

**BIO**molekularec.si

Dan biomolekularnih znanosti



SLOVENSKO  
BIOKEMIJSKO  
DRUŠTVO

Zbornik povzetkov

Ljubljana, 29. september 2022

Katalogni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani  
[COBISS.SI-ID 122218243](#)  
ISBN 978-961-95941-0-0 (PDF)

**DAN BIOMOLEKULARNIH ZNANOSTI**  
**BIOMolekularec 2022**

**Organizator:**

Slovensko biokemijsko društvo

**Kraj prireditve:**

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana

**Uredniki:**

Aljoša Bavec, Blaž Cigić, Bojan Doljak, Miha Pavšič, Ajda Taler-Verčič

**Računalniško oblikovanje:**

Miha Pavšič

**Založnik:**

Slovensko biokemijsko društvo

**Spletni naslov:**

[http://biomolekularec.splet.arnes.si/files/2022/09/BIOMolekularec\\_2022-zbornik.pdf](http://biomolekularec.splet.arnes.si/files/2022/09/BIOMolekularec_2022-zbornik.pdf)

**Programski in organizacijski odbor:**

Miha Pavšič (predsednik)

Aljoša Bavec

Blaž Cigić

Bojan Doljak

Ajda Taler-Verčič

Ljubljana, 2022

# PROGRAM SREČANJA

8.15–8.30 OTVORITEV: prof. dr. Roman Jerala, predsednik Slovenskega biokemijskega društva

## Sekcija 1

Vodja sekcije: Aljoša Bavec

- 
- 8.30–8.45 Rok GAŠPERŠIČ, UL Medicinska fakulteta  
**Biomolekule za diagnostiko in zdravljenje parodontalne bolezni**
- 8.45–8.55 Tina LEVSTEK, UL Medicinska fakulteta  
**MikroRNA, izolirane iz urinskih zunajceličnih veziklov, kot novi označevalci razvoja in napredovanja Fabryjeve nefropatije**
- 8.55–9.05 Maša ČATER, UL Biotehniška fakulteta  
**Profil izražanja *Pla2g4e* v *musculus gastrocnemius* pri debeli in vitki liniji miši**
- 9.05–9.15 Manca ČRNIČ, Gimnazija Vič  
**Vpliv časa in temperature shranjevanja na koncentracijo DNA**
- 9.15–9.25 Eva BITEŽNIK, Gimnazija Kranj  
**Tvorba protiteles pri bolnikih s SARS-CoV-2**
- 9.25–9.45 ODMOR

## Sekcija 2

Vodja sekcije: Miha Pavšič

- 
- 9.45–10.00 Gregor GUNČAR, UL Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo  
**Uporaba strojnega učenja za načrtovanje genov**
- 10.00–10.10 Jerneja NIMAC, UL Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo  
**Interakom človeškega matrina 3**
- 10.10–10.20 Lana VOGRINEC, UL Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo  
**Povezave med strukturo in funkcijo metakaspaz CrMCA-I in CrMCA-II iz alge *Chlamydomonas reinhardtii***
- 10.20–10.30 Jernej BIRK, Domen HOČEVAR, Kaja RANGUS, Gimnazija Novo mesto  
**Uporaba mikrotermoforeze za določanje vezave sladkorjev na izolektin rCnSLB2**
- 10.30–10.40 Matija DERGANČ, Jakob GOLUBIČ, Gimnazija Vič  
**Novi zaviralci proteina toplotnega šoka 90 za zdravljenje raka**
- 10.40–11.00 ODMOR

## Sekcija 3

Vodja sekcije: Bojan Doljak

---

- 11.00–11.15 Marko ANDERLUH, *UL Fakulteta za farmacijo*  
**Močni zaviralci DNK giraze se vežejo asimetrično na svojo tarčo prek simetrično razcepljene halogenske vezi**
- 11.15–11.25 Janja DERMOL-ČERNE, *Novartis, Razvoj bioloških učinkovin, Lek Pharmaceuticals d.d.*  
**Z računalnikom hitreje in enostavneje do bioloških zdravil**
- 11.25–11.35 Nika TUTA, *Novartis, Razvoj bioloških učinkovin, Lek Pharmaceuticals d.d.*  
**Primer uporabe metode tarčnega sekvenciranja naslednje generacije za detekcijo in identifikacijo bakterijskih kontaminant v razvoju bioloških zdravil**
- 11.35–11.45 Urban MALAVAŠIČ, Marin GAZVODA DE REGGI, *Gimnazija Novo mesto*  
**Utišanje gena *FUBP3* v humanih celicah z metodo CRISPR/Cas9**
- 11.45–11.55 Špela ŽUNEC, *Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana*  
**Analiza rezultatov molekulskega sidranja knjižnice spojin na proteinske tarče virusa SARS-CoV-2**
- 11.55–12.15 ODMOR

## Okrogla miza: BIOkemična in BIOloška orožja

Moderator omizja: Ajda Taler-Verčič

---

- 12.15–13.05 Jasmina Bevc, *Slovenska vojska, Laboratorij za jedrsko, radiološko, kemično in biološko obrambo*  
Tom Turk, *UL Biotehniška fakulteta*  
Martin Batič, *Ministrstvo za okolje in prostor, Sektor za podnebne spremembe in biotehnologijo*
- 13.05–14.05 ODMOR ZA KOSILO

## Sekcija 4

Vodja sekcije: Ajda Taler-Verčič

---

- 14.05–14.20 Marjetka PODOBNIK, *Kemijski inštitut*  
**Kaj je strukturna biologija?**
- 14.20–14.30 Anže KARLEK, *UL Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo*  
**Mehanizem nastanka stresnih granul v celicah izpostavljenih hladni atmosferski plazmi**

- 14.30–14.40 Jernej IMPERL, *UL Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo*  
**Sistemi toksin-antitoksin VapBC cianobakterije *Microcystis aeruginosa* PCC 7806**
- 14.40–14.50 Miha JOZELJ, *Gimnazija in veterinarska šola, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana*  
**Intedisciplinarno raziskovanje morfoloških lastnosti zunajceličnih veziklov eritrocitnega izvora**
- 14.50–15.00 Nika MAKUC, Maša MESARIČ, *II. gimnazija Maribor*  
**Izdelava cenovno ugodne elektroforeze za ločevanje umetnih barvil v živilih**
- 15.00–15.20 ODMOR

## Sekcija 5

Vodja sekcije: Miha Pavšič

- 15.20–15.35 Matej BUTALA, *UL Biotehniška fakulteta*  
**Kako se utrne prva raziskovalna hipoteza**
- 15.35–15.45 Tim PREZELJ, *UL Pedagoška fakulteta*  
**Kratek pregled temeljev molekularnobiološke ilustracije**
- 15.45–15.55 Gal KRANJC, Ajda KOVAČIČ, *UL Medicinska fakulteta*  
**Validacija metode določanja melatonina v slini s tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo in njena uporaba pri bolnikih z obstruktivnimi pavzami dihanja med spanjem**
- 15.55–16.05 Katja HUBER, Goran JOCIĆ, *Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer*  
**Encimi v medu in vpliv povišane temperature na antibakterijske lastnosti medu**
- 16.05–16.15 Luka MEDIC, *Gimnazija Ledina*  
**Vpliv konzerviranja plodov čilijev (*Capsicum spp.*) na vsebnost kapsaicinoidov**
- 16.15–17.30 ODMOR

## Skupščina Slovenskega biokemijskega društva

- od 17.30 **Podelitev Lapanjetovih nagrad**  
*Lapanjetova plaketa: prof. dr. Janko KOS*  
*Lapanjetova nagrada: prof. dr. Nataša POKLAR ULRIH (predavanje)*  
*Lapanjetovo priznanje: dr. Ana MITROVIĆ (predavanje)*  
*Lapanjetovo priznanje: dr. Ivana JOVČEVSKA (predavanje)*

## Kazalo povzetkov

### Povzetki predavanj

Rok GAŠPERŠIČ	
<b>Biomolekule za diagnostiko in zdravljenje parodontalne bolezni</b> .....	10
Tina LEVSTEK, Andreja COKAN VUJKOVAC, Bojan VUJKOVAC, Katarina TREBUŠAK PODKRAJŠEK	
<b>MikroRNA, izolirane iz urinskih zunajceličnih veziklov, kot novi označevalci razvoja in napredovanja Fabryjeve nefropatije</b> .....	11
Maša ČATER, Špela MIKEC, Urška HOSTNIK, Tanja KUNEJ, Simon HORVAT	
<b>Profil izražanja <i>Pla2g4e</i> v <i>musculus gastrocnemius</i> pri debeli in vitki liniji miši</b> .....	12
Manca ČRNIČ, Sonja ARTAČ, Maša ZUPANČIČ, Tina ELERŠEK	
<b>Vpliv časa in temperature shranjevanja na koncentracijo DNA</b> .....	13
Eva BITEŽNIK, Boštjan RITUPER, Vanda KUKEC	
<b>Tvorba protiteles pri bolnikih s SARS-CoV-2</b> .....	14
Gregor GUNČAR	
<b>Uporaba strojnega učenja za načrtovanje genov</b> .....	15
Jerneja NIMAC, Vera ŽUPUNSKI	
<b>Interaktom človeškega matrina 3</b> .....	16
Lana VOGRINEC, Katarina PETRA VAN MIDDEN, Marina KLEMENČIČ	
<b>Povezave med strukturo in funkcijo metakaspaz CrMCA-I in CrMCA-II iz alge <i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b> .....	17
Jernej BIRK, Domen HOČEVAR, Kaja RANGUS, Janja PUST, Ana MITROVIĆ, Jerica SABOTIČ	
<b>Uporaba mikrotermoforeze za določanje vezave sladkorjev na izolektin rCnSLB2</b> .....	18
Matija DERGANČ, Jakob GOLUBIČ, Alenka MOZER, Tihomir TOMAŠIČ	
<b>Novi zaviralci proteina toplotnega šoka 90 za zdravljenje raka</b> .....	19
Marko ANDERLUH	
<b>Močni zaviralci DNK giraze se vežejo asimetrično na svojo tarčo prek simetrično razcepljene halogenske vezi</b> .....	20
Janja DERMOL-ČERNE, Dejan ARZENŠEK	
<b>Z računalnikom hitreje in enostavneje do bioloških zdravil</b> .....	21
Nika TUTA, Janja DOBRAVC, Matjaž VOGELŠANG	
<b>Primer uporabe metode tarčnega sekvenciranja naslednje generacije za detekcijo in identifikacijo bakterijskih kontaminant v razvoju bioloških zdravil</b> .....	22
Urban MALAVAŠIČ, Marin GAZVODA De REGGI, Branka KLEMENČIČ, Nika LOVŠIN	
<b>Utišanje gena <i>FUBP3</i> v humanih celicah z metodo CRISPR/Cas9</b> .....	23
Špela ŽUNEC, Mojca PODLIPNIK, Črtomir PODLIPNIK	
<b>Analiza rezultatov molekulskega sidranja knjižnice spojin na proteinske tarče virusa SARS-CoV-2</b> .....	24
Marjetka PODOBNIK	
<b>Kaj je strukturna biologija?</b> .....	25
Anže KARLEK, Helena MOTALN, Nina RECEK, Iztok URBANČIČ, Boris ROGELJ	
<b>Mehanizem nastanka stresnih granul v celicah izpostavljenih hladni atmosferski plazmi</b> .....	26

Jernej IMPERL, Marko DOLINAR	
<b>Sistemi toksin-antitoksin VapBC cianobakterije <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806</b> .....	27
Miha JOZELJ, Tobija KOŠIR, Darja BOŽIČ, Matej HOČEVAR, Manca PAJNIČ, Aleš IGLIČ, Marko JERAN, Veronika KRALJ-IGLIČ	
<b>Intedisciplinarno raziskovanje morfoloških lastnosti zunajceličnih veziklov eritrocitnega izvora</b> ..	28
Nika MAKUC, Maša MESARIČ, Katja HOLNTHANER ZOREC, Tamara ŠIŠKO	
<b>Izdelava cenovno ugodne elektroforeze za ločevanje umetnih barvil v živilih</b> .....	29
Matej BUTALA	
<b>Kako se utrne prva raziskovalna hipoteza</b> .....	30
Tim PREZELJ, Uršula BERLOT POMPE, Nina GUNDE CIMERMAN	
<b>Kratek pregled temeljev molekularnobiološke ilustracije</b> .....	31
Gal KRANJC, Ajda KOVAČIČ, Dani MIRNIK, Cene SKUBIC, Damjana ROZMAN, Leja DOLENC GROŠELJ	
<b>Validacija metode določanja melatonina v slini s tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo in njena uporaba pri bolnikih z obstruktivnimi pavzami dihanja med spanjem</b> ....	32
Katja HUBER, Goran JOCIĆ, Nina ŽUMAN	
<b>Encimi v medu in vpliv povišane temperature na antibakterijske lastnosti medu</b> .....	33
Luka MEDIC, Veronika BABIČ, Ana SLATNAR	
<b>Vpliv konzerviranja plodov čilijev (<i>Capsicum spp.</i>) na vsebnost kapsaicinoidov</b> .....	34
 <b>Ostali povzetki</b>	
Jakob KECELJ, Ana PIBERNIK, Renata CAPUDER MERMAL, Cirila JERAS, Elvira BORŠIČ	
<b>Vnetna naprava na osnovi molekule TRIF za potencialno imunoterapijo raka</b> .....	36
Julija SKRT, Jaša KREVIH, Alenka MOZER, Ilija Gasan OSOJNIK ČRNIVEC, Mihaela SKRT	
<b>Vpliv hidrolitičnih encimov na antioksidativno učinkovitost oljčnih listov</b> .....	37
Ajda BELTRAM, Vera ŽUPUNSKI	
<b>Kloniranje, izražanje in izolacija proteina NONO</b> .....	38
Tinkara BOŽIČ, Katarina Petra VAN MIDDEN, Marina KLEMENČIČ	
<b>Izražanje proteaze CEP2 iz zelene alge <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> v bakterijskih celicah <i>Escherichia coli</i> in njena aktivacija</b> .....	39
Marin GAZVODA DE REGGI, Urban MALAVAŠIČ, Tia KLENOVŠEK, Samo PENIČ, Marko JERAN	
<b>Inovativni inženirski pristop tvorbe fosfolipidnih veziklov z odprtokodnim sistemom kot virom sinusne napetosti</b> .....	40
Katja GLINŠEK, Lovro KRAMER, Aleksander KRAJNC, Eva KRANJC, Nina PIRHER, Jaka MARUŠIČ, Leon HELLMANN, Barbara PODOBNIK, Borut ŠTRUKELJ, David AUSLÄNDER, Rok GABER	
<b>Sklapljanje CRISPRi tehnologije z obogatitvijo fluor. označ. celic s pretočno citometrijo (FACS): Nov pristop v glikoinženiringu celičnih linij CHO za proizvodnjo terapevtskih glikoproteinov</b> .....	41
Tanja GOŠNJAK, Urša PEČAR FONOVIC	
<b>Ali je beta-aktin primerna kontrola nanosa pri delu s profilinom 1?</b> .....	42
Andrej IVANOVSKI, Jošt HOČEVAR, Miha PAVŠIČ	
<b>Karakterizacija vezave kalcijevih ionov v kalmodulinu-podobni domeni <math>\alpha</math>-aktinina 4</b> .....	43
Tina KARUN, Tina LEVSTEK, Andreja REHBERGER LIKOZAR, Miran ŠEBEŠTJEN, Katarina TREBUŠAK PODKRAJŠEK	
<b>Vpliv zaviralcev PCSK9 na raven plazemskih nekodirajočih mikroRNA pri bolnikih z zelo visokimi vrednostmi lipoproteina(a)</b> .....	44

Bor KRAJNIK, Marko DOLINAR <b>Priprava novega klonirnega vektorja s pozitivno selekcijo</b> .....	45
Špela MIKEC, Zhihua JIANG, Simon HORVAT, Tanja KUNEJ <b>Analiza alternativne poliadenilacije gena <i>Hapb4</i> v hipotalamusu vitke in debele linije miši</b> .....	46
Urška RUPAR, Anja PAVLIN, Gregor BAJC, Matej BUTALA, Zdravko PODLESEK <b>Identifikacija nove mutante Lacl, ki slabše veže induktor IPTG</b> .....	47
Matija RUPARČIČ, Marko DOLINAR <b>Iskanje sistemov toksin-antitoksin tipa I v cianobakteriji <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806</b> .....	48
Luka ŠEGOTA, Aljaž GABER <b>Priprava skrajšanih oblik človeškega proteina FHL2 za ugotavljanje vloge posameznih domen v interakcijah z drugimi proteini</b> .....	49
Maruša SERNC, Vera ŽUPUNSKI <b>Kloniranje, izražanje in izolacija proteina TDP-43 in njegovih mutantov</b> .....	50
Martin ŠIMON, Špela MIKEC, Simon HORVAT, Tanja KUNEJ <b>Analiza genetske variabilnosti mišjih linij za poligeno debelost in vitkost nakazuje mmu-mir-3086-3p kot potencialnega kandidata vpletenega v razvoj debelosti</b> .....	51
Tea SINOŽIČ, Veronika STOKA <b>Izzivi pri kloniranju in izražanju človeškega katepsina F</b> .....	52
Timotej SOTOŠEK, Erik PUTAR, Ana OBAHA, Marko NOVINEC <b>Racionalno načrtovanje in priprava dimernih variant človeških katepsinov B in S</b> .....	53
Denis ŠTEPIHAR, Klementina FON TACER <b>MAGEL2 in njegovi partnerji pri sindromih Prader-Wili in Shaaf-Yang</b> .....	54
Jan TRAVNŠEK, Maja TROŠT, Katja GORIČAR <b>Vpliv genetske variabilnosti matriksnih metaloproteinaz na razvoj in odgovor na zdravljenje pri Parkinsonovi bolezni</b> .....	55
Anja VIDOVIČ, Alexander V. CHIBALIN, Sergej PIRKMAJER <b>Vpliv glukoze in z AMP aktivirane protein kinaze na izražanje podenot Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaze v skeletnomišičnih celicah</b> .....	56
Tilen ZAMLJEN, Ana SLATNAR <b>Vpliv abiotskega in biotskega stresa na vsebnost kapsaicinoidiov v čilijih</b> .....	57
Tanja ZUPAN, Nika JANEŽ, Petra ČOTAR, Aleksandar SEBASTIJANOVIČ, Janez ŠTRANCAR, Jerica SABOTIČ <b>Vpliv kokaprina in makrocipina na biofilm listerij</b> .....	58
Zala ŽIVIČ, San HADŽI, Jurij LAH <b>Regulacija določenih sistemov toksin/antitoksin tipa II <i>in vivo</i></b> .....	59

## Lapanjetovi nagrajenci za leto 2022

Nataša POKLAR ULRIH <b>Molekulska adaptacija na visoke temperature</b> .....	61
Ana MITROVIĆ <b>Katepsina B in X: vloga pri napredovanju raka in tarče protitumorne terapije</b> .....	62
Ivana JOVČEVSKA <b>Uporaba kamelidnih nanoteles v raziskavah glioblastoma</b> .....	63



# ***POVZETKI PREDAVANJ***

## Biomolekule za diagnostiko in zdravljenje parodontalne bolezni

Rok Gašperšič

*Katedra za ustne bolezni in parodontologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani  
Center za ustne bolezni in parodontologijo, Univerzitetni klinični center, Ljubljana*

Parodontalna bolezen je kronična vnetna bolezen obzobnih tkiv, ki ima za posledico njihovo razgradnjo in v končni fazi izpad obolelih zob. Bolezen sprožijo bakterije zobnih oblog, kompleksnega biofilma, ki se razvije na površini zob ob stiku z dlesnijo. Z razvojem bolezni se v biofilmu spremenijo ekološke razmere, ki omogočijo prevlado bakterij s patogenim potencialom, kot sta denimo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in *Porphyromonas gingivalis*. Te bakterije s sproščanjem različnih biomolekul in toksinov spremenijo vnetno-imunološki odziv v obzobnih tkivih in na ta način posredno sprožijo njihovo razgradnjo. Raziskave biokemičnih procesov povezanih z bakterijami zobnih oblog in odzivom gostitelja so pomembne za razumevanje etiopatogeneze parodontalne bolezni, določene biokemične značilnosti pa lahko uporabimo pri diagnostiki in zdravljenju.

Ker patogenost bakterij temelji na specifičnih virulentnih dejavnikih, ki pa se med različnimi sevi istih vrst bakterij razlikujejo, smo se najprej namenili natančno preučiti pogostnost prisotnosti virulentnih dejavnikov pri kliničnih izolatih bakterije *A. actinomycetemcomitans*. Znano je namreč, da določeni mutirani sevi te bakterije lahko producirajo nesorazmerno velike količine levkotoksina. S PCR metodologijo smo ugotovili, da imajo klinični izolati slovenskih pacientov pogosteje prisoten širok nabor virulentnih dejavnikov, hkrati pa odkrili do sedaj še neopisane mutacije gena toksina CDT. Pri *P. gingivalis* pa smo opravili serijo raziskav, ki so potrdile, da celične membrane te bakterije vsebujejo precej unikaten sfingolipid imenovan ceramid fosfoetanolamin (CPE). Ker je znano, da je CPE tarča malih proteinskih molekul imenovanih egerolizini, smo preverjali možnost, da bi interakcije egerolizinov in CPE uporabili kot orodje za diagnostiko, oz. merjenje količine bakterije *P. gingivalis* v bioloških vzorcih. V nadaljnjih raziskavah smo se usmerili v ugotavljanje esterazne aktivnosti sline, ki izhaja iz bakterijskih in gostiteljskih esteraz. To smo ugotavljali na indirekten način, z uporabo nespecifičnih in specifičnih substratov esteraz, kot sta denimo fenil-acetat in paraokson. Ugotovili smo, da imajo osebe s parodontalno boleznijo v stimulirani slini dejansko povečano esterazno aktivnost, v bodoče pa nameravamo določiti diagnostični pomen tega biokemičnega parametra. Sodelujemo tudi pri raziskavah, ki bi izboljšale možnosti zdravljenja. Tu so še posebej zanimive raziskave uporabe t.i. celičnih reaktorjev, v katerih lahko z vnašanjem željenih genov in njihovih regulatornih elementov namensko dosežemo nastajanje rastnih dejavnikov, ki se pomembno vključujejo v procese obnove obzobnih tkiv. Na živalskem modelu smo pokazali, da lahko z uporabo mešanice rastnih faktorjev ali pa samo z uporabo rastnega faktorja TGF- $\beta$ , močno pospešimo celjenje kostnih defektov.

## **MikroRNA, izolirane iz urinskih zunajceličnih veziklov, kot novi označevalci razvoja in napredovanja Fabryjeve nefropatije**

Tina Levstek<sup>1</sup>, Andreja Cokan Vujkovic<sup>2</sup>, Bojan Vujkovic<sup>2</sup>, Katarina Trebušak Podkrajšek<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> *Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*

<sup>2</sup> *Center za diagnostiko in zdravljenje Fabryjeve bolezni, Splošna bolnišnica Slovenj Gradec*

<sup>3</sup> *Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana*

Mentorja: prof. dr. Katarina Trebušak Podkrajšek, prim. Bojan Vujkovic

Fabryjeva bolezen (FB) je redka genska bolezen, pri kateri pride do zmanjšane oz. odsotne aktivnosti  $\alpha$ -galaktozidaze A. To vodi v kopičenje glikosfingolipidov v celicah in posledično do poškodb organov ter razvoja kliničnih znakov. Fabryjeva nefropatija pomembno prispeva k zgodnji obolevnosti in umrljivosti bolnikov s FB, zato je pravočasen začetek zdravljenja izredno pomemben, da se prepreči ireverzibilne poškodbe tkiv in organov. Trenutni označevalci ledvične funkcije so pozni pokazatelji ledvične okvare in ne omogočajo napovedi poteka bolezni. Zato je potreba po prepoznavanju in kliničnem uvajanju novih, zgodnjih označevalcev velika. MikroRNA (miRNA) so nekodirajoče RNA, ki preko uravnavanja izražanja genov vplivajo na številne celične funkcije. Zaradi njihove pomembne vloge pri fizioloških kot tudi patofizioloških procesih pri številnih ledvičnih boleznih predstavljajo potencialni neinvazivni, zgodnji označevalec ledvične disfunkcije. Namen raziskave je bil zato identifikacija tistih miRNA, izoliranih iz urinskih zunajceličnih veziklov, ki vplivajo na razvoj in napredovanje Fabryjeve nefropatije.

Z velikostno izključitveno kromatografijo smo iz vzorcev urina najprej izolirali zunajcelične vezikle, iz katerih smo nato izolirali RNA. S kvantitativnim PCR (qPCR) in komercialno dostopnimi paneli (Qiagen, Nemčija) smo pri desetih bolnikih in ujemajočih kontrolnih preiskovancih določili raven 87 miRNA. Nato smo raven sedmih miRNA potrdili na kohorti 33 bolnikov in njihovih po starosti in spolu ujemajočih kontrolnih preiskovancev. Bolnike smo razdelili v dve skupini glede na hitrost napredovanja nefropatije.

Raven miR-222-3p in miR-21-5p je bila statistično značilno višja pri bolnikih s stabilno ledvično funkcijo v primerjavi s kontrolnimi preiskovalci, prav tako pa tudi pri bolnikih z napredujočo nefropatijo v primerjavi s kontrolnimi preiskovanci. Zato bi lahko bili ti dve miRNA vpleteni v razvoj nefropatije. Poleg tega je bila raven miR-30a-5p, miR-204-5p in miR-10b-5p statistično značilno nižja pri bolnikih z napredujočo nefropatijo v primerjavi s kontrolnimi preiskovanci. Te miRNA tako predstavljajo kandidatne miRNA, ki bi lahko sodelovale pri napredovanju nefropatije.

V naslednjem koraku bomo identificirali molekularne poti, v katere so vpletene miRNA, katerih raven se je signifikantno razlikovala med bolniki in kontrolnimi preiskovanci. Raziskava bi zato lahko izboljšala razumevanje patofiziologije Fabryjeve nefropatije, kar bo osnova za razvoj novih terapevtskih orodij za preprečevanje nastanka oz. upočasnitev napredovanja nefropatije.

## Profil izražanja *Pla2g4e* v *musculus gastrocnemius* pri debeli in vitki liniji miši

Maša Čater, Špela Mikec, Urška Hostnik, Tanja Kunej, Simon Horvat

*Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani*

Mentorja: prof. dr. Tanja Kunej, prof. dr. Simon Horvat

Debelost pri ljudeh predstavlja globalno zdravstveno težavo, vzrok za njen nastanek pa je skupek genskih in okoljskih dejavnikov. Izraža se v prekomerni količini in nepravilnem delovanju maščobnega tkiva, pri čemer so vzročni mehanizmi za motnje v metabolizmu še vedno slabo poznani. Za namene študij poligeneskega tipa debelosti smo v preteklosti vzredili dva posebna mišja modela; debelo linijo (FLI) in vitko linijo miši (FHI). Obe mišji liniji smo uporabili v poskusu, kjer smo raziskovali vlogo gena *Pla2g4e* v razvoju debelosti ter vpliv prehrane in spola. Vsaka od linij je bila razdeljena na dve podskupini; ena je prejemala hrano s povečano vsebnostjo, druga pa hrano z zmanjšano vsebnostjo maščobe. *Pla2g4e* kodira protein iz družine citosolnih fosfolipaz A2 skupina 4e. Gre za encim, ki sodeluje pri uravnavanju membranskega transporta pri klatrin-neodvisni endocitozi, celične signalizacije (vnetni odzivi) ter lipidnih metabolnih procesov. *Pla2g4e* se izraža v več tkivih, njegovo delovanje pa povezujejo z metabolizmom hranil v telesu in porabo energije. Dobro se izraža v mišicah, kjer vpliva na metabolizem in delovanje mišic, zato smo si za tarčno tkivo izbrali *musculus gastrocnemius*. Na podlagi izolirane mRNA smo z metodo kvantitativnega PCR analizirali izražanje *Pla2g4e*. Rezultate smo normalizirali glede na izraženost hišnih genov *Gapdh* in *Actb*. Zanimalo nas je, ali so kakšne razlike v izražanju *Pla2g4e* v *m. gastrocnemius* med debelo in vitko mišjo linijo in med spoloma ter kakšen je vpliv prehrane na izražanje *Pla2g4e* v *m. gastrocnemius* pri obeh mišjih linijah. Povišana izraženost *Pla2g4e* je prepletena s pojavom debelosti, saj smo pri debelih samcih FLI, ki so prejemali hrano bogato z maščobo, zaznali povišano izražanje *Pla2g4e* v *m. gastrocnemius* v primerjavi z vitkimi samci FHI na isti hrani. Rezultati kažejo na pomembno vlogo genetskega ozadja posamezne mišje linije pri odzivanju miši na okoljske dejavnike in življenjski stil kot je zdrava/nezdrava prehrana na genomski in proteomski ravni in posledično pri razvoju debelosti.

## Vpliv časa in temperature shranjevanja na koncentracijo DNA

Manca Črnič<sup>1</sup>, Sonja Artač<sup>1</sup>, Maša Zupančič<sup>2</sup>, Tina Eleršek<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gimnazija Vič

<sup>2</sup> Nacionalni inštitut za biologijo

Mentorice: Sonja Artač, Maša Zupančič, doc. dr. Tina Eleršek

Zaradi hitrega naraščanja števila metod analiziranja vzorcev deoksiribonukleinske kisline (DNA), se povečuje tudi pomen raziskovanja pogojev, ki vplivajo na kvaliteto shranjenih vzorcev DNA, predvsem na koncentracijo in čistost vzorca. Delo z vzorci DNA vključuje raziskave na področjih rekombinantne tehnologije, genetike, evolucije, forenzike, medicine, ekologije in arheologije.

Cilj naloge je bil ugotoviti, kako čas in temperatura shranjevanja vzorca vplivata na čistost in koncentracijo DNA. Preučevali smo vzorce biofilma iz treh slovenskih rek: Kamniške Bistrice, Save in Poljanske Sore. Vzorci DNA so bili shranjeni en mesec pri temperaturi 4°C, nato smo iz polovice posameznega vzorca izolirali DNA, drugo polovico pa še za tri mesece shranili pri temperaturi -20°C, saj so običajno vzorci v laboratoriju shranjeni do 5 let pri temperaturi -20°C. Za merjenje čistosti in koncentracije DNA v vzorcu smo uporabili napravi, spektrometer NanoDrop in fluorometer Qubit.

Koncentracije DNA, izolirane iz istega vzorca se le nekoliko razlikujejo, to dokazuje, da je DNA zelo stabilna molekula. Meritve z napravo NanoDrop so pokazale, da se je koncentracija DNA po nadaljnjih treh mesecih hranjenja v zamrzovalniku (pri -20 °C) zmanjšala za 12% do 23%. Meritve z napravo Qubit pa, da je koncentracija ostala enaka ali pa se povečala za do 32%. V tem času se je čistost spremenila za do 9%.

Shranjevanje vzorcev DNA v nespremenjeni koncentraciji in čistosti je izrednega pomena za raziskovanje na različnih področjih. Gre predvsem za problem, ko istočasen odvzem vseh vzorcev za primerjavo ni mogoč ter v primerih, ko želimo shraniti referenčne vzorce. V prihodnjih letih pričakujemo razvoj novih področij, na katerih bo delo z ustrezno shranjenimi vzorci DNA omogočalo celovit in zanesljiv vpogled v dedni zapis ter natančnost analiz za potrebe posameznih raziskav. Izziv na področju shranjevanja vzorcev DNA je, kako še izboljšati pogoje hranjenja, ne le glede na čas in temperaturo, ampak tudi glede na druge pogoje, ki lahko vplivajo na koncentracijo in čistost.

## Tvorba protiteles pri bolnikih s SARS-CoV-2

Eva Bitežnik<sup>1</sup>, Boštjan Rituper<sup>2</sup>, Vanda Kukec<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gimnazija Kranj

<sup>2</sup> Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

Mentorja: Vanda Kukec, asist. dr. Boštjan Rituper

V raziskovalni nalogi je bil proučevan vpliv starosti, spola, pridruženih bolezni in deksametazona na čas nastanka protiteles IgM in IgG pri hospitaliziranih bolnikih, okuženih s SARS-CoV-2. Protitelesa so bila določana v serumu 177 bolnikov, starih od 24 do 99 let, ki so bili hospitalizirani v Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik med 4. 9. in 27. 11. 2020. Podatki o spolu, starosti, pridruženih bolezni, prejemanju sistemskega protivnetnega zdravila deksametazona in o rezultatu določanja protiteles z encimsko imunskimi testi (ELISA) so bili pridobljeni iz študije UKPA Golnik, iz bolnišničnega informacijskega sistema BIRPIS pa so bili pridobljeni podatki o datumu začetka simptomov. Podatki so bili zbrani v Excelovi tabeli, kjer so bili bolniki razdeljeni v skupine glede na starost, spol, pridružene bolezni in prejemanje deksametazona. Nato je bilo izračunano število dni od začetka simptomov do prvega pojava specifičnih protiteles katerega koli tipa. Podatki so bili grafično obdelani v programu GraphPad, izvedeni so bili Studentov t-test, test Mann-Whitney, Fisherjev eksaktni test ter multipla linearna regresija. Glede na obstoječe študije o pojavnosti protiteles pri imunskem odzivu je bilo pričakovano hitrejše pojavljanje protiteles pri ljudeh mlajših od 65 let, pri ženskah, pri ljudeh brez pridruženih bolezni ter pri bolnikih, ki deksametazona niso prejeli. Rezultati študije, z izjemo kasnejšega pojavljanja protiteles pri sledenih bolnikih z rakom, niso pokazali statistično značilnih razlik vpliva starosti, spola, pridruženih bolezni in prejemanja deksametazona na čas nastanka pojavljanja protiteles.

## Uporaba strojnega učenja za načrtovanje genov

Gregor Gunčar

*Katedra za biokemijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani*

Genski kod je nabor pravil po katerih živi organizmi informacije, ki so zapisane v genskem materialu, prevajajo v zaporedje aminokislin. Tri zaporedne baze predstavljajo en kodon, ki se s pomočjo ribosoma prevede v ustrezno aminokislino. Več različnih kodonov lahko zapisuje za isto aminokislino. Čeprav je princip prevajanja genskega koda v aminokislino pri vseh organizmih enak, se med organizmi razlikuje predvsem zastopanost posameznih kodonov. To moramo upoštevati pri načrtovanju sintetičnih genov, ker je od organizma, ki bo tak gen prevajal odvisno, kakšen kodon bomo uporabili za določeno aminokislino. Algoritmi, ki se za načrtovanje sintetičnih genov uporabljajo sedaj, večinoma uporabijo najbolj pogosto uporabljene kodone. Tako naj bi se protein najhitreje izrazil, izkazalo pa se je, da je zato pogosto v netopni obliki ali pa ni pravilno zvit. Z analizo bakterijskih proteinov smo ugotovili, da so regije, kjer bakterije izražajo nek protein bolj počasi, odvisne od tridimenzionalne strukture proteina. Protein mora imeti predvsem dovolj časa takrat, ko pride do tvorbe hidrofobnega jedra. Ustvarili smo model strojnega učenja, ki na osnovi aminokislinskega zaporedja in napovedi tridimenzionalne strukture proteina izračuna optimalen čas prevajanja posameznih delov proteina in na osnovi tega izbere tiste kodone, ki najbolj ustrezajo takšni časovnici zvijanja. Tako ima protein dovolj časa takrat, ko je to potrebno za hidrofobni kolaps, kodoni pa so izbrani za hitro prevajanje, kjer taka upočasnitev ni potrebna.

## Interaktom človeškega matrina 3

Jerneja Nimac<sup>1,2</sup>, Vera Župunski<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

<sup>2</sup> Inštitut Jožef Stefan

Mentorica: doc. dr. Vera Župunski

Matrin 3 (MATR3) je DNA- in RNA-vezavni protein jedrnega matriksa, ki sodeluje v raznolikih celičnih procesih. Pomemben je pri alternativnem izrezovanju intronov, prepisovanju, stabilizaciji mRNA, jedrnem izvozu mRNA in zgodnjem odzivu na poškodbe DNA. Mutacija S85C v genu za MATR3 pripomore k razvoju počasi napredujoče oblike amiotrofične lateralne skleroze (ALS), vendar še ni znano, kakšno vlogo ima MATR3 v patogenezi te bolezni. Prav tako so slabo opisani in nepoznani proteinski interaktorji MATR3 in njegovega mutanta S85C. Ravno razlike v interaktomu obeh oblik pa bi lahko omogočile vpogled v nastanek in razvoj ALS. Z metodo BioID, ki temelji na označevanju bližnjih proteinov z biotinom, smo želeli identificirati proteine, ki v pogojih *in vivo* interagirajo s človeškim MATR3 in njegovim mutantom MATR3<sup>S85C</sup>. V ta namen smo vzpostavili tri inducibilne ekspresijske celične linije HEK 293, ki imajo v svoj genom vključen zapis za fuzijski protein MATR3 oz. MATR3<sup>S85C</sup> z biotin ligazo BioID2, ali zapis za BioID2 brez fuzijskega partnerja. Ugotovili smo, da fuzijska proteina MATR3 in MATR3<sup>S85C</sup> z BioID2 posnemata celično lokalizacijo endogenega MATR3 in določili, da je encim BioID2 v teh fuzijah aktiven. Po preučitvi encimske aktivnosti BioID2 in celične lokalizacije izraženih proteinov smo s testom »pull down« iz celičnih lizatov izolirali biotinizirane interakcijske partnerje obeh oblik MATR3. Uspešnost izolacije interakcijskih proteinov smo pokazali z imunodetekcijo biotiniziranih proteinov po prenosu western in barvanjem s srebrom. Tako smo zaznali proteine, ki so značilni za vzorce z MATR3 in MATR3<sup>S85C</sup>, ne pa tudi za vzorce z BioID2 brez fuzijskega partnerja. Te interakcijske partnerje smo identificirali s tehniko tekočinske kromatografije, sklopljene z masno spektrometrijo. Med identificiranimi proteini so do sedaj že znani interaktorji MATR3 in njegovega mutanta, pa tudi novi, še nepoznani, ki bi lahko pomagali razložiti vlogo MATR3 pri ALS in odkriti molekularne mehanizme, ki bi preprečili nastanek bolezni.



## **Povezave med strukturo in funkcijo metakaspaz CrMCA-I in CrMCA-II iz alge *Chlamydomonas reinhardtii***

Lana Vogrinec, Katarina Petra van Midden, Marina Klemenčič

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Mentorica: doc. dr. Marina Klemenčič

Metakaspaze so cisteinske proteaze, ki se na osnovi strukturne homologije s kaspazami uvrščajo v družino C14 klana CD. Odkrite so bile pri raznovrstnih organizmih, med drugim pri algah in rastlinah, ne pa tudi pri živalih. Poleg kaspazam homolognih domen p20 in p10 lahko vsebujejo tudi nekatere dodatne regije, glede na katere se delijo na tri tipe: tip I, tip II in tip III. Metakaspaze se od kaspaz razlikujejo v specifičnosti, saj za razliko od slednjih cepijo substrate z bazičnimi aminokislinskimi ostanki na mestu P1. Poleg tega v nasprotju s kaspazami za aktivacijo večinoma potrebujejo  $\text{Ca}^{2+}$ , nekatere pa se aktivirajo tudi z avtoprocesiranjem.

Namen našega raziskovalnega dela je bil raziskati povezavo med značilnimi strukturnimi elementi algnih metakaspaz in njihovo vlogo pri aktivnosti oziroma aktivaciji. Analizirali smo ohranjenost posameznih aminokislinskih ostankov pri algnih metakaspazah tipa I in tipa II. Na osnovi poravnave smo izbrali aminokislinske ostanke, ki bi lahko bili pomembni za specifične lastnosti izbranih metakaspaz CrMCA-I in CrMCA-II iz alge *Chlamydomonas reinhardtii*. Pripravili smo zaporedja z uvedenimi točkovnimi mutacijami izbranih aminokislin, pri čemer smo v CrMCA-I mutirali ostanke, povezane s specifičnostjo in aktivacijo, pri CrMCA-II pa z avtoprocesiranjem.

Izolirali in očistili smo protein CrMCA-I<sub>CL</sub> ter njegove mutante. Primerjali smo aktivnost izoliranih proteinov na proteinske in peptidne substrate in določili kinetične parametre za cepitev izbranih sintetičnih substratov. Ugotovili smo, da so vsi mutanti sposobni cepitve večjih proteinskih substratov, medtem ko so v primerjavi z osnovnim encimom slabše aktivni na sintetične metakaspazne substrate. Prav tako noben od mutantov ni sposoben cepiti kaspaznih substratov.

Poleg tega smo uspešno izolirali in očistili tudi protein CrMCA-II. Analizirali smo stopnjo avtoprocesiranja CrMCA-II pri različnih temperaturah in koncentracijah  $\text{Ca}^{2+}$ . Dokazali smo, da se v prisotnosti  $\text{Ca}^{2+}$  divji tip CrMCA-II razcepi na dva fragmenta, kar je opazno že pri 4 °C in minimalnih časih inkubacije. Pri daljših časih inkubacije in višjih temperaturah pride do dodatnih cepitev, pri čemer se encim sčasoma popolnoma razgradi.

## Uporaba mikrotermoforeze za določanje vezave sladkorjev na izolektin rCnSLB2

Jernej Birk<sup>1</sup>, Domen Hočevar<sup>1</sup>, Kaja Rangus<sup>1</sup>, Janja Pust<sup>1</sup>, Ana Mitrović<sup>2</sup>, Jerica Sabotič<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gimnazija Novo mesto

<sup>2</sup> Inštitut Jožef Stefan

Mentorice: Janja Pust, dr. Ana Mitrović, dr. Jerica Sabotič

Lektini so proteini, ki se specifično vežejo na ogljikove hidrate. Zaradi visoke specifičnosti vezave lahko delujejo antiproliferativno (delovanje, ki preprečuje razmnoževanje celic) na omejen tip celic in zaradi tega predstavljajo velik potencial pri zdravljenju rakavih obolenj. S preprečitvijo absorpcije hranil v prebavnih sistemih žuželk lektini delujejo tudi insekticidno. Za gobo poprhnjeno livko (*Clitocybe nebularis*) je značilna visoka vsebnost različnih lektinov.

Z afinitetno kromatografijo smo iz poprhnjene livke izolirali za glukozo specifičen lektin z oznako CnGlCl in njegovo čistost potrdili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo. V drugem delu naloge smo z mikrotermoforezo analizirali vezavo med pripravljenim rekombinantnim saharozil izolektinom rCnSLB2 in sladkorji saharozo, glukozo, fruktozo,  $\alpha$ -D-glukopiranozidom, N-acetilglukozaminom in maltotriozo. Potrdili smo, da je vezava rCnSLB2 s sladkorji specifična, saj so bile konstante disociacije pri različnih sladkorjih različne, hkrati pa sta se na lektin najbolj vezali saharoza in glukosa. Pridobljeni rezultati kažejo, da mikrotermoforeza ni najprimernejša metoda za določanje vezave sladkorjev na lektine, če je afiniteta vezave sladkorja nizka.

Mikrotermoforeza je nova metoda, ki za določanje biofizikalnih lastnosti molekularnih interakcij uporablja fizikalni pojav termoforeze. Potek termoforeze je odvisen od velikosti, naboja in solvatacijskih ovojev udeleženih molekul. Prednosti tega postopka so majhna poraba vzorcev, možnost analize šibkih molekularnih interakcij, enostavna uporaba in možnost analize molekularnih interakcij v pogojih, ki so podobni naravnim.

Vezava med lektini in sladkorji ima pomembno vlogo pri molekularnih interakcijah med celicami v organizmu in s povzročitelji bolezni ter se lahko uporablja pri zaznavi nekaterih bolezni. Mikrotermoforeza še ni bila uporabljena za določanje lastnosti interakcij med lektini in sladkorji, zato naša raziskovalna naloga odpira široka vrata nadaljnjim raziskavam.

## Novi zaviralci proteina toplotnega šoka 90 za zdravljenje raka

Matija Derganc<sup>1</sup>, Jakob Golubić<sup>1</sup>, Alenka Mozer<sup>1</sup>, Tihomir Tomašič<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gimnazija Vič

<sup>2</sup> Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorja: Alenka Mozer, prof. dr. Tihomir Tomašič

Rak je drugi najpogostejši vzrok smrti po svetu. Obstoječe metode zdravljenja so povezane z mnogimi neželenimi stranskimi učinki, kot so izguba las, bolečine, izguba apetita itd., zato je ključen razvoj tarčnih učinkovin. Protein toplotnega šoka 90 ali stresni protein 90 (Hsp90) je šaperon, ki je v visoki meri odgovoren za neregulirano celično rast in posledično rakava obolenja. Razvili so že veliko različnih zaviralcev Hsp90 in nekatere vrednotili tudi v kliničnih testiranjih. Obstaja več načinov za zaviranje Hsp90, pri čemer smo se posvetili razvoju zaviralcev C-končne domene, ki v nasprotju z do sedaj najbolj raziskanimi zaviralci N-končne domene ne sprožijo odziva toplotnega šoka.

Naši cilji raziskave so bili oceniti različne programe in pristope za molekulsko sidranje z namenom načrtovanja novih zaviralcev Hsp90 ter izbrane spojine v laboratoriju sintetizirati in na rakavih celičnih linijah preizkusiti njihovo protirakavo delovanje.

Najprej smo s pomočjo že znanega zaviralca C-končne domene Hsp90 TZS-36 preizkusili različne programe za sidranje in za nadaljnje delo izbrali program OpenEye FRED, ki je prikazal najbolj smiselne rezultate. Nato smo oblikovali knjižnico s preko 400 potencialnih zaviralcev Hsp90 z načrtovanjem analogov spojine TZS-36 in vse molekulsko sidrali v C-končno domeno Hsp90 s pomočjo FRED-a. Izvedli smo tudi simulacijo molekulske dinamike, s pomočjo katere smo poiskali najbolj pogoste farmakoforne modele. Knjižnico spojin smo preverili tudi z reševanjem farmakofornih modelov, a se to ni izkazalo za učinkovito, ker je zelo malo spojin ustrezalo farmakofornemu modelu. Spojine, ki so dosegle najboljše rezultate sidranja, smo nato sintetizirali v laboratoriju Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani. Sintetizirali smo okoli 40 od začetnih 400 in jih potem testirali na petih različnih rakavih celičnih linijah. Rezultati so zelo obetavni, saj sta spojini TMM-7 in TSF-15 dosegli dosti boljšo jakost delovanja na rakavih celičnih linijah kot začetna spojina TZS-36. TMM-7 je na celični liniji raka dojke dosegel izjemen šestkrat boljši rezultat od TZS-36. Ta spojina je še posebej zanimiva, saj zaradi posebnih geometrijskih značilnosti deluje na Hsp90 v obeh izomerih. To je lahko tudi odlična podlaga za prihodnje raziskave.

Z rezultati smo zelo zadovoljni, saj smo dokazali učinkovitost uporabe programov za molekulsko sidranje in pa odkrili zelo obetavne zaviralce Hsp90 s protirakavim delovanjem.

## Močni zaviralci DNK giraze se vežejo asimetrično na svojo tarčo prek simetrično razcepljene halogenske vezi

Marko Anderluh

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo*

V predavanju bom predstavil načrtovanje, sintezo in vrednotenje novih bakterijskih zaviralcev topoizomerase tipa II (tako imenovani NBTI), ki stabilizirajo kompleks med molekulo DNA in encimom DNA girazo. Načrtovali smo strukturno sorodne molekule NBTI z inovativnim delom molekule, ki se veže v vezavno mesto DNA giraze. Dobljene molekule imajo izjemno močno zaviralno delovanje na izoliranem encimu DNA girazi in posledično zelo močno protibakterijsko delovanje. Natančen mehanizem delovanja NBTI je do danes bil hipotetičen, saj so raziskovalci do sedaj predvidevali možnost tvorbe trojnega kompleksa med enoverižno cepljeno DNA in encimom DNA giraza, ki ju poveže molekula NBTI, a tega niso uspeli nedvoumno dokazati. V članku objavljenem v reviji Nature Communications smo predstavili tridimenzionalno strukturo trojnega kompleksa inovativna molekula NBTI-DNA-DNA giraza, kjer je omenjeni mehanizem jasno dokazan. Dodana vrednost predstavljene strukture je dokaz o obstoju simetrične razcepljene halogene vezi v biološkem okolju. Tovrstni tip halogene vezi nasprotuje tradicionalni interpretaciji in je bil do sedaj dokazan le na kristalnih modelih majhnih molekul, ne pa tudi v bioloških makromolekulah. V članku predstavljene nove molekule NBTI pomembno lahko prispevajo k uspešnejšem zdravljenju bakterijskih okužb, predvsem zato, ker delujejo tudi na odporne bakterijske seve (npr. MRSA), ki jih ne moremo oz. težko zdravimo z obstoječimi protibakterijskimi učinkovinami. Predstavljena kristalna struktura predstavlja mejnik v razumevanju delovanja NBTI, saj sem s soavtorji prvič nedvoumno potrdil njihov mehanizem delovanja. Dokazane simetrične razcepljene halogene vezi lahko s pridom uporabljamo pri načrtovanju novih zdravilnih učinkovin.



## Z računalnikom hitreje in enostavneje do bioloških zdravil

Janja Dermol-Černe, Dejan Arzenšek

*Novartis, Razvoj bioloških učinkovin, Lek Pharmaceuticals d.d., Mengeš*

Biološka zdravila so nova generacija zdravil, kjer je zdravilna učinkovina pridobljena iz živih organizmov, kot so na primer celične linije. V nasprotju z običajnimi zdravili bioloških zdravil ne moremo kemijsko sintetizirati. Biološka zdravila so po zgradbi lahko beljakovine, ogljikovi hidrati, celice ali tkiva, po funkciji pa zaobjemajo hormone, cepiva, monoklonska protitelesa, rekombinantne proteine, rastne faktorje, citokine in podobno. Razvoj bioloških učinkovin, ki poteka v Biofarmaceutiki Mengeš, bi v grobem lahko razdelili na tri korake. 1. Razvoj celične linije, ki proizvaja zeleno učinkovino. 2. Optimizacija gojenja celične linije v bioreaktorjih. 3. Čiščenje ter koncentriranje na različnih kromatografskih stopnjah in izmenjava prečiščenega produkta v končno formulacijo učinkovine, čemur se bomo posvetili v tem prispevku.

Razvoj procesa čiščenja učinkovine je kompleksen in zamuden. Želimo si namreč visok izkoristek zdravilne učinkovine, nizke vsebnosti nečistot, obenem pa hiter in robusten proces. Spreminjamo lahko več pogojev – tip kromatografije, vsebnosti pufrov ter njihove pH in prevodnosti, retencijske čase, velikost kromatografskih kolon in matriks, kar v praksi pomeni veliko dolgih poskusov. Optimizacije procesa se lahko lotimo pametneje in z modeli napovemo obnašanje procesa pod določenimi pogoji, kar nas lahko usmerja pri izbiri eksperimentalnih pogojev in posledičnem zmanjševanju števila poskusov. Uporabo modelov v razvoju priporočata tudi Evropska agencija za zdravila in Ameriška zvezna agencija za hrano in zdravila v okviru pristopa z vgrajeno kakovostjo (angl. *Quality by Design*).

V osnovi se lahko modeliranja lotimo mehanistično in statistično. Mehanistični modeli temeljijo na fizikalnih zakonih, običajno so v obliki kompleksnih diferencialnih enačb in so veljavni v celotnem operativnem območju in širše. Za njihovo kalibracijo je potrebno minimalno število poskusov, v idealnem primeru poskusi niso potrebni. Statistični modeli temeljijo na izvedenih poskusih, statistični obdelavi in pogosto tudi strojnemu učenju, veljavni so le v območju preizkušenih eksperimentalnih pogojev. V okviru obeh principov je bilo razvitih več modelov. Modeliramo lahko pozicijo in obliko vrhov eluata in nečistot, izkoristek procesa, staranje in življenjsko dobo kromatografskega matriksa, kapaciteto kromatografske kolone, pa tudi ultra- in diafiltracijo zdravilne učinkovine ter izbiro pufrov in pogojev ultra- in diafiltracije. Hitro, preprosto in brez nepotrebnih stroškov lahko preizkusimo različne kombinacije eksperimentalnih pogojev. Modeli omogočajo tudi preprosto skaliranje procesa na večje kromatografske kolone v proizvodnji ter prilagajanje procesa v realnem času glede na sprotne meritve.

V prihodnosti si želimo še izboljšati modele čiščenja zdravilnih učinkovin, za kar moramo nadgraditi razumevanje fizikalnega ozadja kromatografije in vpliva kemijske zgradbe zdravilne učinkovine na vezavo na matriks.

## Primer uporabe metode tarčnega sekvenciranja naslednje generacije za detekcijo in identifikacijo bakterijskih kontaminant v razvoju bioloških zdravil

Nika Tuta, Janja Dobravc, Matjaž Vogelsang

*Novartis, Razvoj bioloških učinkovin, Lek Pharmaceuticals d.d., Mengeš*

Tekom proizvodnje bioloških zdravil, ki se večinoma proizvajajo v sesalskih celičnih linijah, lahko pride do bakterijske kontaminacije bioreaktorjev zaradi okvare opreme, sistemov ali človeške napake. Hitra identifikacija bakterijske vrste je ključna za uspešno odkrivanje izvora okužbe, hitrega zaključka raziskav in implementacije korektivnih ukrepov, ki omogočijo čimprejšnji ponoven zagon proizvodnje.

Tradicionalne gojitvene metode za identifikacijo bakterij trajajo več dni/tednov in včasih ne omogočajo rasti vseh mikroorganizmov. Z namenom hitrejšje identifikacije kontaminacij smo implementirali metodo tarčnega sekvenciranja naslednje generacije (angl. next-generation sequencing - NGS), ki omogoča identifikacijo bakterijskih vrst na podlagi sekvenčnega zaporedja variabilnih regij znotraj 16S rRNA gena.

Metoda NGS se je izkazala za zelo uporabno v primeru raziskave kontaminacije bioreaktorja v proizvodnji bioloških zdravil Mengeš, kjer so bili gojitveni testi negativni – bakterijska rast na ploščah ni bila uspešna. NGS je pokazal veliko vsebnost DNA *Hydrotalea flava*, eksotične bakterije, prvič izolirane iz vodnih virov. Za namen določitve izvora kontaminacije smo v sklopu raziskave z NGS metodo analizirali vzorce iz bioreaktorjev pred opaženo kontaminacijo in številne vodne vzorce, ki so bili v bližini ali direktnem stiku z okuženim bioreaktorjem (mediji, voda za temperiranje bioreaktorja). Metoda NGS je v vzorcih iz bioreaktorja zaznala vsebnost DNA *Hydrotalea flava* že nekaj dni pred zaznano okužbo s testom bakterijskih endotoksinov (angl. BET). Nadalje je bila prisotnost bakterije potrjena v vzorcu vode za temperiranje bioreaktorja in podrobnejši pregled opreme je pokazal razpoko v spirali kondenzatorja, kar je povzročilo porušene pogoje sterilnosti.

S pomočjo tarčnega NGS smo v kratkem časovnem obdobju identificirali prisotnost bakterije *Hydrotalea flava* in z nadaljnjo analizo vzorcev uspešno določili izvor kontaminacije.

Prav hitra identifikacija bakterij, ki lahko povzročijo kontaminacijo bioreaktorjev, je ključnega pomena za vzpostavitev potrebnih akcij in metoda tarčnega NGS tako predstavlja uporabno orodje za učinkovito iskanje vzroka kontaminacij.

## Utišanje gena *FUBP3* v humanih celicah z metodo CRISPR/Cas9

Urban Malavašič<sup>1</sup>, Marin Gazvoda de Reggi<sup>1</sup>, Branka Klemenčič<sup>1</sup>, Nika Lovšin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gimnazija Novo mesto

<sup>2</sup> Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentorici: doc. dr. Nika Lovšin, mag. Branka Klemenčič, univ. dipl. inž. kem. inž.

Novejša metoda preurejanja genov je metoda CRISPR/Cas9, ki omogoča učinkovito in specifično urejanje genoma prokariotskih in evkariontskih celic, tudi človeških. Sistem CRISPR/Cas izvira iz narave, kjer predstavlja specifičen imunski sistem prokariotov (arheje, bakterije), ki jim omogoča obrambo pred virusnimi in plazmidnimi tujki. CRISPR so palindromska, ponavljajoča se zaporedja na bakterijski DNA, med katerimi se nahajajo zaporedja, imenovana distančniki, kamor se vgradi del virusne DNA, s katero se okuži bakterija. Tako v bakterijski celici nastajajo transkripti virusne DNA. Ob naslednji okužbi z enakim patogenom se vežejo na virusno DNA in jo s pomočjo encimskega kompleksa Cas razgradijo ter tako uničijo. To celici omogoča spomin in učinkovito obrambo pred patogeni. Ta sistem lahko v laboratoriju uporabimo za izbijanje (knockout) in tudi vstavljanje novih genov (knock-in). Za to se najpogosteje uporablja encim nukleaza Cas9, ki se veže na tarčno zaporedje in ga cepi. Pripravi se sintetična gRNA, ki vsebuje zapis, komplementaren tarčni DNA, in omogoči vezavo encima Cas9. Sintetično gRNA vnesemo v celico s pomočjo priprave plazmidnih konstruktov. *FUBP3* je na novo odkriti gen, ki naj bi bil povezan z nastankom osteoporoze in predstavlja potencialno tarčo za diagnostiko in zdravljenje osteoporoze. V nalogi smo z metodo CRISPR/Cas9 pripravili rekombinanten plazmid za utišanje tega gena v humanih celicah. Pripravljeni plazmidni konstrukti bodo uporabljeni za pripravo matičnih celic z utišanim genom *FUBP3*, da bi odkrili njegov vpliv na nastanek kostnih bolezni pri ljudeh.

## **Analiza rezultatov molekulskega sidranja knjižnice spojin na proteinske tarče virusa SARS-CoV-2**

Špela Žunec<sup>1</sup>, Mojca Podlipnik<sup>1</sup>, Črtomir Podlipnik<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gimnazija Jožeta Plečnika Ljubljana

<sup>2</sup> Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

Mentorja: Mojca Podlipnik, doc. dr. Črtomir Podlipnik

V sklopu svoje raziskovalne naloge sem analizirala rezultate molekulskega sidranja spojin iz podatkovne zbirke ChEMBL na tri proteinske tarče, ki so pomembne v življenjskem ciklusu virusa SARS-CoV-2. Prva in druga tarča sta bili proteazi 3CLpro (glavna proteaza) in PLpro (Papainu podobna proteaza), ki cepita polipeptid, ki nastane pri prepisu virusne RNA. Tretja tarča je bila receptorska domena proteina Spike, ki je pomembna za pripetje virusa na ACE2 receptor gostujoče celice. Program RxDock je bil uporabljen za sidranje. Iz množice spojin izloči spojine, ki se vežejo v vezavno mesto določenega receptorja (izbrane proteinske tarče). Pri procesu sidranja je pomembna predvsem oblika molekule liganda. Najboljše ligande glede na program RxDock sem analizirala s programom SeeSAR in ugotovila, da ta program vezavno afiniteto med ligandom in receptorjem izračuna na drugačen način, torej so najboljše ligandi glede na SeeSAR druge spojine. Program SeeSAR namreč upošteva tudi interakcije med ligandom in receptorjem, npr. nastanek vodikovih vezi in desolvatacijo na stični površini med ligandom in receptorjem.



## **Kaj je strukturna biologija?**

Marjetka Podobnik

*Kemijski inštitut, Hajdrihova 19, Ljubljana*

Strukturna biologija je skupek različnih metodoloških pristopov, od molekulske biologije, biokemije, biofizike do računske kemije, umetne inteligence in različnih inženirskih metod. Povezovanje le-teh nam omogoča, da lahko določimo, analiziramo in interpretiramo zgradbe bioloških molekul na različnih nivojih ločljivosti, od same splošne oblike, do natančne prostorske razporeditve atomov, ki te molekule gradijo. Omogoča tudi razumevanje interakcij med molekulami, in kako le-te, ali pa spremembe v tri-dimenzionalni razporeditvi atomov zaradi drugih vplivov okolja, vplivajo na molekulske lastnosti, njihov mehanizem delovanja in s tem biološko funkcijo. Strukturna biologija igra ključno vlogo pri razumevanju bioloških procesov, tako v zdravih organizmih, kot v bolezenskih stanjih. Posledično je ena osrednjih ved, ki se uporablja pri iskanju medicinskih in farmacevtskih pristopov oziroma rešitev za preprečevanje ali zdravljenje bolezni, in tudi za uporabo bioloških (makro)molekul v biotehnologiji. Predstavila bom več metodoloških pristopov, ki se uporabljajo na področju strukturne biologije in predstavila nekaj primerov uporabe in rezultatov.

## Mehanizem nastanka stresnih granul v celicah izpostavljenih hladni atmosferski plazmi

Anže Karlek<sup>1,2</sup>, Helena Motaln<sup>2</sup>, Nina Recek<sup>3</sup>, Iztok Urbančič<sup>4</sup>, Boris Rogelj<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

<sup>2</sup> Odsek za biotehnologijo, Institut »Jožef Stefan«

<sup>3</sup> Odsek za tehnologijo površin, Institut »Jožef Stefan«

<sup>4</sup> Odsek za fiziko trdne snovi, Institut »Jožef Stefan«

Mentorja: prof. dr. Boris Rogelj, doc. dr. Helena Motaln

Stresne granule (SG) so citoplazemski, ne-membranski, ribonukleoproteinski (RNP) organeli, ki se tvorijo v evkariontskih celicah ob odzivu na stres [1, 2]. Nastanek SG uravnava eIF2 $\alpha$ -odvisna ali eIF2 $\alpha$ -neodvisna signalna pot. Pri eIF2 $\alpha$ -odvisni signalni poti lahko  $\alpha$ -podenoto eIF2 $\alpha$  fosforilirajo štiri različne kinaze – HRI, PERK, PKR ali GCN2 [2]. Hladno atmosfersko plazmo (HAP) sestavlja delno ioniziran nosilni plin (najpogosteje argon) z ioni, elektroni, delci brez naboja. (atomi, molekule) in radikali, ki ob stiku s celičnim medijem tvorijo kisikove in dušikove reaktivne spojine (RONS)[3]. HAP sproža nastanek SG v celicah po poti eIF2a [4], vendar ni znano katera izmed kinaz pri tem sodeluje.

Zato je bil naš cilj določiti kinaze eIF2a signalne poti, ki so ključne za uravnavanje nastanka SG v celicah izpostavljenih HAP, z uporabo njihovih znanih inhibitorjev.

V študiji smo uporabili Flp-In celično linijo SH-SY5Y, ki stabilno izraža fuzijski protein mScarlet1-G3BP1-Myc ob dodatku doksiciklina. S spektrofotometrom in uporabo resazurina smo ovrednotili vpliv različnih koncentracij kvercetina (inhibitor HRI kinaze) in A-92 (inhibitor GCN2 kinaze) na metabolno aktivnost/viabilnost celic. Celice smo nato izpostavili netoksičnim koncentracijam obeh inhibitorjev in HAP ter ovrednotili vpliv posameznega inhibitorja na nastanek SG z uporabo konfokalne mikroskopije in Western blot analize. Za pozitivno kontrolo so bile celice izpostavljene arzenitu, znanemu prožilcu nastanka SG.

Pokazali smo, da dodatek kvercetina zavira nastanek SG v celicah izpostavljenih HAP. Vendar pa najvišja uporabljena koncentracija kvercetina (200  $\mu$ M) že sama povzroča nastanek SG v celicah, do česar pa ne pride pri uporabi nižjih koncentracij. Tudi dodatek inhibitorja A-92 zavira nastanek SG v celicah izpostavljenih HAP, pri čemer pa sam ne povzroča nastanka SG.

Na podlagi rezultatov povzemamo da pri nastanku stresnih granul v celicah obdelanih s HAP sodelujeta kinazi HRI in GCN2.

### Literatura

1. Mateju, D. & Chao, J. A. *FEBS J.* **289**, 363–373 (2022).
2. Hofmann, S., Kedersha, N., Anderson, P. & Ivanov, P. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1868**, 118876 (2021).
3. Hoffmann, C., Berganza, C. & Zhang, J. *Med. Gas Res.* **3**, 1–15 (2013).
4. Motaln, H. *et al. Biomater. Sci.* **8**, 5293–5305 (2020).

## Sistemi toksin-antitoksin VapBC cianobakterije *Microcystis aeruginosa* PCC 7806

Jernej Imperl, Marko Dolinar

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Mentor: prof. dr. Marko Dolinar

Sistemi toksin-antitoksin so mehanizmi, ki v bakterijah in arhejah opravljajo različne funkcije, med drugim povezane z regulacijo dedovanja plazmidov, odzivom na stres in zaščito pred bakteriofagi. Sestavljeni so iz dveh komponent: toksin je stabilen protein, ki lahko preko različnih mehanizmov povzroči celično smrt oziroma zaustavitev rasti, antitoksin pa je relativno nestabilen protein oziroma RNA, ki zavira delovanje toksina in torej omogoča normalno rast celice. Glede na mehanizem medsebojne interakcije toksina in antitoksina te sisteme delimo na več tipov. Pri tipu II je antitoksin po strukturi protein in se veže na toksin. V to skupino uvrščamo tudi sistem VapBC, ki ga sestavlja toksin VapC z ribnonukleazno domeno PIN, in antitoksin VapB. Gena za VapB in VapC sta praviloma na kromosomu en za drugim in tvorita operon *vapBC*.

Cianobakterija *Microcystis aeruginosa* je pomemben povzročitelj cvetenja jezer in predstavlja grožnjo za zdravje zaradi cianotoksinov, ki jih sprošča v okolje. V bazi podatkov za toksine in antitoksine TADB ima cianobakterija *M. aeruginosa* predvidenih 113 parov toksin-antitoksin, kar je največ izmed vseh organizmov v tej bazi podatkov. Med to množico parov toksin-antitoksin so tudi sistemi VapBC, ki pa so pri tej cianobakteriji še slabo raziskani.

Z bioinformacijskimi orodji in z molekularnobiološkimi poskusi smo želeli poiskati in nato opisati značilne predstavnike sistemov toksin-antitoksin tipa VapBC v cianobakteriji *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Toksine oziroma antitoksine, zapisane na kromosomu *M. aeruginosa* PCC 7806, smo identificirali s programoma TAFinder in TASer. TAFinder v danem genomu poišče homologe za znane toksine in antitoksine iz baze podatkov TADB. TASer je orodje, ki toksine in antitoksine napoveduje na podlagi skritih modelov Markova, ustvarjenih s podatkovno bazo TASmania. Z uporabo teh programov smo v genomu *M. aeruginosa* PCC 7806 odkrili 57 lokusov VapBC, izmed katerih smo izbrali 6 kandidatov za eksperimentalno ovrednotenje: VapBC11, VapBC29, VapBC33, VapBC40, VapBC45 in VapBC48.

Za 6 izbranih sistemov bomo izvedli test toksičnosti v bakteriji *Escherichia coli*. Pri tem toksine VapC prekomerno izrazimo v *E. coli* in če je toksin funkcionalen, pride do upočasnitve rasti celic glede na kontrolo oziroma povzroči celično smrt. Aktivnost antitoksinov preverjamo tako, da jih izrazimo v isti celici hkrati s toksini. Če antitoksin uspešno inhibira delovanje toksina, celice rastejo normalno kljub prisotnosti toksina.

## Intedisciplinarno raziskovanje morfoloških lastnosti zunajceličnih veziklov eritrocitnega izvora

Miha Jozelj<sup>1,2,#</sup>, Tobija Košir<sup>1,2,#</sup>, Darja Božič<sup>1,2</sup>, Matej Hočevar<sup>3</sup>, Manca Pajnič<sup>1</sup>, Aleš Iglič<sup>2,4</sup>, Marko Jeran<sup>1,2,5</sup>, Veronika Kralj-Iglič<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta, Laboratorij za klinično biofiziko, Ljubljana

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za fiziko, Ljubljana

<sup>3</sup> Inštitut za kovinske materiale in tehnologije, Odsek za fiziko in kemijo materialov, Ljubljana

<sup>4</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Laboratorij za klinično biofiziko, Ljubljana

<sup>5</sup> Inštitut "Jožef Stefan", Odsek za anorgansko kemijo in tehnologijo, Ljubljana

# V času opravljanja dela: Gimnazija in veterinarska šola, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana

Mentorja: Marko Jeran, prof. dr. Veronika Kralj-Iglič

Zunajcelični vezikli (ZV) predstavljajo z membrano obdane strukture nanometrskih razsežnosti. Tvorijo jih celice, ki jih je mogoče najti v izolatih telesnih tekočin. Zaradi pomembne vloge v medcelični komunikaciji, so izjemnega pomena pri uravnavanju zdravja in bolezni.

V raziskovalnem delu smo opazovali morfološke parametre ZV-jev, izoliranih z diferencialnim centrifugiranjem iz spranih eritrocitov, pri katerih smo vezikulacijo pospešili z dodatkom detergenta (natrijev dodecilsulfat). Alikvoti izolata so bili suspendirani v medij dveh različnih osmolarnosti. Pripravljeni izolati so bili v nadaljevanju slikani z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) in slike analizirane z uporabo obrisov ZV-jev, preko katerih so bili volumen  $V$ , površina  $S$  in relativni volumen  $v = (36\pi S^3/V^2)^{1/2}$ , ocenjeni z geometrijskimi modeli. ZV-ji so bili obravnavani kot krogle ali sferoidi. Z eritrocitnimi zunajceličnimi vezikli bogate izolate, je bilo tako mogoče opisati kot reprezentativne nize; 86 veziklov pri osmolarnosti 50 mOsmol/L in 109 veziklov pri osmolarnosti 300 mOsmol/L. Pri osmolarnosti 50 mOsmol/L so imeli ZV-ji oblike blizu krogle, in pri osmolarnosti 300 mOsmol/L podolgovate oblike. Oblike so bile aproksimirane s podaljšanimi sferoidi. Povprečno razmerje volumen/površina ZV-jev pri osmolarnosti 50 mOsmol/L je znašala  $3,18 \times 10^5 \text{ nm}^3 / 2,20 \times 10^4 \text{ nm}^2$ , in pri osmolarnosti 300 mOsmol/L  $4,3 \times 10^5 \text{ nm}^3 / 2,79 \times 10^4 \text{ nm}^2$ . Ustrezne razlike v prid vrednosti pri 300 mOsmol/L so bile statistično značilne in zadostne moči. Relativni volumen ZV-jev pri 50 mOsmol/L in 300 mOsmol/L je znašal 1 oz. 0,96. Razlika v relativnih volumnih nakazuje, podobno kot pri eritrocitih, ko voda vstopa v ZV-je, da bi dosegla Donnanovo ravnovesje, kjer razlike v volumnih in površinah kažejo, da je prišlo do selektivnega pokanja (večjih) ZV-jev v hiposmolarnem vzorcu.

Jozelj M, Košir T, Božič D, Hočevar M, Pajnič M, Iglič A, Jeran M, Kralj-Iglič V. Morphological parameters of erythrocyte extracellular vesicles at hypoosmotic and isoosmotic conditions. *Proceedings of Socratic Lectures*. 2022; 7: 111-115. DOI: <https://doi.org/10.55295/PSL.2022.D16>

## Izdelava cenovno ugodne elektroforeze za ločevanje umetnih barvil v živilih

Nika Makuc, Maša Mesarič, Katja Holnthaner Zorec, Tamara Šiško

*II. gimnazija Maribor*

Mentorici: Katja Holnthaner Zorec, Tamara Šiško

Gelska elektroforeza je metoda, ki se uporablja za ločevanje molekul DNA glede na njihovo velikost. V srednji šoli se v okviru eksperimentalnega dela običajno ne izvaja, saj je metoda dokaj zahtevna. Prav tako potrebna oprema ni cenovno dostopna vsem šolam, za izvedbo same metode pa so potrebna barvila, s katerimi moramo obarvati sicer brezbarvne molekule DNA, ki so zdravju nevarna. Namen dela je bil oblikovati komoro za elektroforezo iz preprostega materiala, ki bi omogočala izvedbo elektroforeze pri kateri namesto molekul DNA uporabimo barvila za živila. Po več poskusih smo sestavili načrt za izdelavo enostavne in cenovno ugodne elektroforeze. Sestavljeno napravo smo preizkusili in jo uporabili za ločevanje molekul umetnih barvil. Molekule barvil (tartrazin, azorubin...) zaradi negativnega naboja potujejo v enako smer kot DNA, zaradi različne velikosti pa je hitrost njihovega potovanja različna. Tako smo jih lahko uporabili kot model za razumevanje principa ločevanja na podlagi naboja in velikosti, tako kot se ločujejo fragmenti DNA pri profesionalni gelski elektroforezi. Izvedba poenostavljene elektroforeze je možna v šolskem laboratoriju in dijakom omogoča lažje razumevanje zahtevnih tehnik molekulske genetike ter hkrati predstavlja dodatno motivacijo za laboratorijsko delo pri pouku biologije.

## Kako se utrne prva raziskovalna hipoteza

Matej Butala

*Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani*

Moje zanimanje za raziskovanje je v začetku znanstvene kariere vzbudilo dejstvo, da večina antibiotikov, ki jih uporabljamo za zdravljenje bakterijskih infekcij živali in ljudi, v bakterijah lahko sproži poškodbo DNA. Bakterije ob tem ne »stojijo križem rok«, ampak aktivirajo mehanizem s katerim prepoznajo poškodbo DNA in jo popravijo. Popravilo DNA bakterijam omogoča, da na hčerinske celice prenesejo intaktno kopijo genoma. Tekom popravila DNA pa lahko v populaciji bakterij določene bakterije aktivirajo proces mutageneze, to pomeni, da lahko spremenijo tarčne proteine na katere bi sicer delovali antibiotiki, in tako postanejo odporne proti antibiotikom.

Predstavil bom osebno izkušnjo, enega prvih mojih poskusov, ki je izzval zanimivo hipotezo. Z računalniškimi programi sem simuliral kako izgleda oblika-konformacija ključnega proteina, ki uravnava odziv bakterij na poškodbo DNA. Rezultati so me vodili do hipoteze, da protein prevzame specifično konformacijo ob vezavi na DNA. V literaturi je manjkal eksperimentalni dokaz, ki bi hipotezo potrdil ali ovrgel. Odgovor na to znanstveno vprašanje in nadaljnji poskusi niso vodili le v boljše razumevanje, kako bakterije sprožijo odziv na poškodbo DNA, ampak so nam omogočili, da smo čez dvajset let tudi pojasnili mehanizem, s katerim en bakterijski virus prevzame nadzor nad drugim virusom v isti bakteriji.

## Kratek pregled temeljev molekularnobiološke ilustracije

Tim Prezelj<sup>1</sup>, Uršula Berlot Pompe<sup>2</sup>, Nina Gunde Cimerman<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Akademija za likovno umetnost in oblikovanje

<sup>3</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Mentorici: prof. dr. Uršula Berlot Pompe, prof. dr. Nina Gunde Cimerman

Umetnost in znanost sta bili že od nekdaj tesno prepleteni, saj so številna umetniška dela izhajala iz naravoslovnih odkritij, hkrati pa je tudi umetnost podžigala željo po boljšem poznavanju sveta. Od vseh znanstvenih področij je morda prav laboratorijska biologija najbolj korenito vplivala na razvoj evropske vizualne umetnosti. V srednjem veku so nekateri mikrobi povzročali številne epidemične bolezni, upodobljene na mnogih znamenitih umetniških delih svetovnih mojstrov. Na prelomu iz 19. v 20. stoletje je bil znanstveni in tehnični napredek na vrhuncu. Izboljšave mikroskopa so omogočile raziskovanje prej nevidnih mikroorganizmov. Mladi ambiciozni umetniki, naveličani izrabljenih motivov takrat uveljavljenega historizma, so skozi mikroskop uzrli popolnoma nove oblike. Temu so seveda sledile tudi spremembe na področju znanstvene ilustracije. Pri tem je bil eden ključnih revolucionarjev nemški evolucionisti biolog Ernst Haeckel s svojim delom *Kunstformen der Natur*. Podobe so postale zelo pomembne kot tudi način postavitve na same grafične liste. K temu so močno prispevala tudi nova umetniška gibanja druge polovice 19. stoletja (npr. *arts and crafts*) in začetka 20. stoletja (npr. *secesija*).

Podobe številnih (molekularno)bioloških modelov so ovekovečene tudi na in v delih sodobnih avtorjev, kot sta David Goodsell in Luke Jerram. Prvi je zelo dobro poznan tudi v biokemijskem svetu, saj njegove ilustracije krasijo naslovnice več univerzitetnih učbenikov, znanstvenih publikacij in baz podatkov (npr. *Protein Data Bank – PDB*). Oba omenjena avtorja pa odlikuje predvsem sodobni znanstveni realizem po zgledu Ernsta Haeckla.

V prispevku želim prikazati nekatera temeljna dela znanstvene umetnosti s področja biokemije, molekularne biologije in mikrobiologije. Področje je posebej pomembno, saj so omenjene discipline zaradi majhnosti elementov in procesov, s katerimi se ukvarjajo, močno podvržene abstrakciji. Zato so vizualni modeli, ki nam osmislijo posamezne teorije, ključni za razumevanje znanstvenih dognanj na teh področjih, hkrati pa usmerjajo nadaljnji razvoj področja in širše razumevanje in interpretacijo posameznih teorij. Poleg tega so posamezne molekularnobiološke tehnike danes že močno uveljavljene tudi kot umetniško izrazno sredstvo. Tako je npr. potencial mikrobov kot slikarskega medija prvi prepoznal že Alexander Fleming. Kasneje se je iz tega razvilo zelo dinamično znanstveno-umetniško področje bioumetnosti oz. BioArta. Vse to odraža pomen širokega pogleda in interdisciplinarnega pristopa za doseganje prelomnih znanstvenih in umetniških rezultatov.

## Validacija metode določanja melatonina v slini s tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo in njena uporaba pri bolnikih z obstruktivnimi pavzami dihanja med spanjem

Gal Kranjc<sup>1</sup>, Ajda Kovačič<sup>1</sup>, Dani Mirnik<sup>2</sup>, Cene Skubic<sup>3</sup>, Damjana Rozman<sup>3</sup>, Leja Dolenc Grošelj<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

<sup>2</sup> ZVD Zavod za varstvo pri delu d.o.o.

<sup>3</sup> Center za funkcijsko genomiko in biočipe, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Univerza v Ljubljani

<sup>4</sup> Klinični inštitut za klinično nevrofiziologijo, Nevrološka klinika, UKC Ljubljana

Mentorici: prof. dr. Damjana Rozman, prof. dr. Leja Dolenc Grošelj, dr. med.

Delovna mentorja: asist. - razisk., asist. Cene Skubic, asist. Dani Mirnik, dr. med., spec. MDPŠ

Melatonin je najpogosteje uporabljen kazalnik cirkadianosti pri človeku. Na voljo so različni načini vzorčenja in analiznih metod za določanje melatonina v telesu. Kljub temu univerzalni zlati standard za merjenje melatonina še ne obstaja. Validacija nove standarizirane metode za merjenje melatonina pri človeku bi predstavljala pomemben doprinos tako raziskovalni dejavnosti kot klinični praksi na področju cirkadianosti in motenj spanja. Dosedanje študije kažejo, da je slina ustrezna in uporabna telesna tekočina za merjenje melatonina, med analiznimi metodami pa prevladuje tekočinsko kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (angl. LC-MS), ki smo jo validirali v naši študiji.

V naši raziskavi smo želeli preveriti naslednji hipotezi: 1. vrednosti melatonina iz vzorcev sline zdravih kontrol bodo nihale v normalni 24-h krivulji in bodo primerljive z rezultati aktimetrije in dnevnik spanja in 2. vrednosti melatonina pri bolnikih z obstruktivno spalno apnejo (OSA) bodo pokazale porušen ritem izločanja melatonina, kar bo skladno s porušeno arhitekturo spanja, objektivno merjeno s poligrafijo in aktimetrijo.

V naši prospektivni dvojno slepi študiji je sodelovalo 44 zdravih preiskovancev in 12 bolnikov z diagnozo OSA. Podatke o kronotipih in spalnih navadah preiskovancev smo pridobili s 14-dnevno aktimetrijo, dnevnikom spanja in Muenchenskim vprašalnikom kronotipa (angl. MCTQ). V zadnjih 24 urah snemanja aktimetrije so preiskovanci na 3 ure oddajali vzorce sline, v katerih smo merili nivo melatonina.

Med zdravimi preiskovanci so podatki iz MCTQ dobro korelirali s podatki iz aktimetrij. Z uporabo deskriptivne statistike smo določili nihanja koncentracij melatonina v slini in ugotovili dobro skladnost s pričakovano fiziološko krivuljo izločanja melatonina. Pri 41 (93,2%) preiskovancih smo uspešno določili začetek izločanja melatonina (DLMO). Med 12 bolniki z OSA smo DLMO lahko določili pri 9 (75,0%). DLMO bolnikov z blago in zmerno OSA je bil primerljiv z DLMO zdravih preiskovancev, medtem ko je razporeditev DLMO pri bolnikih s hudo OSA pokazal veliko razpršenost tekom celotnega dneva.

Glavna ugotovitev naše raziskave je potrditev ustreznosti LC-MS metode za določanje melatonina v slini in določanje DLMO. Naši podatki nakazujejo na moteno izločanje melatonina pri bolnikih s hudo OSA, kar bo potrebno potrditi na večjem številu preiskovancev. Uporabljena metoda kaže potencial za klinično prakso, saj nam omogoča določati spremembe cirkadianosti v odvisnosti od stopnje OSA, kar do sedaj v znanstveni literaturi še ni bilo opisano.



## Encimi v medu in vpliv povišane temperature na antibakterijske lastnosti medu

Katja Huber, Goran Jocić, Nina Žuman

*Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer*

Mentorica: mag. Nina Žuman

Pri uporabi medu pogosto prihaja do napačnih načinov uporabe. Med uporabljamo kot sladilo v kulinariki in kot domače zdravilo pri lažji obliki prehlada ali bolečine v grlu. Ker pa ga zaužijemo v razredčeni obliki, raztopljenega v čaju ali drugih napitkih in v drugih živilih, izgubi svoje osnovne sposobnosti zdravljenja ali zaviranja bolezenskih stanj.

Z našo raziskovalno nalogo smo želeli potrditi prisotnost aktivnih encimov v medu pri sobni temperaturi in izmeriti koncentracijo prostega vodikovega peroksida in antibakterijsko ali antimikrobno aktivnost medu. Encimska števila in encimske aktivnosti smo merili s pomočjo standardiziranih metod in tudi prirejenih metod. Koncentracijo vodikovega peroksida smo izmerili pri različno segretyh vzorcih medu: pri sobnih pogojih (298,15 K (25 °C)), pri pogojih ohlajenega čaja (333,15 K (60 °C)) in pri pogojih vročega čaja (353,15 K (80 °C)). Antibakterijsko učinkovitost smo izmerili s pomočjo difuzijskega antibiograma, prav tako pri različno segretyh vzorcih medu.

Za med pri sobni temperaturi sva ugotovila, da vsebuje aktivne encime diastazo, katalazo ter invertazo in tako ugotovila, da naša vzorca nista bila izpostavljena visokim temperaturam n direktni sončni svetlobi. Naša vzorca smo zato lahko nadaljnjo analizirali.

Dobljeni rezultati kažejo na to, da se kljub znižani koncentraciji prostega vodikovega peroksida, pri temperaturah do 60 °C ohranijo antibakterijske lastnosti medu, na kar kažejo difuzijski antibiogrami. Le-ti so pokazali tudi, da pri temperaturah višjih ali enakih od 80 °C med izgubi svoje antibakterijske lastnosti, koncentracija prostega vodikovega peroksida pa se spusti pod mejo zaznave.

## Vpliv konzerviranja plodov čilijev (*Capsicum spp.*) na vsebnost kapsaicinoidov

Luka Medic<sup>1</sup>, Veronika Babič<sup>1</sup>, Ana Slatnar<sup>2</sup>

1 Gimnazija Ledina

2 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Mentorici: Veronika Babič, izr. prof. Ana Slatnar

Plodove čilijev največkrat uporabljamo v kulinariki. Paleta izdelkov iz čilijev je zelo pestra, poznamo sušene ter zmlate v prah, konzervirane v kisu ali olju, predelane v pekoče omake ... Za ljubitelje pekočine, ki jo imajo čiliji, je podatek o tem, kako pripraviti in hraniti plodove čilija, da bi ohranili čim več sestavin, ki povzročajo pekoč občutek v ustih, zelo pomemben. Sekundarni metaboliti, ki pečejo in jih vsebujejo plodovi, so kapsaicinoidi. Najbolje zastopana sta kapsaicin in dihidrokapsaicin, ki predstavljata več kot 90 % vseh kapsaicinoidov v plodu. Ostali kapsaicinoidi so še nordihrokapsaicin, homokapsaicin in homodihrokapsaicin, ki predstavljajo manjši delež kapsaicinoidov v plodu. Znano je, da visoke temperature zmanjšajo vsebnost kapsaicinoidov v plodu čilija.

Preučevali smo tri sorte čilijev ('Aribibi gusano', 'Bishop's crown' in 'Lemon drop'), pri katerih smo merili vsebnost posameznih kapsaicinoidov pri svežih in posušenih plodovih ter pri plodovih, konzerviranih v kisu. Po obdelavi smo vse plodove liofilizirali. Nato smo kapsaicinoide izmerili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) in za pomoč ob detekciji uporabili tandemsko masno spektrometrijo (MS/MS) v načinu SRM. Rezultate smo izrazili na suho snov.

Ugotovili smo, da sušeni plodovi in plodovi, konzervirani v kisu, v večini primerov vsebujejo manjše vsebnosti kapsaicinoidov kot v primerjavi s svežimi – vsebnost kapsaicinoidov je v večini primerov najmanjša pri plodovih, ki so bili konzervirani v kisu. Ugotovili smo tudi, da ima sorta 'Aribibi gusano' največjo vsebnost kapsaicinoidov, sledi sorta 'Lemon drop' in nato sorta 'Bishop's crown'. Presenetil nas je rezultat pri sorti 'Aribibi gusano', kjer so se pri vlaganju vrednosti nekaterih kapsaicinoidov zvišale glede na vrednost kapsaicinoidov v svežih plodovih.

Kaj vse vpliva na izgubo kapsaicinoidov pri konzerviranju? Za odgovor na to vprašanje bi bile potrebne nadaljnje raziskave, pri katerih bi morali biti pozorni tudi na obliko in debelino plodov.

## ***OSTALI POVZETKI***

## Vnetna naprava na osnovi molekule TRIF za potencialno imunoterapijo raka

Jakob Kecelj<sup>1</sup>, Ana Pibernik<sup>1</sup>, Renata Capuder Mermal<sup>1</sup>, Cirila Jeras<sup>1</sup>, Elvira Boršič<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gimnazija in srednja šola Rudolfa Maistra Kamnik

<sup>2</sup> Kemijski inštitut, Ljubljana

Mentorice: Renata Capuder Mermal, prof., Cirila Jeras, prof., Elvira Boršič, mag. biokem.

Vzporedno z razvojem znanosti je prišlo tudi do večjega poznavanja in razumevanja celičnih obolenj, njihovih lastnosti in odzivov. Pomemben del prirojenega imunskega odziva v celicah so različne signalne poti, s katerimi celice odgovarjajo na patogene in bolezenske vplive.

V raziskovalni nalogi smo preučevali možnost boljše aktivacije signalnih poti z uporabo vnetnih naprav. S tehnikami molekulskega kloniranja smo pripravili različne vnetne naprave (konstrukte), sestavljene iz različnih odsekov molekule TRIF. Zanimalo nas je, ali vezava določenih odsekov TRIF z ogrodnim proteinom TDP-43 močnejše aktivira različne signalne poti in vodi v večjo produkcijo citokinov, ki so potrebni za nadaljnji imunski odziv. Z delom smo želeli preučiti uporabo vnetne naprave na osnovi molekule TRIF in njeno potencialno možnost za zdravljenje in imunoterapijo raka. Rakave celice imajo namreč imunskemu sistemu neprepoznavno celično membrano, kar onemogoča njihovo uničevanje. Z uporabo vnetnih naprav pa bi rakave celice lahko same vzbudile in sprožile imunski odziv.

Pri delu smo raziskovali s celično linijo HEK293, v katero smo vnesli pripravljene konstrukte. Vpliv konstruktov smo preverili z dvojnimi luciferaznim testom ter encimsko- imunskim testom ELISA. Za vizualizacijo in ogled celic pa smo izvedli konfokalno mikroskopijo.

Ugotovili smo, da lahko na osnovi izbranih odsekov TRIF v kombinaciji s TDP-43 pripravimo učinkovito vnetno napravo, kar daje odlično odskočno desko za nadaljnje raziskave izboljšanja pripravljenih vnetnih naprav v tej raziskovalni nalogi, kar bi lahko v prihodnosti pripomoglo k zdravljenju raka.

## Vpliv hidrolitičnih encimov na antioksidativno učinkovitost oljčnih listov

Julija Skrt<sup>1</sup>, Jaša Krevh<sup>1</sup>, Alenka Mozer<sup>1</sup>, Ilja Gasan Osojnik Črnivec<sup>2</sup>, Mihaela Skrt<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gimnazija Vič

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Mentorji: asist. dr. Mihaela Skrt, doc. dr. Ilja Gasan Osojnik Črnivec, Alenka Mozer

Oljčni listi so naravni in nizkocenovni vir fenolnih spojin, med katerimi prevladuje olevropein. Te spojine so zaradi svoje potencialne antioksidativne učinkovitosti koristne za človeško telo. Njihova vsebnost v ekstraktih oljčnih listov je odvisna od različnih dejavnikov, kot so izbrano topilo, temperatura in metoda ekstrakcije.

Naš cilj je bil raziskati hitro, ugodno in okolju prijazno metodo ekstrakcije fenolnih spojin v oljčnih listih z dodatkom mešanice hidrolitičnih encimov, s katero bi iz listov pridobili znatno količino fenolnih spojin.

V skladu z načeli zelene kemije smo uporabili različne metode ekstrakcije, kot sta stresanje in magnetno mešanje (pri pH 2, 4, 6 in 8) za krajši in daljši čas, za topilo pa smo uporabili ultra čisto vodo. Učinek teh ekstrakcijskih metod smo določili z analizo skupne vsebnosti fenolnih spojin, določeno z metodo Folin-Ciocalteu, in analizo antioksidativne učinkovitosti, določene z 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilom (DPPH). Te rezultate smo primerjali z rezultati kontinuirne in vitro simulacije prebavnega sistema. S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) smo določili vsebnost olevropeina in hidroksitirozola v vodnih ekstraktih oljčnih listov istrske belice iz leta 2020.

Naši rezultati so pokazali, da je mešanica hidrolitičnih encimov, uporabljena v raziskavi, povečala učinkovitost ekstrakcije, znižala skupno vsebnost fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitost ne glede na sorto, letni čas obiranja in starost listov. Encimi so znižali vsebnost olevropeina in povečali vsebnost hidroksitirozola.

## Kloniranje, izražanje in izolacija proteina NONO

Ajda Beltram, Vera Župunski

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Mentorica: doc. dr. Vera Župunski

Protein NONO (*angl.* non-POU domain-containing octamer-binding protein) spada v družino RNA/DNA vezavnih proteinov DBHS (The Drosophila behaviour/human splicing protein family), kamor sodita še proteina SFPQ (splicing factor proline/glutamine-rich) in PSPC1 (paraspeckle protein component 1). Proteini te družine se nahajajo pretežno v jedru celice in so del parapega. To so jedrne ribonukleoproteinske granule brez membrane, ki nastanejo kot odgovor na stres in sodelujejo pri regulaciji izražanja genov preko interakcij s transkripcijskimi faktorji in molekulami RNA. Glavni sestavni deli so nekodirajoča RNA *NEAT1* in proteina NONO ter SFPQ. Proteini družine DBHS so zgrajeni iz regije DBHS, ki je sestavljena iz dveh RNA prepoznavnih domen imenovanih RRM1 in RRM2, domene NonA/parapega (NOPS) in C-končne ovite vijačnice. So obligatni dimeri, ki lahko znotraj družine tvorijo hetero- ali homodimere.

Najpogostejši vzrok za pojav nevrodegenerativne bolezni amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je mutacija v genu *C9ORF72* (chromosome 9 open reading frame 72), kjer pride do povečanja števila heksanukleotidnih ponovitev GGGGCC (iz 30 ponovitev na več sto ali celo 1000). S prepisom teh ponovitev nastane RNA, na katero se vežejo RNA vezavni proteini, kot sta NONO in SFPQ, pri čemer nastanejo parapegam podobni skupki. To lahko vpliva na delovanje proteinov znotraj skupkov.

Da bi bolj podrobno raziskali parapegam podobne skupke, smo najprej poskusili izraziti protein NONO v fuziji z maltoza vezavnim proteinom (MBP). Pripravili smo dva konstrukta: zapis za NONO smo vstavili v vektor pMCSG7 z MBP na N- in C- koncu. Pri izražanju obeh verzij v celicah *E. coli* BL21[DE3] smo fuzijska proteina najprej poskusili izolirati z nikljevo afinitetno kromatografijo, pri čemer smo bili v obeh primerih uspešni, a smo varianto z MBP na N-koncu izolirali v večji količini. Poleg tega smo poskusili izolirati oba fuzijska proteina tudi s kolono z afiniteto do MBP, vendar je bil izkoristek manjši kot pri izolaciji z nikljevo afinitetno kromatografijo. Zaradi prisotnosti nečistoč smo izolirani protein poskusili očistiti še s heparinsko afinitetno kromatografijo, s čimer smo se znebili nekaterih nečistoč, vendar pa smo velik del fuzijskega proteina izgubili.

V nadaljnjih raziskavah bomo povečali izkoristek izolacije in analizirali interakcije proteina z ostalimi proteini družine DBHS. Rezultati bi lahko pripomogli pri razumevanju interakcij proteina NONO in nastanku parapegam podobnih skupkov, ki nastanejo pri ALS.

## Izražanje proteaze CEP2 iz zelene alge *Chlamydomonas reinhardtii* v bakterijskih celicah *Escherichia coli* in njena aktivacija

Tinkara Božič, Katarina Petra van Midden, Marina Klemenčič

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Mentorici: Katarina Petra van Midden, doc. dr. Marina Klemenčič

Cisteinsko endopeptidazo CEP2 iz zelene alge *Chlamydomonas reinhardtii* uvrščamo med predstavnike družine papainu podobnih cisteinskih proteaz (angl. *papain-like cysteine proteases*, PLCP). Ti encimi so pri rastlinah povezani z regulirano celično smrtjo (angl. *regulated cell death*, RCD). Podružina PLCP iz modelne rastline *Arabidopsis thaliana*, RD21, sodeluje pri sprožitvi RCD pri rastlinah in posreduje pri njihovem imunskemu odzivu proti patogenom. Cisteinska endopeptidaza CEP2 iz *C. reinhardtii* je sorodna predstavnikom iz podružine RD21B, zato ima morda podobno vlogo v rastlinski celični smrti.

Da bi lažje predvideli biokemijske lastnosti CEP2, smo jo najprej bioinformacijsko okarakterizirali. Za začetek smo pripravili poravnavo aminokislinskih zaporedij CEP2 in RD21B, s katero smo primerjali položaje posameznih delov zaporedja in obsega treh glavnih domen v obeh polipeptidnih verigah. Na podlagi aminokislinskega zaporedja proteaze CEP2 smo s spletnimi orodji pripravili model njene terciarne strukture.

Laboratorijsko delo je obsegalo poskuse, s katerimi smo v bakterijskih celicah *Escherichia coli*, seva Rosetta-gami 2, pripravili rekombinantno proteazo CEP2 in jo nato izolirali. Izolacijo proteina z nikljevo afinitetno kromatografijo in ionskoizmenjevalno kromatografijo na anionski koloni smo spremljali na elektroforeznih gelih po NaDS-PAGE. Uspešnost izolacije smo preverili s prenosom western in detekcijo s protitelesi proti heksahistidinski oznaki v N-končni prodomeni proteina CEP2. Preverjali smo tudi aktivacijo proteina zaradi inkubacije v pufru z nižano vrednostjo pH. Med izolacijo proteaze CEP2 smo opazili, da se protein cepi s C-konca in da je inkubacija v pufru z nižjo vrednostjo pH praktično nepomembna za aktivacijo proteina, saj je bil le-ta približno enako aktiven tako brez predhodne inkubacije kot po njej. Poleg tega smo pripravili tudi pH-profil aktivnosti proteina CEP2, s katerim smo pokazali, da je encim CEP2 optimalno aktiven v rahlo kislem območju, pri pH 5,0. Nazadnje smo pripravili še poskus, pri katerem smo z ireverzibilnim inhibitorjem cisteinskih proteaz, E-64, zavrli avtokatalitično delovanje encima CEP2, da smo lahko preverili, ali se izoliran protein procesira sam ali ne. Na podlagi rezultatov tega poskusa sklepamo, da se CEP2 ne cepi sam, ampak ga procesira neka še neidentificirana proteaza, ki je prisotna v lizatu *E. coli*.

## Inovativni inženirski pristop tvorbe fosfolipidnih veziklov z odprtokodnim sistemom kot virom sinusne napetosti

Marin Gazvoda de Reggi<sup>1,#</sup>, Urban Malavašič<sup>1,#</sup>, Tia Klenovšek<sup>1</sup>, Samo Penič<sup>1</sup>, Marko Jeran<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij fiziko, Ljubljana

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta, Laboratorij za klinično biofiziko, Ljubljana

<sup>3</sup> Inštitut "Jožef Stefan", Odsek za anorgansko kemijo in tehnologijo, Ljubljana

#Študenta-raziskovalca, aktivna v okviru sodelujočih institucij

Mentorja: Marko Jeran, doc. dr. Samo Penič

Odprta znanost (*angl.* Open science) zajema pregledno in dostopno znanje, ki se deli in razvija preko različnih omrežij in omogoča širšo dostopnost raziskovalnih podatkov ter pospeši proces kreiranja novega znanja. Odprtokodna programska oprema ima javno dostopno izvorno kodo, ki jo lahko vsak posameznik pregleda, spremeni in za potrebe lastnega raziskovalnega dela tudi izboljša. Tekom raziskovalnega dela smo metodologijo »Open Science« vpeljali v raziskave tvorbe celičnih membran in uspešno pokazali, da tovrstni pristop, ki interdisciplinarno povezuje vede o življenju z inženirskimi panogami, tvorbo pospešuje sintezo in aplikacijo različnih znanj.

Fosfolipidne molekule se lahko v vodnih raztopinah orientirajo v liposome oz. v fosfolipidne vezikle (mehurčke). Zaradi podobnosti zgradbe membrane liposomov celični membrani, lahko liposome uporabimo kot model za preučevanja lastnosti celičnih membran in membrane celičnih organel. Zasnovan odprtokodni sistem smo uporabili kot vir sinusne napetosti, ki služi kot alternativa drugim funkcijskih generatorjem, in ga uspešno uporabili za elektroformiranje orjaških fosfolipidnih veziklov. Končno napravo smo uspešno uporabili za sintezo veziklov iz 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholina (POPC) in njegove mešanice s holesterolom (4:1).

Rezultati eksperimentalnega so pokazali, da sta tako velikost kot koncentracija orjaških fosfolipidnih veziklov, odvisna od časovne komponente. S staranjem suspenzije pri sobni temperaturi vezikli postajajo ohlapni in v veliki meri dovzetni za efekte v suspenziji, kar privede do pokanja posameznik celic. Ugotovljeno je bilo tudi, da imajo fosfolipidni vezikli, tvorjeni iz mešanice POPC/holesterol (4:1), zaradi vključka holesterolne komponente bolj ojačano membrano in so na vplive iz okoliške raztopine manj odporni, zato pokajo počasneje.

Gazvoda de Reggi M, Malavašič U, Jeran M, Penič S. Open science: development of open platform for giant unilamellar phospholipid vesicles electroformation. *Proceedings of Socratic Lectures*. 2021; 6: 99-113. <https://doi.org/10.55295/PSL.2021.D.014>



## **Sklapljanje CRISPRi tehnologije z obogatitvijo fluorescenčno označenih celic s pretočno citometrijo (FACS): Nov pristop v glikoinženiringu celičnih linij CHO za proizvodnjo terapevtskih glikoproteinov**

Katja Glinšek<sup>1,2</sup>, Lovro Kramer<sup>2</sup>, Aleksander Krajnc<sup>2</sup>, Eva Kranjc<sup>1</sup>, Nina Pirher<sup>2</sup>, Jaka Marušič<sup>2</sup>, Leon Hellmann<sup>3</sup>, Barbara Podobnik<sup>2</sup>, Borut Štrukelj<sup>1,\*</sup>, David Ausländer<sup>3,\*</sup> in Rok Gaber<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

<sup>2</sup> Novartis Globalni razvoj zdravil, Razvoj bioloških učinkovin, Mengeš

<sup>3</sup> Novartis Institutes for Biomedical Research, Basel, Švica

Mentorja: prof. Borut Štrukelj, dr. Rok Gaber

Večina terapevtskih proteinov, kamor uvrščamo inovativna biološka zdravila in podobna biološka zdravila, je glikoziliranih. Glikani neposredno vplivajo na pglavitne lastnosti terapevtskih proteinov, kot so stabilnost, potentnost, razpolovni čas, imunogenost in efektorske funkcije. Za glikoproteine je značilna visoka heterogenost pripetih glikanskih struktur, saj za razliko od proteinske sinteze, glikozilacija proteinov ne poteka po predlogi. Visoka heterogenost glikanov na terapevtskih proteinih tako zavisi od izbora gostiteljske celične linije in izbranega bioprocesa. Zaradi pomembnega vpliva na varnost in učinkovitost terapevtskih proteinov, je glikozilacija prepoznana kot kritični atribut kakovosti (ang. critical quality attribute; CQA) bioloških zdravil, ki jo je potrebno sistematično analizirati in nadzorovati skozi celoten proces proizvodnje zdravila. Ohranjanje konsistence glikostruktur, vezanih na terapevtski protein, med posameznimi bioprocesi oz. šaržami in dokazovanje podobnosti v glikozilaciji, predstavlja eno izmed najbolj zahtevnih aspektov v proizvodnji bioloških in podobnih bioloških zdravil. Ovarijske celice kitajskega hrčka (v nadaljevanju celice CHO) so najpogosteje uporabljene celične linije za proizvodnjo bioloških zdravil. V zadnjih dvajsetih letih je bilo preizkušenih veliko različnih načinov genetskih modifikacij celičnih linij CHO z namenom doseganja tarčnega glikanskega profila na proteinskih terapevtikih. Številne študije so se osredotočale na uravnavanje fukozilacije, natančneje na ustvarjanje celičnih linij, ki proizvajajo popolnoma afukozilirana protitelesa. To pa zgolj deloma naslavlja izzive, kjer je tarčni nivo fukozilacije določen vnaprej, kot je to v primeru razvoja podobnih bioloških zdravil. Generiranje ogromnega števila celičnih klonov skupaj z obsežnim iskanjem klona z ustrezno kvaliteto (nivojem fukozilacije v tarčnem območju originatorskega zdravila), je trenutno v razvoju celičnih linij neizogibno. Za reševanje omenjenih izzivov, je torej nujen razvoj novih pristopov, ki prispevajo k optimizaciji dolgotrajnega generiranja in iskanja produkcijskih klonov in hitrejšemu razvoju celičnih linij za proizvodnjo terapevtskih proteinov. Prav to pa smo poskusili nasloviti z našo raziskavo, kjer smo preučevali nov pristop glikoinženiringa v razvoju terapevtskih proteinov. Z novim pristopom smo uspešno dosegli tarčni glikoprofil na modelnem fuzijskem proteinu v zelo kratkem času. S sklopitvijo tehnologije CRISPR interference (CRISPRi) z obogatitvijo celic z lektinskim označevanjem in pretočno citometrijo (angl. lectin-FACS) smo uspešno utišali izražanje endogenega gena, ki je vključen v proces fukozilacije in v nadaljevanju obogatili celice CHO, ki so proizvajale modelni fuzijski protein z nižjo vsebnostjo fukoze. Pokazali smo, da z obogatitvijo celic s tarčnim glikoprofilom, skrajšamo proces iskanja celičnih klonov in pospešimo razvoj produkcijskih celičnih linij. Nenazadnje, pokazali smo, da je predstavljen pristop primeren za širok nabor glikoproteinov, ki se med seboj razlikujejo v tarčnem nivoju fukozilacije, saj omogoča izolacijo celičnih klonov z različnimi nivoji fukozilacije.

Opisana študija je bila objavljena v obliki raziskovalnega članka z naslovom *Coupling CRISPR interference with FACS enrichment: New Approach in Glycoengineering of CHO Cell Lines for Therapeutic Glycoprotein Production* v reviji *Biotechnology journal*, aprila 2022.

## Ali je beta-aktin primerna kontrola nanosa pri delu s profilinom 1?

Tanja Gošnjak, Urša Pečar Fonovič

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo*

Mentorica: doc. dr. Urša Pečar Fonovič, univ. dipl. biol.

Profilin 1 je protein velik 14 kDa. Nahaja se v citoplazmi in jedru. Citoplazemski profilin veže monomere aktina in sodeluje pri polimerizaciji aktinskih filamentov. Zaradi pogoste uporabe beta-aktina kot kontrole nanosa pri delu s profilinom 1 nas je zanimalo, če je ta primeren za uporabo pri prenosu western. Prenos western je pogosto uporabljena metoda namenjena identifikaciji, (semi)kvantifikaciji in opredelitvi velikosti specifičnega proteina. Da lahko pridemo do relevantnih zaključkov analize prenosa western in da lahko primerjamo rezultate med vzorci, moramo zagotoviti, da so ugotovljene razlike posledica zgolj razlike v količini proteina in ne posledica razlike v količini nanosa vzorca. V ta namen uporabljamo kontrole nanosa kot interne kontrole pri prenosu western. Beta-aktin je pogosto uporabljena kontrola nanosa pri proučevanju proteinov v citoplazmi in tudi pri delu s profilinom 1.

Preverili smo, ali je beta-aktin ustrezna kontrola nanosa pri delu s profilinom 1 in jo primerjali z GAPDH in s tubulinom. V celični kulturi SH-SY5Y smo s tehniko siRNA utišali gen za profilin 1 in pripravili celične lizate. Proteine smo ločili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata in s specifičnimi protitelesi na membrani detektirali profilin 1 in kontrole nanosa (beta-aktin, GAPDH in tubulin). Primerjali smo signal profilina 1 z beta-aktinom oziroma ostalimi kontrolami nanosa. V signalu beta-aktina med vzorci z utišanim profilinom 1 in kontrolnimi vzorci nismo zaznali večjih odstopanj, zato smo sklepali, da profilin 1 ne vpliva na količino beta-aktina v celici, kljub temu da vpliva na njegovo polimerizacijo. Predvidevamo, da profilin 1 z regulacijo polimerizacije aktina vpliva na dolžino aktinskih filamentov in ne na koncentracijo beta-aktina v celici.

## Karakterizacija vezave kalcijevih ionov v kalmodulinu-podobni domeni $\alpha$ -aktinina 4

Andrej Ivanovski, Jošt Hočevar, Miha Pavšič

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo*

Mentor: doc. dr. Miha Pavšič

$\alpha$ -aktinin je citoskeletni protein iz družine spektrinov, ki na splošno igrajo povezovalno vlogo med različnimi celičnimi strukturami. Sestavljajo ga tri regije in sicer aktin-vezavna domena, paličasta regija s štirimi spektrinskimi ponovitvami in kalmodulinu podobna domena. Aktivno obliko proteina predstavlja antiparalelen homodimer z aktin-vezavno domeno na obeh koncih, katerega osrednja vloga je prečno povezovanje aktinskih filamentov v snope in mreže.  $\alpha$ -aktinine delimo na dve skupini glede na njihovo tkivno specifičnost. Mišični izoobliki,  $\alpha$ -aktinina 2 in 3, ne vežeta  $\text{Ca}^{2+}$ -ionov. Po drugi strani nemišični izoobliki,  $\alpha$ -aktinina 1 in 4, vežeta  $\text{Ca}^{2+}$ -ione, kar vpliva na njuno strukturo in posledično na prostorsko ureditev z njima povezanih aktinskih filamentov.

Dosedanje raziskave so pokazale, da vezava  $\text{Ca}^{2+}$ -iona v kalmodulinu podobno domeno  $\alpha$ -aktinina 1 sproži konformacijske spremembe v tem delu molekule, ki se po predvidevanjih prenesejo na aktin-vezavo domeno in posledično reorganizacijo aktinskega citoskeleta. Z namenom primerjati  $\text{Ca}^{2+}$ -vezavne lastnosti nemišičnih  $\alpha$ -aktininov smo se osredotočili na še neokarakterizirano izoobliko 4.

Z bioinformatično analizo, kjer smo primerjali zaporedja kalmodulinu podobnih domen različnih izooblik, smo določili tiste aminokislinske ostanke v kalmodulinu-podobni domeni  $\alpha$ -aktinina 4, ki so najverjetneje ključni pri koordinaciji  $\text{Ca}^{2+}$ -iona. Podobno kot pri  $\alpha$ -aktininu 1 je tudi pri tej izoobliki pri vezavi  $\text{Ca}^{2+}$ -ionov aktivna le ena izmed štirih t.i. EF-dlani. Da bi to hipotezo preverili smo v kalmodulinu podobno domeno  $\alpha$ -aktinina 4 uvedli različne točkovne mutacije, mutantne oblike pa nato okarakterizirali z uporabo izotermne titracijske kalorimetrije. Potrdili smo, da je res aktivno le eno od potencialnih vezavnih mest za  $\text{Ca}^{2+}$ , afiniteta za vezavo pa je 4-krat nižja kot pri  $\alpha$ -aktininu 1. Predvidevamo, da je opažena razlika eden izmed faktorjev, ki vplivajo na različno obnašanje teh dveh izooblik ter posledično na njuno različno preferenčno vključenost v citoskeletne strukture (fokalni stiki, ukrivljene membranske strukture).

## Vpliv zaviralcev PCSK9 na raven plazemskih nekodirajočih mikroRNA pri bolnikih z zelo visokimi vrednostmi lipoproteina(a)

Tina Karun<sup>1</sup>, Tina Levstek<sup>1</sup>, Andreja Rehberger Likozar<sup>2</sup>, Miran Šebeštjen<sup>2,3,4</sup>, Katarina Trebušak Podkrajšek<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> *Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*

<sup>2</sup> *Klinični oddelek za žilne bolezni, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana*

<sup>3</sup> *Klinični oddelek za kardiologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana*

<sup>4</sup> *Katedra za interno medicino, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*

<sup>5</sup> *Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana*

Mentorji: prof. dr. Katarina Trebušak Podkrajšek, izr. prof. dr. Miran Šebeštjen, asist. Tina Levstek

Protein konvertaze subtilisin/keksin tipa 9 (PCSK9) je protein, ki sodeluje pri lizosomalni razgradnji receptorjev LDL in s tem zvišuje raven lipoproteina nizke gostote (LDL) v krvi, kar lahko vodi v razvoj ateroskleroze. Za zniževanje biološke aktivnosti PCSK9 in s tem verjetnosti za kardiovaskularne dogodke se v zadnjem času uporabljajo zaviralci PCSK9, ki preko vezave na PCSK9 preprečijo razgradnjo receptorjev LDL. Na raven PCSK9 pa vplivajo tudi majhne nekodirajoče RNA, imenovane mikroRNA (miRNA), vendar so raziskave, ki bi preučevale njihov vpliv, izjemno redke. Zato je bil namen naše raziskave raziskati vpliv zaviralcev PCSK9 na raven nekaterih miRNA, ki so bile na celičnih oz. živalskih modelih že povezane z uravnavanjem izražanja PCSK9.

V raziskavo smo vključili 64 bolnikov in 16 kontrolnih preiskovancev. Bolniki so imeli stabilno koronarno arterijsko bolezen in zelo visoke vrednosti lipoproteina (a). Razdelili smo jih v dve skupini. Prva skupina je šest mesecev prejela zaviralec PCSK9 (evolocumab ali alirocumab), druga skupina pa je najprej šest mesecev prejela placebo, zatem pa zaviralec PCSK9. Klinični in laboratorijski parametri so bili izmerjeni pred in po placebo obdobju ter pred in po šestih mesecih zdravljenja. RNA smo izolirali iz plazme z uporabo NextPrep™ Magnazol™ cfRNA Isolation Kit-a (Perkin Elmer, USA). Raven kandidatnih miRNA (miR-224-5p, miR-191-5p, miR-337-3p, miR-483-5p) ter dveh miRNA za normalizacijo (miR-16-5p, miR-4516) smo določili z miRCURY LNA miRNA PCR Assay-i (Qiagen, Germany).

Ob vključitvi v raziskavo se je med bolniki in kontrolnimi preiskovanci statistično razlikovala raven miR-224-5p ( $p < 0,001$ ), miR-191-5p ( $p < 0,001$ ) in miR-337-3p ( $p = 0,001$ ), pri čemer je bila pri bolnikih raven miR-224-5p in miR-337-3p zvišana, miR-191-5p pa znižana. Raven miR-483-5p se med bolniki in kontrolami ni značilno razlikovala ( $p = 0,700$ ). Zanimivo je, da se je med placebo obdobjem raven miR-191-5p statistično značilno znižala ( $p < 0,001$ ), medtem ko se je po zdravljenju z zaviralci PCSK9 statistično značilno zvišala ( $p = 0,007$ ). Prav tako se je po zdravljenju zvišala tudi raven miR-483-5p ( $p = 0,008$ ).

Z raziskavo smo dokazali, da se raven nekaterih miRNA razlikuje med bolniki in kontrolnimi preiskovanci ter, da se po zdravljenju z zaviralci PCSK9 raven dveh miRNA spremeni. V nadaljevanju bomo določili tudi koncentracijo PCSK9, kar nam bo dalo boljši vpogled v mehanizem delovanja teh miRNA.

## Priprava novega klonirnega vektorja s pozitivno selekcijo

Bor Krajnik, Marko Dolinar

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo*

Mentor: prof. dr. Marko Dolinar

Pri pripravi gensko spremenjenih bakterij najpogosteje uporabimo vektorsko molekulo (običajno plazmid), v katero vstavimo tujo DNA, ki jo želimo klonirati. Pri tem se lahko zgodi, da bakterije sprejmejo vektor brez vključka, česar si ne želimo.

Načinov, kako razlikovati med bakterijami, ki so sprejele željeno DNA, je več, eden izmed njih je pozitivna selekcija. Pri tem postopku uporabimo plazmid, ki vsebuje zapis za protein, ki je za bakterije toksičen (npr. nukleaza). V plazmidu je ta zapis pod konstitutivnim promotorjem, kar pomeni, da se stalno izraža in s tem onemogoča celično rast. Če pride do uspešne vstavitve gena v tak plazmid, se zapis za toksični protein prekine ali izreže in s tem se njegova toksičnost izniči. Bakterije, ki zrastejo, z veliko verjetnostjo v plazmidu vsebujejo željeno DNA.

Toksini, uporabljeni v takih plazmidih, so pogosto iz skupine prokariontskih genetskih elementov, ki se imenujejo sistemi toksin-antitoksin (TAS). TAS so sestavljeni iz dveh delov, toksina in antitoksina. Ko se ta dva gena izrazita, se toksin in antitoksin povežeta v kompleks, ki ni toksičen. V procesu delitve hčerinska celica podeduje komplekse toksin-antitoksin, če pa ne podeduje tudi plazmida, na katerem sta ta dva proteina zapisana, se antitoksin, ki je manj stabilen od toksina, razgradi, kar iz kompleksa sprosti toksin in uniči celico.

Želeli smo pripraviti plazmid s pozitivno selekcijo z uporabo toksina IPF\_1065 iz cianobakterije *Microcystis aeruginosa*. Na podlagi strukturne homologije ga uvrščamo v naddružino RelE/ParE. Toksini iz te naddružine inhibirajo DNA-girazo oziroma cepijo RNA ali DNA. Ni znano, po katerem od teh mehanizmov deluje IPF\_1065, je pa dokazano toksičen za bakterije *E. coli*.

Za ogrodje novega plazmida smo izbrali plazmid pSB1C3, ki je že vseboval konstitutivni promotor, pod katerega smo nameravali vnesti zapis za toksin. Ker smo hoteli novi plazmid namnožiti v *E. coli*, smo hkrati s plazmidom, ki je zapisoval toksin, v celice z elektroporacijo vnesli še dodaten plazmid, ki je vseboval zapis za antitoksin. Pri tem smo pazili, da sta plazmida med seboj kompatibilna in vsak zapisuje za odpornost proti drugemu antibiotiku.

## Analiza alternativne poliadenilacije gena *Habp4* v hipotalamusu vitke in debele linije miši

Špela Mikec<sup>1</sup>, Zihua Jiang<sup>2</sup>, Simon Horvat<sup>1</sup>, Tanja Kunej<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

<sup>2</sup> Washington State University, Pullman WA, ZDA

Mentorji: prof. dr. Tanja Kunej, prof. dr. Simon Horvat, prof. dr. Zihua Jiang

Naraščanje debelosti je povzročilo porast z debelostjo povezanih kroničnih bolezni. Poleg vpliva okoljskih dejavnikov, kot so energetsko bogata prehrana, sedeči življenjski slog in nizka telesna dejavnost, ima pri epidemiji debelosti pomembno vlogo tudi genetsko ozadje. Debelost je zaradi svoje poligene in večfaktorske narave najboljše preučevati pri poligenih živalskih modelih, kot sta debela (angl. Fat line, F) in vitka (angl. Lean line, L) linija miši, ki sta bili vzpostavljeni z dolgotrajno dvosmerno selekcijo na delež telesne maščobe. Predstavljata edinstvena modela za poligeno debelost, ki je pri človeku tudi najpogostejša. Različna bolezenska stanja so že bila povezana z mehanizmi, ki sodelujejo pri prepisovanju iz DNA v RNA. Med njimi je tudi poliadenilacija (PA), kjer pride do cepitve in dodajanja repa poli-A na 3'-konec nastajajočega prepisa. Mesto PA določa dolžino prepisa in s tem stabilnost in lokalizacijo mRNA ter učinkovitost prevajanja in zvitja končnega proteina. Večina genov vsebuje več kot eno mesto PA, kar imenujemo alternativna poliadenilacija (APA). Spada med glavne mehanizme genske regulacije, saj nastanejo prepisi z različnimi 3'-konci, ki lahko vplivajo na tkivno in časovno specifičnost izražanja. V naši raziskavi smo zato z metodo sekvenciranja mest zaključka transkripcije na ravni celotnega transkriptoma (angl. whole-transcriptome termini site sequencing, WTTS-seq) določili mesta PA v hipotalamusu liniji miši F in L in določili diferencialno izražena mesta PA (DE-PA). Odkrili smo več kot 400 mest DE-PA, ki se značilno diferencialno izražajo pri liniji F, v primerjavi z linijo L. Od tega se pri okoli 20 genih uporablja več kot eno mesto PA, kar vodi do nastanka različnih dolžin prepisov. Izmed teh izpostavljamo gen *Habp4* (angl. hyaluronic acid binding protein 4), ki kodira RNA-vezavni protein z vlogo regulacije prepisovanja, procesiranja in prevajanja mRNA. Vsebuje dve mesti DE-PA, eno intronsko in eno v 3' neprevedeni regiji (3' UTR). Krajši prepis je povišano izražen v hipotalamusu linije L in nastane ob uporabi mesta PA v četrtem intronu, medtem ko se pri liniji F povišano izraža daljši prepis, ki nastane zaradi poliadenilacije v 3'UTR. V nadaljnjih funkcionalnih raziskavah bomo preverili vpliv APA gena *Habp4* na nalaganje maščobe ter razvoj debelega ali vitkega fenotipa pri F ali L liniji miši.

## Identifikacija nove mutante LacI, ki slabše veže induktor IPTG

Urška Rupar, Anja Pavlin, Gregor Bajc, Matej Butala, Zdravko Podlesek

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Mentor:izr. prof. Matej Butala

Gp1 je mali protein bakteriofaga GIL01 in eden od regulatorjev, ki uravnavajo prepis bakteriofagnih zgodnjih genov in s tem vzdržujejo lizogeni cikel bakteriofaga GIL01 v bakteriji *Bacillus thuringiensis*. Za analizo njegove funkcije smo gp1 želeli izolirati v rekombinantni obliki z eskpresijskim sistemom seva M15 bakterije *Escherichia coli*. Ta sistem uporablja protein LacI kot represor prepisa genov rekombinantnih proteinov, ki jih uvedemo na plazmid. Protein LacI je eden najboljše preučenih proteinov in je represor laktoznega operona bakterije *E. coli*, ki nosi zapis za gene potrebne za prenos in presnovo laktoze. V odsotnosti alolaktoze, izomera laktoze, je LacI tesno vezan na laktozni operator, s čimer preprečuje vezavo RNA polimeraze. Disociacijo LacI iz DNA sproži izomer laktoze, alolaktoza, ali njen analog izopropil  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid, ki z vezavo na LacI povzročita konformacijsko spremembo LacI, kar vodi do sprostitve represorja s promotorskega področja in prepis genov laktoznega operona oz. rekombinantnih proteinov v eskpresijskem sistemu *E. coli* M15. Ob indukciji sinteze rekombinantnega gp1 v bakteriji *E. coli* smo opazili, da je protein toksičen. S sekvenciranjem DNA smo ugotovili, da tiste redke bakterije, ki preživijo, nosijo gen za mutiran represor LacI z do sedaj še neopisano mutacijo. Mutanta LacI je imela na 194. mestu aminokislinski ostanek alanin zamenjan z valinom. Omenjena mutacija se nahaja blizu vezavnega mesta za alolaktozo/IPTG, zato smo sklepali, da mutacija inhibira vezavo IPTG na LacI(A194V) in s tem prepreči derepresijo gena za toksični protein gp1. Za potrditev hipoteze smo izolirali nemutirano in mutirano (LacI(A194V)) različico proteina LacI. Z refraktometrom, ki temelji na površinski plazmonske resonanci, smo nato preverili vpliv IPTG na protein LacI in LacI(A194V) vezanega na operatorsko mesto. Opazili smo, da je dodatek IPTG povzročil večjo disociacijo nativnega proteina kot njegove mutante. Iz tega lahko sklepamo, da IPTG v *E. coli* ni zadosten za derepresijo proteina LacI(A194V) iz promotorskega področja gena za rekombinantni protein gp1, kar bakteriji omogoči preživetje. Naši rezultati opišejo novo mutanto LacI, ki slabše veže induktor IPTG.

## Iskanje sistemov toksin-antitoksin tipa I v cianobakteriji *Microcystis aeruginosa* PCC 7806

Matija Ruparčič, Marko Dolinar

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: prof. dr. Marko Dolinar

Sistemi toksin-antitoksin (TA) so genetski elementi, ki vsebujejo zapis za stabilen toksin, ki z različnimi mehanizmi zavira celične procese in s tem povzroči zastoj rasti oziroma celično smrt, in za relativno nestabilen antitoksin, ki v fizioloških pogojih zavira delovanje toksina. Prisotni so na številnih plazmidih in kromosomih bakterij in arhej ter opravljajo različne funkcije. Plazmidni TA zagotavljajo ohranitev plazmida skozi generacije (če se med delitvijo izgubi, hčerinska celica umre), kromosomski pa sodelujejo pri odgovoru celice na stresne pogoje. Glede na strukturo in delovanje jih delimo na osem tipov.

Pri sistemu toksin-antitoksin tipa I je toksin kratek hidrofoben protein, ki je v večini primerov transmembranski, lahko pa je tudi citosolni. Transmembranski toksini tipa I delujejo na dva možna načina: (1) tvorijo pore, skozi katere uhajajo protoni, kar poruši protonski gradient in s tem ustavi proces dihalne verige, ali (2) sprožijo kondenzacijo bakterijske DNA, kar ustavi izražanje genov. Citosolni toksini tipa I so encimi, ki nespecifično režejo DNA ali RNA in s tem poškodujejo bakterijski kromosom ter ovirajo izražanje genov. Antitoksin tipa I je protismerna RNA, ki se komplementarno veže na mRNA toksina in s tem prepreči sintezo toksina ter stimulira razgradnjo nastale dvoveržne RNA z RNazami.

Naš cilj je poiskati sisteme toksin-antitoksin tipa I v cianobakteriji *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 in jih okarakterizirati. Ta cianobakterija je pomembna, ker v stoječih sladkih vodah lahko povzroča cvetenje, ob čemer izloča strupene peptide, ki škodijo ostalim organizmom. Doslej niso opisali še nobenega sistema TA tipa I v tej cianobakteriji. Glede na to, da bioinformacijski orodji TAFinder in TASmania v omenjeni cianobakteriji nista napovedali sistemov TA tipa I, verjamemo pa, da obstajajo, smo kandidatne TA v podatkovnih bazah iskali ročno, z uporabo parametrov, ki so značilni za tip I.

Izbrali smo šest kandidatnih parov, ki imajo po lastnostih največjo verjetnost, da predstavljajo sistem TA tipa I, jih pomnožili iz genoma PCC 7806 in vstavili v ekspresijske vektorje. Za pozitivno kontrolo smo vzeli že znana toksin SrnB in antitoksin SrnC, ki sta zapisana na plazmidu F bakterije *Escherichia coli*.

V nadaljevanju bomo kandidatne toksine prekomerno izrazili in spremljali njihov vpliv na rast celic *E. coli*. V primeru toksičnosti bomo nato skupaj s toksinom izrazili še kandidatni antitoksin, pri čemer pričakujemo zaustavitev delovanja toksina in s tem normalno rast celic. Tako bi potrdili, da gre za funkcionalni par TA tipa I.



## Priprava skrajšanih oblik človeškega proteina FHL2 za ugotavljanje vloge posameznih domen v interakcijah z drugimi proteini

Luka Šegota, Aljaž Gaber

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Mentor: doc. dr. Aljaž Gaber

Protein Four-and-a-half LIM domain protein 2 (FHL2) je predstavnik družine proteinov, ki so sestavljeni le iz domen LIM, poimenovanih po proteinih LIN-11, ISL-1 in MEC-3, v katerih je bila domena sprva opisana. Za posamezno LIM domeno je značilno, da je sestavljena iz dveh cinkovih prstov, ki določata njeno zvitje.

FHL2 je udeležen v signalnih poteh, povezanih s proliferacijo, apoptozo, adhezijo, migracijo celic in epiteljsko-mezenhimskim prehodom. Interagira s številnimi proteini, od komponent citoskeleta do membranskih receptorjev in transkripcijski faktorjev. Deluje kot adapterski protein, saj mu več domenska sestava omogoča da povezuje različne proteine med sabo. Eden izmed njegovih interakcijskih partnerjev je tudi  $\beta$ -katenin, ključni protein pri signalni poti Wnt, ki je pomembna pri embrionalnem razvoju in razvoju rakavih obolenj. Mehanizem delovanja FHL2 in način povezovanja z ostalimi proteini je slabo raziskan.

Z namenom, da bi lažje okarakterizirali vlogo posameznih domen pri interakcijah z ostalimi proteini, smo poleg celotnega proteina FHL zasnovali knjižnico 14-ih skrajšanih oblik, ki vsebujejo le eno (LIM0, LIM1, LIM2, LIM3, LIM4), dve (LIM0-1, LIM1-2, LIM2-3, LIM3-4), tri (LIM0-2, LIM1-3, LIM2-4) ali štiri domene (LIM0-3, LIM1-4). Za lažje izražanje in analizo interakcij z ostalimi proteini smo na N-konec skrajšanih oblik dodali še zeleni fluorescenčni protein (sfGFP), ki ga je mogoče tudi odcepiti s proteazo TEV. Zapise smo sestavili z metodo PCR in vstavili v tarčni plazmid pET-32b z od ligacije neodvisnim kloniranjem brez nastanka brazde z uporabo bakterijskih ekstraktov (SLiCE) ter izrazili v bakterijskih celicah *E.coli* BL21[DE3].

Postopek izražanja in čiščenja proteinov je bil enak že prej optimiziranemu postopku za izražanje celotnega proteina.

Interakcijo posameznih domen s proteinom  $\beta$ -katenin smo analizirali s kromatografijo z ločevanjem po velikosti, ki je bila sklopljena z detektorjem za analizo statičnega sipanja laserske svetlobe pri majhnem in pravem kotu (LALS/RALS) in določili, katere domene so neposredno udeležene v interakcijo. S tako pripravljeno knjižnico bo mogoče na podoben način opisati tudi vlogo domen pri interakciji proteina FHL2 z ostalimi interakcijskimi partnerji, kar bo doprineslo k razumevanju mehanizma delovanja FHL2 v bioloških procesih.

## Kloniranje, izražanje in izolacija proteina TDP-43 in njegovih mutantov

Maruša Sernc, Vera Župunski

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Mentorica: doc. dr. Vera Župunski

TDP-43 ali TAR DNA vezavni protein je 43 kDa velika molekula, ki se pri fizioloških pogojih nahaja pretežno v jedru celic, skoncentriran na področju evkromatina, kjer sodeluje pri aktivni transkripciji genov. Gre za RNA vezavni protein, ki sodeluje v vseh korakih procesiranja RNA, poleg tega še regulira stabilnost RNA, sodeluje pri transportu RNA z mikrotubuli in pri tvorbi stresnih granul. Protein je sestavljen iz urejene N-končne domene, zanke, ki predstavlja jedrni lokalizacijski signal, dveh RNA prepoznavnih domen imenovanih RRM1 in RRM2 ter neurejene, z glicinom bogate C-končne domene.

Leta 2006 so odkrili, da je TDP-43 povezan z nastankom nekaterih nevrodegenerativnih bolezni kot je amiotrofična lateralna skleroza, frontotemporalna demenca,.... V primeru teh bolezni protein potuje iz jedra v citoplazmo, kjer tvori agregate, večinoma v hiperfosforilirani in poliubikvitinirani obliki.

Ključna težava pri proučevanju TDP-43 *in vitro* je njegova nestabilnost. Protein je namreč zelo težko izolirati v topni obliki, saj je podvržen takojšnji agregaciji. Rešitev predstavlja izolacija proteina skupaj s fuzijskim partnerjem, ki zraven pomoči pri zvijanju omogoča tudi čiščenje s pomočjo kromatografije. V predhodnih raziskavah so ugotovili, da je TDP-43 v stabilnem kompleksu s fuzijskimi proteini, če le te dodamo na N-končni, urejeni strani, medtem ko vezava na C-konec ni bila uspešna. Izjemo predstavlja maltoza vezavni protein (MBP), ki je s TDP-jem tvoril stabilnejše konstrukte na C-koncu.

Tovrstno ugotovitev smo tudi sami potrdili. Sklonirali smo dva različna konstrukta TDP-43 – MBP vstavljena v vektor pMCSG7, kjer je v prvem primeru MBP na N-koncu TDP-43, v drugem primeru pa na C-koncu. Po izražanju in izolaciji smo dobili pričakovane rezultate v drugem primeru, torej vezavi MBP na C-konec TDP-43. Fuzijski protein je ostal v topni obliki tudi med shranjevanjem pri 4°C, saj nismo opazili agregacije ali znižanja koncentracije. Po izolaciji fuzijskega proteina MBP-TDP-43 pa nismo dobili želenih rezultatov. Po izolaciji z Ni-afinitetno kromatografijo tega proteina nismo zaznali na NaDS poliakrilamidnem gelu pri ustrezni velikosti, prav tako je bilo na gelu videti več lis, zaradi česar smo sklepali na razgradnjo proteina.

Po izolaciji divje oblike smo poskusili klonirati in izolirati še štiri različne mutante proteina, od katerih ima eden mutacije na C-koncu, drugi na N-koncu, tretji ima v zapisu odstranjeno regijo RRM2, pri zadnjem pa se mutacije nahajajo na 301. in 307. aminokislinskem ostanku. Po enakem postopku kot za divji tip smo tudi mutirane zapise vstavili v vektor skupaj z zapisom za MBP, prav tako v dveh različnih verzijah; enkrat je bil zapis za MBP na C-koncu, drugič na N-koncu mutiranega *TARDBP*. Zaenkrat smo uspešno izolirali zadnjega izmed zgoraj naštetih mutantov. Ideje za nadaljnje raziskave so izolacije vseh štirih mutiranih variant v čisti obliki in izvedba agregacijskih testov, kjer bi primerjali obnašanje mutiranih variant in nemutirane oblike.

Tovrstne in nadaljnje raziskave bi lahko pripomogle pri analizi mehanizma agregacije proteina TDP-43 in njegovih mutiranih oblik, ki so relevantne za nevrodegenerativne bolezni.

## **Analiza genetske variabilnosti mišjih linij za poligeno debelost in vitkost nakazuje mmu-mir-3086-3p kot potencialnega kandidata vpletenega v razvoj debelosti**

Martin Šimon, Špela Mikec, Simon Horvat, Tanja Kunej

*Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko*

Mentorja: prof. dr. Tanja Kunej, prof. dr. Simon Horvat

Debelost, ki je med mnogimi smatrana kot epidemija enaindvajsetega stoletja, je plod neravnovesja med vnosom energije preko hrane in njeno porabo, ter genetske predispozicije. Povezana je z nastankom nekaterih drugih bolezni kot so na primer diabetes, srčni infarkt, možganska kap in različne vrste raka. Analiziranje genoma modelnih organizmov se pogosto uporablja za razumevanje kompleksnih bolezni kot je tudi poligena oblika debelosti. V tej raziskavi smo s pomočjo sekvenciranja celotnega genoma (whole-genome sequencing – WGS) analizirali genom unikatnih mišjih linij za poligeno debelost in vitkost, ki sta bili vzpostavljeni z divergentno selekcijo na delež telesne maščobe preko več kot šestdeset generacij. Skupno je v linijah prisotnih več kot šest milijonov polimorfizmov posameznega nukleotida (SNP), od tega več kot milijon takih, ki predhodno še niso bili opisani. Razlike v nukleotidnem zaporedju se med linijama nahajajo v več kot 24000 genih, med katerimi so tudi geni, katerih izbijte (knock-out) vpliva na količino maščobnega tkiva (International Mouse Phenotype Consortium). Največje število SNP-jev je pri obeh linijah prisotnih v protein-kodirajočih genih, drugače pa je v primeru gostote SNP-jev, saj je le-ta najvišja v psevdogenih ter različnih regulatornih RNA. Med slednjimi smo pri vitki liniji identificirali SNP znotraj mikro RNA (miRNA) mmu-mir-3086-3p, in sicer znotraj ključne sekvence (regije "seed") za prepoznavo tarčnih genov. Primerjalna analiza obogatitve genskega nabora tarčnih genov za mmu-mir-3086-3p ter novo-nastale miRNA je pokazala razlike v številnih bioloških procesih in metabolnih poteh, kot so redoks homeostaza, sinteza hormonov, metabolizem sladkorjev in dušika, izločanje žolčne kisline in regulacija transkripcije. Rezultati kažejo na pomembne razlike v genomih preučevanih linij, kar predstavlja edinstven vir za nadaljnje študije o povezanosti identificiranih SNP-jev z dovzetnostjo in odpornostjo na razvoje debelosti. Poleg tega analiza za mmu-mir-3086-3p nakazuje na njeno morebitno vlogo, kar bi bilo potrebno preveriti v nadaljnjih funkcionalnih študijah.

## Izzivi pri kloniranju in izražanju človeškega katepsina F

Tea Sinožič<sup>1,2</sup>, Veronika Stoka<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Oddelek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo, Institut »Jožef Stefan«

<sup>2</sup> Doktorski študijski program biomedicine, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

<sup>3</sup> Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana

Mentorica: dr. Veronika Stoka

Katepsin F je lizosomska cisteinska proteaza z edinstvenimi strukturnimi in biokemičnimi lastnostmi v primerjavi z drugimi človeškimi cisteinskimi katepsini. Celotno dvajset let po njegovem odkritju številne njegove strukturne in funkcionalne lastnosti ostajajo nerešene zaradi težav pri pridobivanju zadostnih količin čistega proteina.

V prejšnjih študijah so bili različni fragmenti človeškega katepsina F izraženi v *E. coli*, *P. pastoris*, celičnih linijah sesalcev in bakulovirusnem ekspresijskem sistemu. Vendar je bil v teh študijah encim pridobljen v razcepljeni obliki, neaktiven in/ali samo v analitskih količinah, ki niso zadostovale za njegovo nadaljnjo karakterizacijo.

Zato je bil bioinformatični pristop, ki temelji na zaporedju, ključen za oceno primernosti proteina divjega tipa od kloniranja do določitve 3D strukture z rentgensko kristalografijo. Omeniti velja, da naš sistematični pristop prvič kaže ozka grla, ki so preprečila prejšnje poskuse pridobivanja tega proteina z uporabo različnih strategij in/ali sistemov izražanja.

Sprva smo ovrednotili standardne pristope, kot sta tradicionalno kloniranje in kloniranje neodvisno od ligacije, ter naknadno izražanje v *E. coli*, vendar žal v našem primeru to še ni prineslo uspeha. Karkoli smo z uporabo novega alternativnega pristopa brezceličnega proteinskega ekspresijskega sistema uspeli dobiti humani katepsin F divjega tipa v zadostnih količinah za njegovo nadaljnjo karakterizacijo.

## Racionalno načrtovanje in priprava dimernih variant človeških katepsinov B in S

Timotej Sotošek, Erik Putar, Ana Obaha, Marko Novinec

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

Mentorja: izr. prof. dr. Marko Novinec, Ana Obaha, mag. biokem

Večina celičnih proteinov je oligomerov.<sup>1</sup> Oligomerni proteini imajo namreč manjšo topilo dostopno površino kot monomeri, s tem pa se poveča njihova stabilnost.<sup>1</sup> Hkrati lahko z oligomerizacijo zvišamo lokalno koncentracijo aktivnih mest in tako izboljšamo aktivnost encima.<sup>1</sup> Kljub pogostosti oligomernih proteinov, sta katepsina B in S, pripadnika papainu podobnih cisteinskih proteaz, monomera. V sklopu naše raziskovalne naloge smo zato z uvedbo substitucijskih mutacij na površini katepsinov B in S poskusili inducirati njuno homodimerizacijo.

Namen našega dela je bil z uporabo javno dostopnih bioinformatičnih orodij napovedati stabilne homodimerne komplekse katepsinov S in B ter računalniške napovedi eksperimentalno ovrednotiti.

Potencialna interakcijska mesta na površini encimov smo identificirali s programom SPPIDER.<sup>2</sup> Identificiranih regij, ki se prekrivajo z aktivnim mestom, nismo upoštevali. Z orodjem HADDOCK<sup>3</sup> smo nato generirali različne homodimerne konfiguracije in izmed vseh izbrali tisto, ki je bila glede na velikost zakopane površine in napovedane energije interakcije najboljša. Izbrani model dimera smo nato kot vhodno informacijo vnesli v orodje BeAtMusic.<sup>4</sup> Ta nam je predlagal hidrofobne točkovne mutacije znotraj interakcijske površine, ki bi izboljšale stabilnost dimera. Izbrali smo najbolj primerno substitucijo ter na njeni podlagi z uporabo programa SWISS-MODEL<sup>5</sup> generirali novi model mutantnega monomera. Vse korake smo iterativno ponovili še za dve dodatni mutaciji, tako da smo na koncu dobili mutantni obliki vsakega proteina s po tremi hidrofobnimi substitucijami na površini. Končna modela smo dodatno analizirali še s simulacijami molekulske dinamike s programom NAMD<sup>6</sup>, ki so pokazale, da ne prihaja do ločevanja podenot. Načrtovane mutacije smo v zapisa za oba prokatepsina uvedli z mestno-specifično mutagenozo in tako dobili varianti prokatepsina S (E112Y, P188W, K190W) in prokatepsina B (H124W, N228F, K245W). Proteina bomo v nadaljevanju poskušali izraziti v topni obliki v bakteriji *E. coli* ter izolirati z Ni-afinitetno kromatografijo. Rekombinantna prokatepsina bomo nato aktivirali *in vitro* in določili njune osnovne kinetične parametre. Z gelsko izključitveno kromatografijo bomo na koncu še preverili ali so posamezne mutantne oblike res prisotne kot dimeri.

1. S. Goodsell, D. & J. Olson, A. Structural Symmetry and Protein Function. (2000)
2. A. Porollo, J. Meller Prediction-based Fingerprints of Protein-Protein Interactions, *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* (2007) 66: 630-45.
3. R.V. Honorato, P.I. Koukos, B. Jimenez-Garcia, A. Tsaregorodtsev, M. Verlatto, A. Giachetti, A. Rosato and A.M.J.J. Bonvin (2021). "Structural biology in the clouds: The WeNMR-EOSC Ecosystem." *Frontiers Mol. Biosci.*, 8, fmlb.2021.729513.
4. Dehouck, Y., Kwasigroch, J. M., Rooman, M. & Gilis, D. BeAtMuSiC: Prediction of changes in protein-protein binding affinity on mutations. *Nucleic Acids Res.* **41**, 333–339 (2013).
5. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **46**, W296-W303 (2018).
6. James C. Phillips, David J. Hardy, Julio D. C. Maia, John E. Stone, Joao V. Ribeiro, Rafael C. Bernardi, Ronak Buch, Giacomo Fiorin, Jerome Henin, Wei Jiang, Ryan McGreevy, Marcelo C. R. Melo, Brian K. Radak, Robert D. Skeel, Abhishek Singharoy, Yi Wang, Benoit Roux, Aleksei Aksimentiev, Zaida Luthey-Schulten, Laxmikant V. Kale, Klaus Schulten, Christophe Chipot, and Emad Tajkhorshid. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *Journal of Chemical Physics*, 153:044130, 2020. doi:10.1063/5.0014475

## **MAGEL2 in njegovi partnerji pri sindromih Prader-Wili in Shaaf-Yang**

Denis Štepihar<sup>1,2</sup>, Klementina Fon Tacer<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

<sup>2</sup> Texas Tech University, School Of veterinary medicine, Amarillo, Texas, ZDA

Mentorica: dr. Klementina Fon Tacer

Na molekularni ravni proteini vršijo svoje funkcije preko interakcij z drugimi proteini. Le-te pa se lahko popolnoma porušijo ali spremenijo, kadar so geni, ki nosijo zapis za dotične proteine, mutirani, kar vodi v različna bolezenska stanja. Delecija ali mutacija gena *MAGEL2* povzročita nastanek dveh sorodnih sindromov, Prader-Willi sindrom (PWS) ali sindrom Schaaf-Yang (SYS). PWS in SYS sta multi-sistemski razvojni motnji, katere glavni znaki so ohlapnost, nizka rast, kognitivne motnje, nepopolen spolni razvoj, vedenjske motnje, kronična lakota in posledična življenje-ogrožajoča debelost. Vse to zelo prizadane tako otroka kot celotno družino. Do sindroma pride zaradi okvare 15. kromosoma, bodisi delecije regije 15q11.2-q13 ali mutacije samega gena *MAGEL2*, ki je eden izmed 6 kodirajočih genov v tej regiji. Nefunkcionalni *MAGE-L2* je eden izmed ključnih genov, odgovornih za nastanek sindromov, vendar njegovo molekularno delovanje šele začnemo spoznavati. Da bi dobili prvi vpogled v fiziološko vlogo *MAGEL2*, želimo najprej ugotoviti vezavne partnerje proteina *MAGEL2* v možganih, kjer je ta protein predvsem izražen. V ta namen želimo uporabiti pred nedavnim razvita specifična protitelesa proti mišjemu proteinu Magel2 in izvesti imunoprecipitacijo Magel2 in njegovih vezavnih partnerjev iz tkivnega lizata specifičnih delov mišjih možganov. Namen tega dela je bil optimizirati protokol imunoprecipitacije od sestave pufra (različen detergent, koncentracija soli, pH), postopka homogenizacije tkiva (sonifikacija, s strižnim silam) in poteka imunoprecipitacije (čas inkubacije, protitelo). Uspešnost imunoprecipitacije smo preverili s prenosom po Westernu, kjer smo dokazali prisotnost proteina Magel2. Proteine, ki so bili vezani na Magel2 pa bomo identificiral z nadaljno analizo z masno spektrometrijo. Z našimi rezultati bomo prvič analizirali vezavne partnerje v fiziološkem okolju, kar bo ključno prispevalo k nadaljnem razumevanju patogeneze PWS in SYS in razvoja zdravil za zdravljenje teh simptomov.

## Vpliv genetske variabilnosti matriksnih metaloproteinaz na razvoj in odgovor na zdravljenje pri Parkinsonovi bolezni

Jan Travnšek<sup>1</sup>, Maja Trošt<sup>1,2</sup>, Katja Goričar<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

<sup>2</sup> Klinični oddelek za bolezni živčevja, UKC Ljubljana

<sup>3</sup> Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko

Mentorici: doc. dr. Katja Goričar, univ. dipl. biokem., izr. prof. dr. Maja Trošt, dr. med

Parkinsonova bolezen (PB) je druga najpogostejša nevrodegenerativna bolezen možganov in je do danes kljub napredkom v zdravljenju neozdravljiva. Matriksne metaloproteinaze so skupina endopeptidaz, ki vplivajo na številne celične procese, tudi pri PB. Genetski polimorfizmi lahko spremenijo njihovo delovanje ali izražanje in bi tako lahko vplivali na potek PB in njene klinične značilnosti. V raziskavi smo želeli preveriti, ali so pogosti funkcionalni polimorfizmi v genih *MMP2* in *MMP9* povezani z razvojem PB, kliničnimi znaki in odgovorom na dopaminergično zdravljenje.

V retrospektivno raziskavo primerov s kontrolami smo vključili 231 bolnikov s PB in 161 zdravih krvodajalcev. Polimorfizme genov *MMP2* in *MMP9* smo določali s kompetitivnim alelnim specifičnim PCR. Z logistično regresijo smo analizirali povezavo med izbranimi polimorfizmi in tveganjem za razvoj PB, kliničnimi simptomi PB ter neželenimi učinki zdravljenja.

Noben preučevani polimorfizem ni statistično značilno vplival na razvoj PB, niti po prilagoditvi za spol in starost ( $p > 0,05$ ). Polimorfizem *MMP9* rs17576 je bil v univariatni analizi statistično značilno povezan z večjim tveganjem za kognitivni upad (RO = 1,91, 95 % IZ = 1,04–3,33,  $p = 0,036$ ). Polimorfizem *MMP9* rs20544 je bil statistično značilno povezan s pogostejšim pojavom kognitivnega upada (RO = 2,41, 95 % IZ = 1,06–5,45,  $p = 0,035$ ), tudi po prilagoditvi za starost ob diagnozi (RO = 2,65, 95 % IZ = 1,15–6,09,  $p = 0,022$ ). Polimorfizem *MMP2* rs243865 je bil statistično značilno povezan z redkejšim pojavom zaprtja (RO = 0,55, 95 % IZ = 0,31–0,97,  $p = 0,039$ ). Noben polimorfizem ni bil povezan s pojavom depresije, motnje faze spanja REM ali izgube voha ( $p > 0,05$ ). Prav tako noben polimorfizem ni bil povezan s pojavom neželenih učinkov dopaminergičnega zdravljenja PB ( $p > 0,05$ ).

Polimorfizma *MMP9* rs17576 in rs20544 sta bila povezana z večjim tveganjem za kognitivni upad pri bolnikih s PB. Polimorfizem *MMP2* rs243865 je bil povezan s pojavom zaprtja pri bolnikih s PB. Naša raziskava predstavlja prispevek k boljšemu razumevanju vloge matriksnih metaloproteinaz pri PB in bi v prihodnosti lahko pomagala pri identifikaciji novih bioloških označevalcev pri PB.

## Vpliv glukoze in z AMP aktivirane protein kinaze na izražanje podenot Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaze v skeletnomišičnih celicah

Anja Vidovič<sup>1</sup>, Alexander V. Chibalin<sup>2</sup>, Sergej Pirkmajer<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

<sup>2</sup> Oddelek za molekularno medicino in kirurgijo, Karolinska institutet, Stockholm, Švedska

Mentor: doc. dr. Sergej Pirkmajer, dr. med.

Sladkorna bolezen (*diabetes mellitus*) je povezana z motnjami v delovanju Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaze (NKA). NKA, ki jo imenujemo tudi natrij-kalijeva črpalka, je heterodimeren ( $\alpha/\beta$ ) membranski proteinski kompleks, ki ob porabi ATP omogoča prenos treh Na<sup>+</sup> ionov iz celice in dveh K<sup>+</sup> ionov v celico, s čimer vzdržuje ionsko ravnovesje. Pri sladkorni bolezni k zvišanju ravni krvnega sladkorja (glukoze) pomembno prispeva moteno delovanje presnove v skeletnih mišicah. Vprašali smo se, ali bi krvna koncentracija glukoze v skeletnih mišicah lahko vplivala na izražanje podenot NKA  $\alpha$  in  $\beta$  in proteinov FXYD, ki uravnavajo delovanje NKA.

Želeli smo določiti: (1) ali različna koncentracija glukoze vpliva na izražanje specifičnih izooblik podenot NKA ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  in  $\beta 1-3$ ) ali FXYD1 in FXYD5; (2) ali z AMP aktivirana protein kinaza (AMPK), ki je celični energijski senzor, predstavlja povezavo med razpoložljivostjo glukoze in izražanjem podenot NKA ali proteinov FXYD.

Poskuse smo izvedli na standardnih modelih, ki se uporabljajo za raziskave skeletnih mišic *in vitro*: podganje skeletnomišične celične linije L6 in primarne kulture človeških skeletnomišičnih celic. Izražanje podenot NKA in proteinov FXYD smo ocenili z uporabo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) in odtisom western. Za merjenje fosforilacije proteinov smo uporabili odtis western. Za oceno vloge AMPK pri uravnavanju NKA smo izvedli utišanje genov.

V človeških skeletnomišičnih celicah je bilo izražanje NKA $\alpha 1$  mRNA v odsotnosti glukoze nižje kot pri normalni (1 g/L) ali zvečani (4,5 g/L) koncentraciji glukoze. Nasprotno se je izražanje NKA $\alpha 2$  mRNA v odsotnosti glukoze povečalo, medtem ko je izražanje FXYD1 in FXYD5 mRNA ostalo nespremenjeno. Pri celicah L6 je pomanjkanje glukoze zavrlo izražanje podenot NKA ( $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ) in FXYD1, raven NKA $\alpha 1$  mRNA pa je ostala nespremenjena. Ob tem se je raven proteina NKA $\alpha 2$  povečala. Pomanjkanje glukoze je aktiviralo AMPK, medtem ko je gensko utišanje katalitičnih podenot AMPK $\alpha 1$  in AMPK $\alpha 2$  v celicah L6 zmanjšalo količino proteina NKA $\alpha 2$ .

Ugotovili smo, da koncentracija glukoze in utišanje genov AMPK $\alpha 1/\alpha 2$  vplivata na izražanje podenot NKA v skeletnomišičnih celicah *in vitro*. Naši rezultati nakazujejo možen vpliv glukoze in AMPK na delovanje NKA v skeletnih mišicah pri sladkorni bolezni.



## Vpliv abiotskega in biotskega stresa na vsebnost kapsaicinoidov v čilijih

Tilen Zamljen, Ana Slatnar

*Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za sadjarstvo, vinogradništvo in vrtnarstvo*

Mentorica: izr. prof. Ana Slatnar

Čiliji izvirajo iz tropskih predelov sveta, zato so bolj dovzetni za vplive podnebnih sprememb, katere v kmetijstvu povzročajo velike izgube zaradi velikih vremenskih nihanj. Za gojenje čilijev v Sloveniji, je potrebna dovolj visoka temperatura, zadostna količina vode in hranil. Z namenom doseganja ustreznih temperaturnih razmer za rast čilije gojimo v rastlinjakih. V rastlinjakih čilije oskrbujemo z zadostno količino vode, saj naravnih padavin v rastlinjaku ni. Neprimerna agrotehnična oskrba v rastlinjaku, pri gojenih rastlinah hitreje privede do stresnega stanja, bodisi kot so suša, slanost (abiotske) ali hitra razmnožitev škodljivcev in širjenje bolezni (biotske). Rastline čilijev se odzovejo na stresne razmere na različne načine, od molekularnih do fizioloških. V primeru molekularnih odzivov so ti na nivoju metabolizma (primarni in sekundarni metaboliti, delovanje encimov, ki so vključeni tako v sintezo, kot razgradnjo metabolitov) ter genske ekspresije. Pri fiziološkem odzivu se odziv rastline kaže s spremembo vodnega potenciala v celici (turgor), prenosom hranil po rastlini, spremembo delovanja listnih rež, zmanjšano listno površino, ter odpadanjem cvetov in plodov. V raziskavah smo se osredotočili na metabolni odziv čilijev pri različnih stresih. V čilijih smo identificirali in kvantificirali pet kapsaicinoidov in sicer kapsaicin, dihidrokapsaicin, nordihidro-kapsaicin, homokapsaicin in homodihidro-kapsaicin, s pomočjo tandemkega masnega spektrometra (LTQ XL 125; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) in quadropolnega masnega spektrometra (TSQ Quantum Access Max Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) povezanega s UHPLC sistemom (Dionex UltiMate 3000; Thermo Scientific). Rastline čilijev izpostavljenih suši, slanosti in napadu škodljivca (marmorirane smrdljivke), so se odzvali z izrazitim povečanjem vsebnosti kapsaicinoidov v plodovih, ki je bila lahko večja od nekaj odstotkov pa do več kot 500 %, odvisno od genotipa (vrste, sorte), tipa stresa, intenzitete stresa, dela ploda ter preučevanega kapsaicinoida. Sušni ter slanostni stres sta imela vpliv na vsebnost kapsaicinoidov v vseh plodovih na rastlini, med tem ko se napad škodljivca izrazi predvsem na napadenih plodovih in ne na celotni rastlini. Z raziskavami smo dobili vpogled v metabolni odziv čilijev na različne tipe stresa, kar omogoča nadaljnje raziskave na področju manipuliranja predvsem s kapsaicinoidi, ki so v zadnjem času objekt številnih farmacevtskih študij, saj imajo dokazano protivnetno delovanje, vpliv na telesno težo ter proti rakavo delovanje. Zaradi številnih pozitivnih lastnosti kapsaicinoidov je pomembno, da pridelovalci znajo pridelati plodove z visoko vsebnostjo omenjenih snovi, ter tako izboljšati njihovo kakovost.

## Vpliv kokaprina in makrocipina na biofilm listerij

Tanja Zupan<sup>1,2</sup>, Nika Janež<sup>2</sup>, Petra Čotar<sup>3</sup>, Aleksandar Sebastijanovič<sup>3</sup>, Janez Štrancar<sup>3</sup>, Jerica Sabotič<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

<sup>2</sup> Institut »Jožef Stefan«, Odsek za biotehnologijo

<sup>3</sup> Institut »Jožef Stefan«, Odsek za fiziko trdne snovi

Mentorica: viš. znan. sod. dr. Jerica Sabotič

Somentor: doc. dr. Gregor Gunčar

Bakterije pogosto rastejo v obliki biofilma, ki jim omogoča rast na različnih površinah in ima pomembno vlogo pri preživetju bakterij v okolju. V biofilmu se bakterije obdajo z zunajceličnim matriksom, v katerem so pomemben sestavni del polisaharidi in različni encimi.

Pri delu smo uporabili bakterije *Listeria innocua*, ki se pogosto uporabljajo kot modelni organizem za patogeno vrsto *Listeria monocytogenes*. Biofilmi listerije so običajno v literaturi opisani kot monoslojni, pri našem delu pa smo opazili, da tvori tudi dvosloj in večslojne strukture, podobne piramidam.

Proteini iz gob predstavljajo razmeroma neraziskano skupino proteinov z edinstvenimi lastnostmi. Med njimi izstopajo inhibitorji peptidaz in lektini, med katerimi sta tudi kokaprin in makrocipin. Kokaprin (KKP1) je majhen protein izoliran iz gobe *Coprinopsis cinerea* in deluje kot inhibitor cisteinskih in aspartatnih peptidaz ter lektin. Makrocipin (Mcp1) pa je inhibitor cisteinskih peptidaz iz gobe *Macrolepiota procera*. Želeli smo preveriti kakšen vpliv imajo ti proteini na razvoj biofilma listerij.

V bakterijskem ekspresijskem sistemu smo pripravili rekombinantne proteine Mcp1, KKP1 in štiri mutante KKP1 (KKP1-N22R, KKP1-D47R, KKP1-FH32EE, KKP1-G13E). Z merjenjem inhibitorne aktivnosti za encim papain smo potrdili inhibitorno aktivnost makrocipina, z encimoma papain in pepsin pa smo preverili inhibitorno aktivnost za KKP1 in njegove mutante. Med njimi je izstopal mutant KKP1-N22R, pri katerem smo uspešno spremenili reaktivno mesto za inhibicijo papaina. S tem smo nakazali, da ima kokaprin ločena mesta za inhibicijo cisteinskih in aspartatnih peptidaz. Z analizo nativne poliakrilamidne gelske elektroforeze smo pokazali, da se KKP1 in njegovi mutanti povezujejo v oligomere.

Za preverjanje vpliva izoliranih proteinov iz gob na biofilm bakterije *L. innocua* smo pripravili bakterije, ki so izražale reporterski protein DsRED Express. Ugotovili smo, da tako kokaprin kot makrocipin povzročita zmanjšano adhezijo bakterij na polistiren. Opazili smo tudi viden učinek kokaprina na razbijanje statičnega biofilma in učinek makrocipina na razbijanje dinamičnega biofilma. Na adhezijo bakterij na substrat in na razbijanje zrelega statičnega biofilma imajo močnejši vpliv od KKP1 tri njegovi mutanti KKP1-N22R, KKP1-FH32EE in KKP1-G13E. Ti spremenjeni aminokislinski ostanki se nahajajo na isti strani protein KKP1, zato sklepamo, da se tam nahaja mesto, ki je pomembno za vezavo KKP1 na bakterije *L. innocua*.

Pokazali smo, da oba testirana proteina iz gob, makrocipin in kokaprin, različno vplivata na različne faze razvoja biofilma listerij.

## Regulacija določenih sistemov toksin/antitoksin tipa II *in vivo*

Zala Živič, San Hadži, Jurij Lah

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Mentor: doc. dr. San Hadži

Sistemi toksin/antitoksin so genetski elementi prisotni na kromosomih ali plazmidih bakterij in arhej. Pri našem delu se osredotočamo na toksine/antitoksine tipa II. Toksin je citostatičen oziroma citotoksičen protein. Antitoksin pa je protein, ki preko neposredne vezave onemogoči delovanje toksina. Pri sistemih tipa II je pogosta značilnost avtoregulacije.

Zapisa za toksin in antitoksin se nahajata na policistronski regiji pod nadzorom enakega promotorja. Antitoksin zavira izražanje lastnega operona glede na molsko razmerje s toksinom. Natančni molekularni mehanizmi regulacije so zelo raznoliki, vendar pogosto kažejo podoben profil izražanja. Razmerja, ki določajo regulacijo, so pogosto določena *in vitro* in ne upoštevajo morebitnih vplivov celice.

Naš cilj je vzpostaviti sistem za validacijo teh razmerij *in vivo* ter validacija razmerij določenih sistemov (ccdBA, HigBA2, mqsRA, mazEF...). Trenutno smo uspešno vzpostavili dva sistema za gradientno indukcijo proteina *in vivo*. Obravnavana sistema sta laktozni in arabinozni ekspresijski sistem. V obeh primerih je potrebno prilagajanje razmer (celice, geni) v namen homogenega gradientnega izražanja genov na ravni celic. Uporabili smo celice brez transporterjev za laktozo (Tuner[DE3]), ki omogočajo homogeno razporeditev sintetičnega induktorja IPTG za laktozni sistem. V primeru arabinoznega sistema pa smo homogenost omogočili preko konstitutivnega izražanja transporterja arabinoze (AraE). Celice ter konstrukt smo preverili preko merjenja fluorescenca reporterskega proteina sfGFP na pretočnem citometru. V nadaljevanju nameravamo izvesti poskusno validacijo sistema HigBA2 iz *Vibrio cholerae* ter nato še drugih izbranih sistemov.

# **LAPANJETOVI NAGRAJENCI**

## ***za leto 2022***

*Lapanjetova plaketa:*

prof. dr. Janko KOS

*Lapanjetova nagrada:*

prof. dr. Nataša POKLAR ULRIH

*Lapanjetovo priznanje:*

dr. Ana MITROVIĆ

*Lapanjetovo priznanje:*

dr. Ivana JOVČEVSKA

## Molekulska adaptacija na visoke temperature

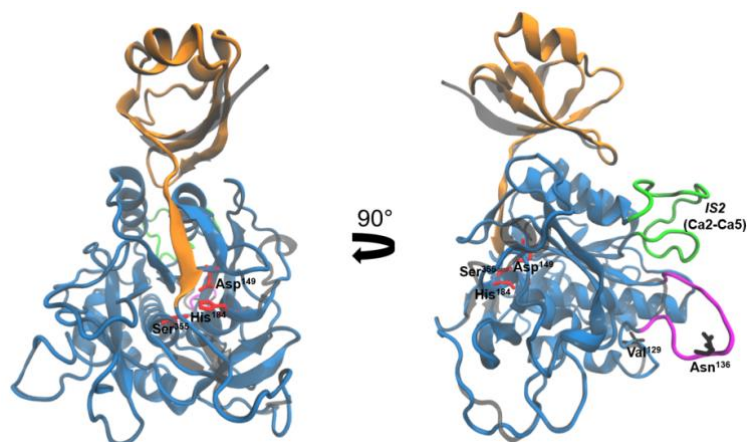
Nataša Poklar Ulrich

*Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana*

Arheje so mikroorganizmi, ki so prilagojeni za življenje v ekstremnih pogojih, in so kot takšne zanimive za razumevanje mehanizmov adaptacij na ekstremne pogoje in obenem predstavljajo tudi nov vir biotehnološko zanimivih molekul.

Med najbolj raziskane molekule arhej spadajo membranski lipidi, ki se od lipidov evkariontov in bakterij razlikujejo v štirih značilnostih, ki omogočajo večjo stabilnost membrane: (a) stereokemija glicerol-fosfatne skupine: sn-glicerol-1-fosfat z ogljikovodikovimi verigami na položajih sn-2 in -3; (b) eterne povezave med glicerolnim delom in ogljikovodikovimi verigami; (c) razvejana ogljikovodikova veriga, in (d) togi membranski bipolarni lipidi s tetraetrskim jedrom pri arhealnih vrstah. V našem laboratoriju se že vrsto let ukvarjamo s hipertermofilno arhejo *Aeropyrum pernix* K1, ki optimalno raste pri temperaturah okrog 90 °C. Membranski lipidi *A. pernix* so posebnost celo med arhejskimi lipidi, prevladuje di-O-sesterpanil glicerol (C25,25-arheol), kakršnega pri arhejah najdemo le redko. Glavna polarna lipida sta namreč fosfoglikolipid AGI (91 mol%) in fosfolipid AI (9 mol%). V zadnjih letih smo se intenzivno ukvarjali s proučevanjem stabilnosti arheosomov pripravljenih iz arhealnih lipidov ter različnih mešanic sn-1,2 in sn-2,3 lipidov.

Encimi, ki izvirajo iz termofilnih organizmov, so zaradi izjemne stabilnosti zaželeni za uporabo v industriji. Eden izmed industrijsko zanimivih encimov je pernizin iz *A. pernix*. Pernizin je subtilizinu podobna zunajcelična serinska proteinaza. Dve izstopajoči lastnosti pernizina sta njegova izredna termostabilnost ter zmožnost razgradnje trdovratnih proteinskih substratov, kot so prioni. Zaradi teh lastnosti je pernizin superioren napram že dostopnim komercialnim proteazam. Kljub temu je uporaba pernizina v praksi omejena zaradi njegove težavne proizvodnje v zadostnih količinah. Naša raziskovalna skupina je že vzpostavila proizvodnjo rekombinantnega pernizina v mezofilnih bakterijah *Escherichia coli* in *Streptomyces rimosus*. Rekombinantna oblika pernizina ohrani podobne biokemijske lastnosti v primerjavi z nativno obliko (proteolitična aktiven v širokem pH območju in pri temperaturi od 70 °C do 100 °C, v prisotnosti različnih spojin, kot so detergenti, denaturanti in reducenti). Pernizin se tako kot ostali subtilizini po sintezi sprva nahaja v neaktivni pro-obliki (Slika 1), ki se nato avtokatalitsko pretvori v aktivno proteinazo. Raziskali smo zakonitosti aktivacije pro-pernizina, ki obsega več stopenj (cepitev peptidne vezi med proregijo in katalitsko domeno, disociacija avtoprocesiranega kompleksa, razgradnja sproščene proregije s katalitsko domeno) in vlogo temperature nad 80 °C ter kalcijevih ionov pri zvitju v urejeno konformacijo in zaščito pred avtolizo.



Slika 1: Model tridimenzionalne zgradbe pro-pernizina (Bahun & Poklar Ulrich, 2021)

## Katepsina B in X: vloga pri napredovanju raka in tarče protitumorne terapije

Ana Mitrović

*Odsek za biotehnologijo, Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija  
Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija*

Katepsina B in X sta lizosomski cisteinski peptidazi katerih povečano izražanje in aktivnost je v telesu povezano s številnimi patološkimi spremembami, vključno z rakom. V skupini cisteinskih katepsinov sta katepsina B in X edinstvena zaradi svoje karboksipeptidazne aktivnosti. Katepsin B pa lahko dodatno deluje tudi kot endopeptidaza, saj je njegova aktivnost opredeljena s položajem zaporne zanke, strukturnim elementom, ki uravnava dostop substratov do aktivnega mesta. Med obema katepsinoma je znana kompenzatorna vloga, saj prekinjeno delovanje enega izmed katepsinov nadomesti drugi. Pri raku sta katepsina B in X udeležena pri vseh fazah nastanka in napredovanja raka, kjer sodelujeta pri razgradnji zunajceličnega matriksa, invaziji, migraciji, metastaziranju in angiogenezi. V naših raziskavah smo pokazali, da oba katepsina tudi spodbujata epitelno-mezenhimski prehod, kjer je njuno višje izražanje povezano z mezenhimskim celičnim fenotipom. Hkrati smo pokazali, da sta izražanje in aktivnost katepsinov B in X povečana tudi v tumorskih matičnih celicah, populaciji celic znotraj tumorjev, ki je odporna na večino uveljavljenih terapevtskih pristopov za zdravljenje raka in je odgovorna za ponovni pojav bolezni.

Zaradi pomembne vloge pri številnih procesih napredovanja raka sta bila katepsina B in X identificirana kot primerni tarči za razvoj novih protitumorih učinkovin. Za regulacijo njune povečane aktivnosti smo zato razvili nove močne selektivne nizko molekularne inhibitorje, ki so značilno zavrla procese napredovanja tumorjev. Za nove inhibitorje katepsinov B in X smo pokazali močno protitumorno delovanje tako *in vitro*, v funkcijskih testih na celičnih linijah, kot *in vivo* na mišjih modelih. Njihovo protitumorno delovanje pa smo pokazali tudi na tumorskih matičnih celicah, kjer se je inhibicija katepsinov B in X izkazala, kot možen pristop s katerim lahko vplivamo na fenotip tumorskih matičnih celic. Dodatno smo pokazali tudi, da lahko s sočasno inhibicijo sorodnih katepsinov B in X dosežemo sinergističen učinek pri zaviranju procesov napredovanja raka. Uporaba inhibitorjev katepsinov B in X, samostojno ali v kombinaciji, tako predstavlja obetaven pristop s katerim bi lahko premagali omejitve obstoječe protitumorne terapije in izboljšali končne izide pri zdravljenju raka.

## Uporaba kamelidnih nanoteles v raziskavah glioblastoma

Ivana Jovčevska

*Center za funkcijsko genomiko in biočipe, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, UL Medicinska fakulteta*

Izraz rak se nanaša na vrsto bolezni z različnimi molekularnimi spremembami, kot so mutacije in amplifikacije genov, spremembe števila kopij, kot tudi spremembe v tumor supresorskih genih in genih za popraviljanje DNA ter epigenetske modifikacije. Zaradi pogoste pojavnosti med ljudmi se po vsem svetu intenzivno proučujejo uspešnejši načini za izboljšanje diagnoze in zdravljenja rakavih bolnikov.

Z 1,35 % vseh diagnosticiranih rakov možganski tumorji spadajo med redke bolezni. Na splošno gliomi predstavljajo skoraj 80 % primarnih možganskih malignih tumorjev, s 60-70 % le teh prednjači glioblastom. Za glioblastom je značilna visoka smrtnost saj bolniki podležejo bolezni v 12 do 15-ih mesecih po prvotni diagnozi. Kljub agresivnemu sistemskemu zdravljenju, ki predstavlja kombinacijo kirurške odstranitve tumorja, čemur sledi obsevanje in kemoterapija z alkilirajočim sredstvom temozolomidom, se preživetje bolnikov z glioblastomom v zadnjih desetletjih ni znatno izboljšalo.

Molekularna raznolikost, ki je prisotna tako med tumorji kot tudi znotraj tumorja, nakazuje, da ima lahko ciljni pristop boljše rezultate. Protitelesa so bila prve makromolekule, uporabljene za tarčno dostavo. Uspeh njihove implementacije je omejen, saj se protitelesa uporabljajo za sistemsko zdravljenje raka. Področje zdravljenja s protitelesi je možno znatno izboljšati z uporabo težko-verižnih protiteles oziroma njihovih rekombinantno pridobljenih antigen-vezavnih domen t.i. nanoteles namesto klasičnih imunoglobulinov. Nanotelesi so najmanjši naravni antigen-vezavni fragmenti z edinstvenimi lastnostmi. V primerjavi s klasičnimi protitelesi imajo nanotelesi številne prednosti kot so majhna velikost, močna afiniteta za vezavo na antigen, konveksni paratop, stabilnost v ekstremnih pogojih, topnost v vodi, in stroškovno učinkovita proizvodnja v mikrobnih sistemih z nespremenljivimi lastnostmi.

Od odkritja se nanotelesi intenzivno uporabljajo pri *in vitro* in *in vivo* poskusih, kot tudi v predkliničnem in kliničnem testiranju. Nanotelesi lahko služijo kot orodja za modulacijo funkcije proteinov ali kot biološka nanozdravila, ki lahko istočasno ciljajo celico in pomagajo pri njenem uničenju tako, da vplivajo na enega izmed njenih ključnih celičnih procesov. Pri raziskavah glioblastoma so nanotelesi še posebej pomembna saj lahko prečkajo krvno-možgansko pregrado. V našem laboratoriju smo nanotelesi do sedaj uporabljali kot orodja za iskanje bioznačevalcev glioblastoma. Funkcionalno smo tudi ovrednotili specifičnosti nanoteles za določene celice glioblastoma. V zadnjem času jih uporabljamo tudi kot orodja za proučevanje funkcije proteinov. S kombinacijo proteomskih in bioinformatičnih tehnik lahko pridobimo bolj celovito sliko o spremembah, ki se pojavljajo na več ravneh v celicah.