3. julij 2025 (četrtek)
- 29. avgust 2025 (petek)
- 11. september 2025 (četrtek)