

BIOmolekularec.si

Dan biomolekularnih znanosti



Zbornik povzetkov

Ljubljana, 24. september 2020

Katalogni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani
COBISS.SI-ID=29101571
ISBN 978-961-93879-9-3 (pdf)

DAN BIOMOLEKULARNIH ZNANOSTI
BIOmolekularec 2020

Organizator:

Slovensko biokemijsko društvo

Kraj prireditve:

spletna izvedba dogodka

Uredniki:

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

Računalniško oblikovanje:

Ajda Taler-Verčič

Založil:

Slovensko biokemijsko društvo

Spletni naslov:

http://biomolekularec.splet.arnes.si/files/2020/09/BIOmolekularec_2020-zbornik.pdf

Programski in organizacijski odbor:

Ajda Taler-Verčič (predsednica)

Aljoša Bavec

Blaž Cigić

Bojan Doljak

Miha Pavšič

Ljubljana, 2020

PROGRAM SREČANJA

8:30-8:45 OTVORITEV: prof. dr. Janko KOS, predsednik Slovenskega biokemijskega društva

Sekcija 1

Vodja sekcije: Blaž Cigić

-
- 8:45-9:00 Marko KREFT, Biotehniška fakulteta UL
PRESNOVA MOŽGANOV
- 9:00-9:10 Ana HALUŽAN VASLE, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo UL
**ORTOKASPAZA MaOC1 IN PAR TOKSIN-ANTITOKSIN Ip_f_1067-Ip_f_1065
CIANOBAKTERIJE *MICROCYSTIS AERUGINOSA***
- 9:10-9:20 Dino JORDANOSKI, Biotehniška fakulteta UL
**VEZAVE HEMOGLOBINA NA ALUMINOSILIKATNE MEZOPOROZNE
NANODELCE: NOVI UMETNI NOSILCI KISIKA**
- 9:20-9:30 Tinara ŠUŠTARIČ, Filip BRAJČIČ, Patricia LUŠTEK, Gimnazija Novo mesto
PRETVORBA RUTINA V KVERCETIN IN NJUNA VSEBNOST V TATARSKI AJDI
- 9:30-9:40 Živa POBERŽNIK, Šolski center Ravne na Koroškem - Gimnazija
**EKSTRAKCIJA KANABINOIDOV IZ INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa*
L.), NJIHOVI PROTIMIKROBNI UČINKI IN PRIPRAVA EMULZIJ S KANABINOIDI**
- 9:40-9:50 ODMOR

Sekcija 2

Vodja sekcije: Miha Pavšič

-
- 9:50-10:05 Igor KRIŽAJ, Institut "Jožef Stefan"
TA ČUDOVITI SVET ŽIVALSKIH STRUPOV
- 10:05-10:15 Andreja HABIČ, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo UL
**RAZVOJ IN VALIDACIJA SISTEMA ZA ISKANJE INTERAKCIJSKIH PARTNERJEV
DNA NA OSNOVI OZNAČEVANJA BLIŽNJIH MOLEKUL Z BIOTINOM**
- 10:15-10:25 Lea KNEZ, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo UL
**RAZISKOVANJE MOLEKULARNEGA OZADJA BOLEZNI PRI PRADER-
WILLIJEVEM SINDROMU**
- 10:25-10:35 Ana RAJH, Katarina ŠEBÖK, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
ALI SLADKI PELIN VSEBUJE ARTEMISININ?

- 10:35-10:45 Nika EKART, *II gimnazija Maribor*
VPLIV PRESNOVNIH PROCESOV DVEH IZBRANIH VRST GLIV NA ZMANJŠANO KONCENTRACIJO TEŽKIH KOVIN V ONESNAŽENEM SUBSTRATU
- 10:45-10:55 *ODMOR*

Sekcija 3

Vodja sekcije: Bojan Doljak

- 10:55-11:10 Borut ŠTRUKELJ, *Fakulteta za farmacijo UL, Institut "Jožef Stefan"*
KANABINOIDI – ZDRAVILNE UČINKOVINE ALI LE MIT?
- 11:10-11:20 Damjan AVSEC, *Fakulteta za farmacijo UL*
SELEKTIVNO ZAVIRANJE IMUNOPROTEASOMA V PREMAGOVANJU ODPORNOSTI KRONIČNE LIMFOCITNE LEVKEMIJE NA SODOBNA TARČNA ZDRAVILA
- 11:20-11:30 Spase STOJANOV, *Institut "Jožef Stefan"*
RAZVOJ FLUORESCENTNIH PROBIOTIKOV ZA NJIHOVO SPREMLJANJE V RAZLIČNIH EKSPERIMENTIH
- 11:30-11:40 Tamara JARM, Deja JURIŠEVIČ, *Gimnazija Vič*
SINTEZA MAGNETNIH NANOVERIG ZA CILJNO DOSTAVO ZDRAVILNIH UČINKOVIN
- 11:40-11:50 Aleks BRUMEC, *Prva gimnazija Maribor*
VLOGA POLIMORFIZMOV V IZBRANIH GENIH PRI ODZIVU NA ANTI-TNF TERAPIJO PRI BOLNIKI S CHRONOVO BOLEZNIJO
- 11:50-12:30 *ODMOR ZA KOSILO*

Okrogla miza: Znanost in COVID-19

Moderator omizja: Ajda Taler-Verčič

- 12:30-13:00 Miroslav PETROVEC, *Medicinska fakulteta UL*
Roman JERALA, *Kemijski inštitut*
Dušan TURK, *Inštitut »Jožef Stefan«*
Borut ŠTRUKELJ, *Fakulteta za farmacijo UL*

Sekcija 4

Vodja sekcije: Aljoša Bavec

- 13:00-13:15 Miroslav PETROVEC, *Medicinska fakulteta UL*
LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB S KORONAVIRUSI

- 13:15-13:25 Katarina HOČEVAR, *Institut "Jožef Stefan"*
KDO ALI KAJ JE RAZLOG ZA VNETE DLESNI?
- 13:25-13:35 Ivana JOVČEVSKA, *Medicinska fakulteta UL*
**CILJANJE GLIOBLASTOMSKIH CELIC S KAMELIDNIM NANOTELESOM PROTI
FREM2 PROTEINU**
- 13:35-13:45 Maj BAVEC, *Škofijska klasična gimnazija*
**VPLIV GENETSKE VARIABILNOSTI GLUTATION S-TRANSFERAZ NA TVEGANJE
ZA POJAV MALIGNEGA MEZOTELIOMA**
- 13:45-13:55 Matic Jože GRDADOLNIK, Arne Klemen MARUŠIČ *Gimnazija Vič*
**ANALIZA POLIETILENA V KOLENSKIH IN KOLČNIH PROTEZAH Z VIBRACIJSKO
SPEKTROSKOPIJO**
- 13:55-14:05 ODMOR

Sekcija 5

Vodja sekcije: Ajda Taler-Verčič

- 14:05-14:20 Jerica SABOTIČ, *Institut "Jožef Stefan"*
IMAJO GOBE IMUNSKI SISTEM, S KATERIM SE BRANIJO PRED ŠKODLJIVCI?
- 14:20-14:30 Maša ČATER, *Veterinarska fakulteta UL*
**POMEMBNOST SESTAVE RASTNEGA MEDIJA IN MIKRO-ATMOSFERSKIH
POGOJEV ZA USPEŠNO *IN VITRO* IZOLACIJO IN PROLIFERACIJO
MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC IZ RAZLIČNIH TKIV ODRASLIH MIŠI BALB/C**
- 14:30-14:40 Karin HROVATIN, *Fakulteta za računalništvo in informatiko UL*
**PODATKOVNO RUDARJENJE GENSKE EKSPRESIJE TEKOM RAZVOJA
*DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM***
- 14:40-14:50 Žiga ČESEN, Ana MESTINŠEK MUBI, *Biotehniški center Naklo*
**ANTIBAKTERIJSKO DELOVANJE RASTLINSKIH IN ČEBELJIH PRIPRAVKOV NA
BAKTERIJO *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***
- 14:50-15:00 Luka Irenej PEČAN, *Gimnazija in veterinarska šola, BIC Ljubljana*
**KVANTITATIVNO DOLOČANJE BIOLOŠKO AKTIVNIH UČINKOVIN V NAVADNI
KONOPLJI (*CANNABIS SATIVA SUBSP. SATIVA L.*) IN NJENA MIKROBIOLOŠKA
KAKOVOST**
- 15:00-16:00 ODMOR

SKUPŠČINA SLOVENSKEGA BIOKEMIJSKEGA DRUŠTVA, PODELITEV LAPANJETOVIH NAGRAD IN PREDAVANJA NAGRAJENCEV

od 16:00 *Lapanjetova nagrada:* prof. dr. Kristina SEPČIČ

Lapanjetovo priznanje: doc. dr. San HADŽI

Kazalo povzetkov

Povzetki predavanj

Marko Kreft

PRESNOVA MOŽGANOV 12

Ana Halužan Vasle, Aleksandra Uzar, Anže Vozelj, Marina Klemenčič, Marko Dolinar

ORTOKASPAZA MAOC1 IN PAR TOKSIN-ANTITOKSIN IPF_1067-IPF_1065 CIANOBAKTERIJE
MICROCYSTIS AERUGINOSA 13

Dino Jordanoski, Romana Cerc Korošec, Andrijana Škapin, Peter Nadrah, Nataša Poklar Ulrih

VEZAVE HEMOGLOBINA NA ALUMINOSILIKATNE MEZOPOROZNE NANODELCE: NOVI UMETNI
NOSILCI KISIKA..... 14

Tinara Šuštarčič, Filip Brajčič, Patricia Luštek, Janja Pust

PRETVORBA RUTINA V KVERCETIN IN NJUNA VSEBNOST V TATARSKI AJDI 15

Živa Poberžnik, Katja Stopar, Tanja Bagar, Ilja Gasan Osojnik Črnivec

EKSTRAKCIJA KANABINOIDOV IZ INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.), NJIHOVI
PROTIMIKROBNI UČINKI IN PRIPRAVA EMULZIJ S KANABINOIDI..... 16

Igor Križaj

TA ČUDOVITI SVET ŽIVALSKIH STRUPOV 17

Andreja Habič, Vojč Kocman, Brigita Lenarčič, Janez Plavec, Miha Pavšič

RAZVOJ IN VALIDACIJA SISTEMA ZA ISKANJE INTERAKCIJSKIH PARTNERJEV DNA NA OSNOVI
OZNAČEVANJA BLIŽNJIH MOLEKUL Z BIOTINOM..... 18

Lea Knez, Janja Božič, Boris Rogelj,

RAZISKOVANJE MOLEKULARNEGA OZADJA BOLEZNI PRI PRADER-WILLIJEVEM SINDROMU..... 19

Ana Rajh, Katarina Šebök, Mateja Godec, Darija Cör, Maša Knez Hrnčič

ALI PREKMURSKI SLADKI PELIN VSEBUJE ARTEMISININ? 20

Nika Ekart, Katja Holnthaner Zorec, Luka Šparl

VPLIV PRESNOVNIH PROCESOV DVEH IZBRANIH VRST GLIV NA ZMANJŠANO KONCENTRACIJO TEŽKIH
KOVIN V ONESNAŽENEM SUBSTRATU 21

Borut Štrukelj

KANABINOIDI- ZDRAVILNE UČINKOVINE ALI LE MIT? 22

Damjan Avsec, Marja Škrlj Miklavčič, Irena Mlinarič-Raščan

SELEKTIVNO ZAVIRANJE IMUNOPROTEASOMA V PREMAGOVANJU ODPORNOSTI KRONIČNE
LIMFOCITNE LEVKEMIJE NA SODOBNA TARČNA ZDRAVILA..... 23

Spase Stojanov, Špela Zupančič, Aleš Berlec

RAZVOJ FLUORESCENTNIH PROBIOTIKOV ZA NJIHOVO SPREMLJANJE V RAZLIČNIH EKSPERIMENTIH 24

Tamara Jarm, Deja Juriševič, Gašper Pernek, Črt Dragar, Slavko Kralj

SINTEZA MAGNETNIH NANOVERIG ZA CILJNO DOSTAVO ZDRAVILNIH UČINKOVIN 25

<i>Aleks Brumec, Helena Lonjak, Katja Repnik, Uroš Potočnik</i> VLOGA POLIMORFIZMOV V IZBRANIH GENIH PRI ODZIVU NA ANTI-TNF TERAPIJO PRI BOLNIKI S CROHNOVO BOLEZNIJO.....	26
<i>Miroslav Petrovec</i> LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽB S KORONAVIRUSI.....	27
<i>Katarina Hočevar, Matej Vizovišek, Alicia Wong, Joanna Koziel, Marko Fonović, Barbara Potempa, Richard Larmont, Jan Potempa, Boris Turk</i> KDO ALI KAJ JE RAZLOG ZA VNETE DLESNI? BAKTERIJSKI ENCIMI GINGIPAINI IN ŠKODA, KI JO POVZROČAJO NA DLESNIH	28
<i>Jovčevska Ivana, Šamec Neja, Zottel Alja, Kump Ana, Bolčina Lara, Krivec Eva, Muyldermans Serge, Šribar Jernej, Križaj Igor, Stojan Jurij, Komel Radovan</i> CILJANJE GLIOBLASTOMSKIH MATIČNIH CELIC S KAMELIDNIM NANOTELESOM PROTI FREM2 PROTEINU	39
<i>Maj Bavec, Marjeta Prašnikar, Katja Goričar</i> VPLIV GENETSKE VARIABILNOSTI GLUTATION S-TRANSFERAZ NA TVEGANJE ZA POJAV MALIGNEGA MEZOTELIOMA	30
<i>Matic Jože Grdadolnik, Arne Klemen Marušič, Alenka Mozer, Urban Novak</i> ANALIZA POLIETILENA V KOLENSKIH IN KOLČNIH PROTEZAH Z VIBRACIJSKO SPEKTROSKOPIJO	31
<i>Jerica Sabotič</i> IMAJO GOBE IMUNSKI SISTEM, S KATERIM SE BRANIJO PRED ŠKODLJIVCI?	32
<i>Maša Čater, Gregor Majdič</i> POMEMBNOST SESTAVE RASTNEGA MEDIJA IN MIKRO-ATMOSFERSKIH POGOJEV ZA USPEŠNO <i>IN VITRO</i> IZOLACIJO IN PROLIFERACIJO MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC IZ RAZLIČNIH TKIV ODRASLIH MIŠI BALB/C.....	33
<i>Karin Hrovatin, Mariko Katoh-Kurasawa, Gad Shaulsky, Blaž Zupan</i> PODATKOVNO RUDARJENJE GENSKE EKSPRESIJE TEKOM RAZVOJA <i>Dictyostelium discoideum</i> ...	34
<i>Žiga Česen, Ana Mestinšek Mubi, Marjetka Kastelic Švab</i> ANTIBAKTERIJSKO DELOVANJE RASTLINSKIH IN ČEBELJIH PRIPRAVKOV NA BAKTERIJO <i>Staphylococcus aureus</i>	35
<i>Luka Irenej Pečan, Roman Štukelj, Karmen Godič Torkar, Marko Jeran</i> KVANTITATIVNO DOLOČANJE BIOLOŠKO AKTIVNIH UČINKOVIN V NAVADNI KONOPLJI (<i>Cannabis sativa subsp. sativa L.</i>) IN NJENA MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST	36

Ostali povzetki

<i>Liza Ulčakar, Marko Novinec</i> RAZMERJE MED STRUKTURO IN DELOVANJEM IZBRANIH RASTLINSKIH FENOLOV IN NJIHOV MEHANIZEM INHIBICIJE KATEPSINOV B IN L.....	38
<i>Nika Mikulič Vernik, Marko Novinec</i> IDENTIFIKACIJA PROTEINSKIH TARČ DERIVATA PIRAZOLA V BAKTERIJI <i>Escherichia coli</i>	39

<i>Eva Drnovšek, Julija Lazarevič, Martina Fink, Saša Anžej Doma, Špela Žula, Aleša Kristan, Helena Podgornik, Tadej Pajič, Nataša Debeljak, Irena Preložnik Zupan</i> GENETSKO OZADJE DRUŽINSKIH ERITROCITOV V SLOVENIJI	40
<i>Milica Janković, Primož Bembič, Marija Kisilak, Marko Novinec, Iztok Turel</i> VPLIV KOVINSKIH IONOV NA AKTIVNOST IZBRANIH KATEPSINOV	41
<i>Jurij Nastran, Žiga Pušnik, Miha Moškon</i> ANALIZA ROBUSTNOSTI SINTETIČNEGA GENSKO REGULATORNEGA OMREŽJA PRI NAČRTOVANJU BIOLOŠKEGA PROCESORJA	42
<i>Gregor Kržmanc, Tadej Strah, Uroš Javornik, Janez Plavec, Alenka Mozer</i> ALI LAHKO S POMOČJO SPEKTROSKOPIJE RAZLOŽIMO VPLIV EPIGENETSKIH SPREMENB NA POTEK BOLEZNI?	43
<i>Katarina Kouter, Iris Šalamon, Tomaž Zupanc, Alja Videtič Paska</i> EPIGENETIKA, MOST MED OKOLJEM IN GENI	44
<i>Petra Piber, Neža Vavpetič, Katja Goričar, Alenka Franko, Vita Dolžan</i> GENETSKA VARIABILNOST MEHANIZMOV URAVNAVANJA IZRAŽANJA IL-1B IN TVEGANJE ZA NASTANEK MALIGNEGA MEZOTELIOMA IN PLEVRALNIH PLAKOV	45
<i>Kity Požek, Adrijana Leonardi, Igor Križaj</i> PRVI PREDSTAVNIK PODTIPA KAČJIH METALOPROTEINAZ P-IIIE ZAVIRA AGREGACIJO TROMBOCITOV	46
<i>Jošt Hočevar, Brigita Lenarčič, Miha Pavšič</i> LIGAND-VEZAVNE LASTNOSTI HIDROFOBNEGA ŽEPA EPCAM IN NJEGOV VPLIV NA REGULIRANO INTRAMEMBRANSKO CEPITEV	47
<i>Jure Loboda, Piotr Sosnowski, Livija Tušar, Robert Vidmar, Matej Vizovišek, Jaka Horvat, Gregor Kosec, Francis Impens, Hans Demol, Boris Turk, Kris Gevaert, Dušan Turk</i> MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE MED KATEPSINI IN NJIHOVIMI SUBSTRATI	48
<i>Katarina P. van Midden, Aljaž Bratina, Aljaž Gaber, Brigita Lenarčič</i> ANALIZA CEPITVE PROTEINA EPCAM Z DISINTEGRINSKO METALOPROTEAZO TACE IN VITRO	49
<i>Alja Zottel, Neja Šamec, Ivana Jovčevska, Ana Kump, Lucija Raspor Dall'Olio, Pia Pužar Dominkuš, Rok Romih, Samo Hudoklin, Jernej Mlakar, Daniil Nikitin, Maxim Sorokin, Anton Buzdin, Lea Knez, Zala Žužek, Radovan Komel</i> VIM, miR-124-3P IN miR-9-5 PRISOTNI V MAJHNIH ZUNAJCELIČNIH VEZIKLIH SO MOŽNI OZNAČEVALCI GLIOBLASTOMA	50
<i>Vid Nemec, Luka Čiča, Mitja Drab, Marko Jeran</i> EMISIJSKI PROFILI KEMILUMINISCENCE ORGANSKEGA HIDRAZIDA V PROTIČNEM MEDIJU: FIZIKALNI PRISTOP PROUČEVANJA PARAMETROV NASTANKA SVETLOBE IN RAZVOJ OPTIMALNEGA SISTEMA .	51
<i>Hana Remškar, Anja Sedušak Kljakič, Martina Oder, Marko Jeran</i> PROTIMIKROBNO DELOVANJE MACERATA IGLIC NAVADNE SMREKE (<i>PICEA ABIES</i>) NA BAKTERIJE <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i>	52

Luka Gnidovec, Vera Župunski

EVOLUCIJA TDP-43 IN NJEGOVIH PSEVDOGENOV PRI SESALCIH 53

Uroš Prešern, Aljaž Gaber, Brigita Lenarčič

ANALIZA INTERAKCIJE MED ZUNAJCELIČNIMA DOMENAMA EpCAM IN EGFR..... 54

Ajda Brkopec, Lara Redek Žnidaršič, Špela Grmovšek, Vojka Zupančič

VPLIV UPORABE RAZLIČNIH TOPIL NA EKSTRAKCIJO KURKUMINOIDOV IN NJIHOVO ANTIMIKROBNO DELOVANJE NA BAKTERIJO *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* 55

Lapanjetovi nagrajenci za leto 2020

Kristina Sepčič

EGEROLIZINSKI PROTEINI IZ GLIVNEGA RODU *PLEUROTUS* IN NJIHOVA UPORABA..... 57

San Hadži

INTRINZIČNO NESTRUKTURIRANI PROTEINI IN REGULACIJA BAKTERIJSKIH TA MODULOV 58

POVZETKI PREDAVANJ

Presnova možganov

Marko Kreft

Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

Možgani tehtajo le dva odstotka telesne mase, porabijo pa kar 20 % vse glukoze in 25 % kisika. Previsoke koncentracije glukoze možganom škodijo na daljši čas, prenizke koncentracije pa takoj. Največ glukoze se porabi za vzdrževanje gradientov ionov. Posledica gradientov in selektivne prepustnosti plazmaleme nevronov je membranski potencial. Glukoza za delovanje nevronov se prenese skozi krvno-možgansko pregrado, ki jo sestavljajo endotelijske celice kapilar, bazalna membrana, ki ovija kapilare in izrastki astrocitov. Astroцитi so najštevilčnejše celice glije, ki jih je v možganih enako kot nevronov: sto milijard ali 10^{11} . V zadnjih letih celice glije razumemo kot nepogrešljivi dejavnik delovanja možganov. Astroцитi izločajo signalne molekule, pomembne za proces spanja, razstrupljajo možgane, uravnavajo pretok krvi, sodelujejo pri razvoju možganov, nujni pa so tudi za energijski metabolizem celotnih možganov. Razvoj senzorskih fluorescenčnih proteinov je omogočil meritve koncentracije glukoze, laktata in drugih presnovkov v posamezni celici. Pri uravnavanju presnove možganov sodelujeta adrenalin in noradrenalin; v nekaj minutah povzročita zvišanje proste glukoze in laktata v astroцитih. To odkritje kaže, da se astroцитi odzivajo na delovanje nevronov z zvišanjem znotrajcelične koncentracije proste glukoze, ki je potrebna zaradi zvišane presnove možganov.

**Ortokaspaza MaOC1 in par toksin-antitoksin Ipf_1067-Ipf_1065
cianobakterije *Microcystis aeruginosa***

Ana Halužan Vasle¹, Aleksandra Uzar¹, Anže Vozelj^{1,2}, Marina Klemenčič¹, Marko Dolinar¹

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Mentorja: doc. dr. Marina Klemenčič, izr. prof. dr. Marko Dolinar

Sistemi toksin-antitoksin so genetski moduli na kromosomih in/ali plazmidih številnih bakterij in arhej. Zapisujejo za stabilen toksin in kratkoživ antitoksin, ki delujeta znotraj celice, v kateri se sintetizirata. Sprva so sistemi toksin-antitoksin veljali za elemente celične smrti v neugodnih življenjskih razmerah, kasneje pa se je izkazalo, da sodelujejo tudi v drugih celičnih procesih.

Izraženi toksini porušijo pravilno delovanje biokemijskih poti, kar onemogoči nadaljnjo rast celice. To lahko prepreči antitoksin, ki nasprotuje delovanju toksina. Posamezna bakterijska celica ima v svojem genomu več različnih sistemov toksin-antitoksin, ki sestavljajo kompleksna omrežja delovanja. Sistemi, zapisani na kromosomih bakterij, so povezani predvsem z odgovorom celice na neugodne življenjske razmere, in omogočajo preživetje posamezne celice ali populacije, ki ji ta pripada.

V genomu sladkovodne cianobakterije *Microcystis aeruginosa* je šest zapisov za ortokaspaze. To so prokariontski homologi kaspaz, regulatorjev programirane celične smrti pri evkariontih. Ugotovili smo, da sta v neposredni bližini zapisa za ortokaspazo MaOC1 zapisa za dva para toksin-antitoksin: Ipf_1067-Ipf_1065 in Ipf_1064-Ipf_1063. Oba para sta proteinska, pri čemer par Ipf_1067-Ipf_1065 uvrščamo v tip RelBE, par Ipf_1064-Ipf_1063 pa v tip VapBC.

Naš načrt je, da v bakteriji *Escherichia coli* pripravimo kompleks Ipf_1067-Ipf_1065 in raziščemo delovanje MaOC1 nanj. Pri tem smo ugotovili, da je - verjetno zaradi delovanja rekombinantnega toksina - nemogoče pripraviti kompleks toksin-antitoksin, če sta zapisa pod skupnim inducibilnim promotorjem. Zato smo pripravili nov ekspresijski vektor, ki bi omogočil stalno izražanje zapisa za antitoksin. Z dvojno transformacijo smo v bakterije vstavili plazmid z zapisom za antitoksin pod konstitutivnim promotorjem in hkrati plazmid z zapisom za kompleks toksin-antitoksin pod inducibilnim promotorjem. Na osnovi modelov prostorske zgradbe toksina in literaturnih podatkov smo predvideli, katere mutacije bi morali uvesti, da bi zmanjšali toksičnost, hkrati pa ohranili interakcije toksina z antitoksinom. Vse konstrukte izražamo v bakterijah *E. coli*.

Vezave hemoglobina na aluminosilikatne mezoporozne nanodelce: Novi umetni nosilci kisika

Dino Jordanoski¹, Romana Cerc Korošec², Andrijana Škapin³, Peter Nadrah³, Nataša Poklar Ulrih¹

¹*Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta*

²*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo*

³*Zavod za gradbeništvo Slovenije*

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Aluminosilikatni mezoporozni nanodelci (MASN) ali zeoliti sodijo med najboljše preučevane nanodelci na področju nanobiologije. To so delci, ki imajo silikatno ogrodje, različno velike nanopore in se uporabljajo kot sistem za dostavo zdravilnih učinkovin.

Namen našega raziskovalnega dela je bil proučiti možnost uporabe aluminosilikatnih nanodelcev za kapsulacijo hemoglobina ter opisati fizikalno-kemijske lastnosti vezave hemoglobina na nanodelce. Proučevali smo tudi strukturne lastnosti in stabilnost hemoglobina vezanega na nanodelce.

Z uporabo metode dinamičnega sipanja svetlobe (DLS) smo ugotovili, da je velikost aluminosilikatnih delcev v območju $211,8 \pm 0,3$ nm in da so delci zelo homogeni, saj je njihov polidesperzni indeks nizek 0,139. Izmerjen neto površinski potencial nanodelcev (Zeta potencial) je $-5,5 \pm 4,3$ mV, kar pomeni, da so nanodelci negativno nabiti. Poroznost delcev smo določili z uporabo Brunauer-Emmet-Teller (BET) analize, ki je pokazala značilno histerezo, z Barrett-Joyne-Halenda (BJH) analizo smo določili velikost in volumen por. Ugotovili smo, da se hemoglobin vgradi v pore z velikostjo okrog 5 nm. Z Fourier transform infra rdečo spektrometrijo (FTIR), smo ugotovili, da se hemoglobin vgradi v nanodelce. Z uporabo fluoresenčne emisijske spektrometrije pa da se pri vezavi hemoglobina na nanodelce, njegova tericarna struktura ne spremeni. Do enakih rezultatov smo prišli tudi z uporabo UV-VIS spektrofotometrije. Naše študije so pokazale, da vezava hemoglobina na MASN ne povzroča značilne spremembe v strukturi proteina. S SDS-PAGE elektroforeze smo pokazali da je vezava hemoglobina na nanodelce reverzibilen proces. Z uporabo termične gravimetrične analize (TGA) in UV-VIS spektrofotometrije (Tecan Plate Reader) smo določili maso vezanega hemoglobina na maso nanodelcev (loading capacity), ki je bila 445 µg/mg (koncentracija hemoglobina 700 µg/mL) pri naših eksperimentalnih pogojih ter maksimalno maso vezanega hemoglobina na nanodelce, ki je znašala 530 µg/mg.

V okviru naše raziskave smo prvič pokazali, da naravne zeolite (aluminosilikatni nanodelci) lahko uporabljamo kot nosilce za hemoglobin oziroma za shranjevanje kisika.

Pretvorba rutina v kvercetin in njuna vsebnost v tatarski ajdi

Tinara Šuštarich, Filip Brajčič, Patricia Luštek, Janja Pust

Gimnazija Novo mesto

Mentorica: Janja Pust

Predmet naše raziskovalne naloge je bila tatarska ajda, rastlina, ki postaja vse bolj priljubljena zaradi svojih hranilnih snovi. Med drugim vsebuje tudi dva pomembna antioksidanta, flavonoida rutin in kvercetin, ki imata mnoge pozitivne učinke na zdravje človeka. Raziskavo smo izvedli s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, in sicer na šolskem HPLC-ju. Pred začetkom analiz posameznih vzorcev smo preverili linearnost metode za standard rutin in kvercetin. Nadaljevali smo s preučevanjem vsebnosti rutina in kvercetina v zrnju in kaši tatarske ajde ter v različnih vrstah ajdove kaše. Ugotovili smo, da imajo različni vzorci navadne ajdove kaše različne vsebnosti rutina. Dokazali smo, da se pri hidrotermično obdelani kaši tatarske ajde rutin pretvarja v kvercetin počasneje kot v zrnih tatarske ajde. S spreminjanjem pogojev (temperatura in pH) smo želeli zaustaviti delovanje razgradnih encimov rutina, ki pretvarjajo rutin v grenek kvercetin. Encimi so bili najbolj aktivni pri pH 3 in temperaturi med 70 °C in 75 °C, najmanj pa pri pH 13 in temperaturah od 93 °C dalje.

Ekstrakcija kanabinoidov iz industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.), njihovi protimikrobni učinki in priprava emulzij s kanabinoidi

Živa Poberžnik, Katja Stopar, Tanja Bagar, Ilja Gasan Osojnik Črnivec

Šolski center Ravne na Koroškem- Gimnazija

mentorji: mag. Katja STOPAR, doc. dr. Tanja BAGAR, dr. Ilja Gasan OSOJNIK ČRNIVEC

Človek izkorišča vsestransko uporabnost konoplje že tisočletja- je bogat vir celuloznih vlaken, zakladnica fitokemikalij in perspektivno živilo. V nalogi smo se osredotočali predvsem na možnosti uporabe konoplje in njenih derivatov v medicinske in prehrabne namene. Namen naše naloge je bil ugotoviti, ali imajo petroletrni ekstrakti iz treh različnih sort industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) in komercialni pripravki (Hanfama, MediHemp) iz industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) protimikrobne učinke na vrste *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* in *Candida albicans*, kar smo preverili z difuzijskim antibiogramom. Zanimal nas je tudi profil kanabinoidov na izbrani stopnji rasti treh sort industrijske konoplje, in sicer profil posameznih delov rastline (seme, skaljeno seme, cvet, listi, steblo) zato smo ekstrakte, ki smo jih iz rastlinskega materiala pridobili s Soxhletovo ekstrakcijo, analizirali z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC). Pripravili smo emulzije olje/voda, ki so vsebovale petroletrne ekstrakte, in nato s spektrofotometrom merili njihovo obstojnost v odvisnosti s časom. Emulzije bi lahko v prihodnosti potencialno predstavljale inovativen način uživanja kanabinoidov.

Rezultati so pokazali protimikrobni učinek ekstraktov na vrsto *S. aureus* in niso pokazali protimikrobnega učinka na vrsti *E. coli* in *C. albicans*. Metoda HPLC je razkrila različno vsebnost kanabinoidov v posameznih delih rastline, največjo vsebnost kanabinoidov so pokazali ekstrakt cveta, ekstrakt listov v fazi cvetenja rastline in ekstrakt listov vegetativni fazi. S spektrofotometrijo smo merili absorbance emulzij in iz njih preračunali obstojnost emulzij. Rezultati so pokazali padanje obstojnosti v odvisnosti od časa.

Vse to predstavlja spodbudo za nadaljnje biomedicinske raziskave.

Ta čudoviti svet živalskih strupov

Prof. dr. Igor Križaj

Odsek za molekularne in biomedicinske znanosti, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana

Živalsko kraljestvo vsebuje več kot 100.000 strupenih vrst. Najdemo jih med strunarji (plazilci, ribe, dvoživke, sesalci), iglokožci (morske zvezde, ježki), mehkužci (polži stožci, hobotnice), kolobarniki (pijavke), nitkarji, členonožci (pajki, insekti, stonoge) in ožigalkarji (morske vetrnice, meduze, korale). Vsak posamezen strup je enkratna mešanica, običajno več kot 100 različnih farmakološko aktivnih peptidov in proteinov. Zbirka vseh, t.i. *venóm*, tako obsega na milijone različnih peptidov in proteinov, ki specifično interagirajo z vrsto zunanjih tarč, kot so ionski kanalčki, receptorji in encimi v celicah in na njihovi plazemski membrani. *Venóm* je še posebno zanimiv kot izjemen vir molekularnih orodij za raziskave kompleksnih fizioloških sistemov, med njimi centralnega in perifernega živčnega sistema, kardiovaskularnega sistema, sistema strjevanja krvi, hormonskega in imunskega sistema. *Venóm* predstavlja bogat rezervoar zdravilnih učinkovin, spojin vodnic za razvoj zdravil in diagnostičnih orodij. Kar nekaj zdravil na osnovi komponent *venóma* je že registriranih za uporabo v medicini, še več pa se jih nahaja v različnih fazah testiranja. Poznavanje *venóma* je tudi izjemnega pomena za razvoj bolj učinkovitih postopkov za zdravljenje zastrupitev. Tehnološke omejitve so vzrok, da je bil do danes temeljito raziskan le majhen delček *venóma*. Šele skokovit napredek proteomike, genomike in transkriptomike v zadnjih letih omogoča poglobljene raziskave živalskih strupov. V predstavitvi bom omenil naše glavne dosežke na tem področju.

Razvoj in validacija sistema za iskanje interakcijskih partnerjev DNA na osnovi označevanja bližnjih molekul z biotinom

Andreja Habič¹, Vojč Kocman², Brigita Lenarčič¹, Janez Plavec², Miha Pavšič¹

¹ Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

² Nacionalni center za NMR spektroskopijo visoke ločljivosti, Kemijski inštitut

mentorji: Vojč Kocman, Brigita Lenarčič, Janez Plavec, Miha Pavšič

Interakcije proteinov z DNA usmerjajo številne celične procese, npr. natančno časovno uravnavanje prepisovanja. Odkrivanje in razumevanje teh interakcij sta zelo pomembna, saj lahko pojasnita razvoj marsikatero bolezen in odpirata nove možnosti za zdravljenje. Metode za iskanje interakcijskih partnerjev znane DNA v splošnem omogočajo odkrivanje močnih in stabilnih interakcij, medtem ko šibkih in prehodnih pogosto ne moremo zaznati. Da bi omogočili odkrivanje tudi teh, smo razvili nov pristop za odkrivanje interakcijskih partnerjev DNA, zasnovan na principu označevanja bližnjih molekul z biotinom. Označevanje z biotinom izvedemo s trikomponentnim sistemom, sestavljenim iz DNA-zaporedja F-DNA in iz dveh fuzijskih proteinov: Tus-TurboID in GAL4(1–147)-sfGFP. F-DNA vsebuje preučevano zaporedje DNA in mesti za vezavo obeh fuzijskih proteinov, s čimer služi kot ogrodje za kolokalizacijo fuzijskih proteinov in iskanih interakcijskih partnerjev preučevane DNA. Fuzijski protein Tus-TurboID se nahaja med GAL4(1–147)-sfGFP in interakcijskimi partnerji preučevane DNA ter vsebuje encim biotin ligazo, ki ob dodatku biotina z njim označi bližnje proteine (GAL4(1–147)-sfGFP in iskane interakcijske partnerje). GAL4(1–147)-sfGFP pa omogoča preverjanje pravilnosti kolokalizacije komponent sistema in poteka biotinizacije. Po označevanju proteinov z biotinom se biotinizirane proteine izolira s testom "pull-down" in identificira z masno spektrometrijo. Sistem bo mogoče uporabiti tako *in vivo* kot *in vitro* – v tem primeru je potrebno trikomponentnemu sistemu dodati celični lizat kot zunanji vir proteinov. Z namenom optimizacije in validacije sistema smo zasnovali kontrolni *in vitro* sistem z znanim interakcijskim partnerjem, kar nam omogoča enostavno in cenovno ugodno optimizacijo, saj lahko pričakovane proteine zaznamo z uporabo protiteles. Uspešno smo pripravili vse tri komponente sistema, dokazali aktivnost biotin ligaze Tus-TurboID in s testom zamika elektroforezne mobilnosti pokazali, da se Tus-TurboID in GAL4(1–147)-sfGFP na F-DNA zares vežeta. Sledi optimizacija razmerij komponent in pogojev izvedbe biotinizacije ter uporaba sistema za iskanje interakcijskih partnerjev zaporedij DNA s še neznanimi fiziološkimi funkcijami.

Raziskovanje molekularnega ozadja bolezni pri Prader-Willijevem sindromu

Lea Knez¹, Janja Božič², Boris Rogelj^{1,2}

¹Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

²Inštitut "Jožef Stefan"

Mentorja: Janja Božič, Boris Rogelj

Prader-Willijev sindrom (PWS) je kompleksna multisistemska genetska bolezen, ki povzroča nevrološke, metabolne, endokrine in vedenjske motnje. Najbolj izstopajoča znaka bolezni sta hiperfagija in odsotnost občutka sitosti, ki lahko vodita do morbidne debelosti otroka že pri šestem letu starosti.

Bolezen je posledica pomanjkanja izražanja očetovsko podedovanih genov na 15q11.2-q13 genomski regiji. 4–6 Mb dolga kompleksna kromosomska regija vsebuje številne vtisnjene gene in veliko različnih vrst nekodirajočih RNA. Raziskave na mišjih in celičnih modelih ter klinične študije z mikrolelecijami so zožile kritično regijo PWS na gručo genov SNORD116, ki predstavlja glavno genetsko determinanto bolezni. Gensko gručo SNORD116 sestavlja 30 homologov, ki spadajo v družino malih nukleolarnih RNA s C/D ohranjenim motivom. Sekvenca SNORD116 ni komplementarna nobeni od kanoničnih RNA-tarč, zato ostaja vloga teh nekodirajočih RNA še neznana. Kljub temu, pa so ugotovili, da ektopično prekomerno izražanje SNORD116 v celični liniji HEK293T, ki endogeno ne izraža tega gena, spremeni izražanje več kot 200 protein-kodirajočih genov. To potrjuje, da ima SNORD116, pomembno regulatorno vlogo pri stabilnosti mRNA. Ravno iz tega razloga je ena izmed najpomembnejših nalog raziskav na tem področju iskanje in ovrednotenje nekanoničnih RNA-tarč družine SNORD116.

V našem laboratoriju se ukvarjamo z optimizacijo metode COMRADES (Cross-linking Of Matched RNAs And Deep Sequencing), s katero želimo ustvariti cDNA-knjižnico fizioloških RNA-RNA interakcij družine SNORD116 in jo primerjati z že ustvarjeno knjižnico z metodo PARIS (Psoralen Analysis of RNA Interactions and Structures). Metodi temeljita na modificirani spojini psoralena, ki omogoča reverzibilno prečno povezovanje molekul RNA, ki tvorijo interakcije *in vivo* v celicah. Iz interaktoma RNA-SNORD116 bomo s pomočjo bioinformatičnih metod izbrali najbolj verjetne potencialne tarče in jih validirali. Za validacijo tarč potrebujemo ustrezen celični model, zato s sistemom CRISPR/Cas9 izdelujemo celično linijo z izbito gensko gručo SNORD116, s katero bomo lahko določili biološko funkcijo te enigmatične gruče.

Rezultati naše raziskave bodo prispevali k razumevanju vloge SNORD116 pri patofiziologiji PWS in bi posledično lahko ponudili nove možnosti za tarčno usmerjene molekularne terapije, ki bi izboljšale kvaliteto življenja bolnikov.

Ali prekmurski sladki pelin vsebuje artemisinin?

Ana Rajh¹, Katarina Šebök¹, Mateja Godec¹, Darija Cör², Maša Knez Hrnčič²

¹ *Gimnazija Franca Miklošiča, Ljutomer*

² *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru*

Mentorji: Mateja Godec, Darija Cör, Maša Knez Hrnčič

Cilj najine raziskovalne naloge je bil dokazati prisotnost artemisinina v prekmurskem sladkem pelinu.

Pri raziskovalni nalogi sva uporabili rastlino, ki jo je vzgojil gospod Dean Korpič v okolici Murske Sobote.

Za dokazovanje učinkovitosti sladkega pelina sva izvedli in analizirali 24 vzorcev rastline. Za ekstrakcije sva uporabili tri različne vzorce: cvetove, liste in mešane dele rastline, ki so poleg cvetov in listov vsebovali še stebila. Zanimalo naju je ali zasledimo isto vsebnost učinkovine v vseh delih rastline ali pa se njena vsebnost v posameznih delih razlikuje. V vseh vzorcih ekstraktov sva dokazali prisotnost učinkovine – artemisinina. Rezultati HPLC-metode so pokazali, da se v cvetovih nahaja največ artemisinina (v povprečju 0,248 %), vendar to ne velja za vse ekstrakte. Največji delež artemisinina se je namreč nahajal v vzorcu iz listov te rastline.

Prav tako sva skušali ugotoviti s katerim topilom dobimo najboljši izkoristek ekstrakta. Za testiranje artemisinina sva izvedli ekstrakcije s tremi konvencionalnimi topili (metanol, etanol in 60 % vodna raztopina etanola), na podlagi katerih sva lahko določili prisotnost artemisinina v posameznih delih rastline. V šolskem laboratoriju sva za pridobivanje ekstraktov uporabili ekstrakcijo po Soxhletu in maceracijo. Kasneje sva ugotovili, da so ekstrakti pridobljeni po Soxhlet metodi imeli boljše izkoristke od tistih, ki sva jih pridobili z maceracijo. Pri vseh uporabljenih topilih pa sva v povprečju dobili enake izkoristke ekstraktov.

Artemisinin je vsekakor zdravilna učinkovina, zato bi bilo potrebno raziskave na prekmurskem sladkem pelinu v prihodnje še razširiti. Čeprav sva v najini raziskovalni nalogi dokazali dokaj mali delež artemisinina v rastlini, ne smemo zanemariti dejstva, da smo analizirali samo prisotnost artemisinina in ne njegovih derivatov, katerim lahko prav tako pripišemo zdravilne učinke.

Vpliv presnovnih procesov dveh izbranih vrst gliv na zmanjšano koncentracijo težkih kovin v onesnaženem substratu

Nika Ekart¹, Katja Holnthaner Zorec¹, Luka Šparl²

¹ *II. gimnazija Maribor*

² *Služba Krajinski park Tivoli, Rožnik in Šišenski hrib*

mentorja: Katja Holnthaner Zorec, Luka Šparl

V raziskovalni nalogi smo se ukvarjali z mikoremediacijo, oziroma remediacijsko sposobnostjo gliv. Glede na njihove sposobnosti bi jih lahko uporabljali kot način čiščenja področij onesnaženih z različnimi onesnaževalci, te so v našem primeru bile težke kovine (kadmij, baker in svinec).

Na obrežju reke Drave smo ob začetku raziskovanja odvzeli vzorce sedimenta, katerega smo kasneje uporabil v postavitvi okolji. Okolja so bila sestavljena iz dela micelijev gliv in dela sedimenta, ki smo ga želeli očistiti. Primerjali smo mikoremediacijsko sposobnost dveh vrst gliv, *Pleurotus ostreatus* in *Trametes versicolor*.

Da bi zagotovili zanesljivost naših rezultatov, smo izvedli še drugi del raziskave, kjer smo postavili okolja brez onesnaženega sedimenta, in namesto le tega micelijem obeh vrst gliv dodali znane koncentracije vseh treh težkih kovin.

Po 21 dnevnem preraščanju smo okolja razdrli in vzorce testirali v NLZOH v Mariboru.

Ob koncu raziskave smo odkrili, da je v sedimentu, najdenem na obrežju reke Drave, koncentracija kadmija in svinca presegala dovoljeno mejno vrednost, medtem ko je koncentracija bakra bila pod mejno vrednostjo.

Rezultati prvega dela eksperimenta so bili v primeru *Trametes versicolor* neodločilni, saj se je v nekaterih primerih koncentracija težkih kovin v sedimentu zvišala, kar je nemogoče. Remediacijska zmožnost *Pleurotus ostreatus* je bila medtem potrjena, saj je bila koncentracija vseh treh težkih kovin v sedimentu ob koncu eksperimenta nižja kot na začetku.

Rezultati drugega dela eksperimenta so bili blizu pričakovanim vrednostim, oziroma postavljenimi hipotezam in so se ujemali s pričakovanji, ustvarjenim glede na predhodno prebrano literaturo.

Odkrili smo, da *Pleurotus ostreatus* v primerjavi s *Trametes versicolor* akumuliral večjo koncentracijo kadmija, bakra in svinca iz postavljenega okolja.

Glede na dobljene rezultate smo prišli do zaključka, da sta obe vrsti gliv dobra remedianta, vendar so kljub temu potrebne še dodatne raziskave na tem področju, saj imajo glive na področju remediacije okolja veliki potencial.

Kanabinoidi- zdravilne učinkovine ali le mit?

Borut Štrukelj^{1,2}

¹Fakulteta za farmacijo UL, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

²Institut Jožef Stefan, Jamova 39, 1000 Ljubljana

Konoplja je botanično skupina treh vrst oziroma kultivarjev (*Cannabis sativa* var. *Indica*, *Cannabis sativa* in *Cannabis ruderalis*). Vse tri različice vsebujejo četrdeset različnih fitokanabinoidov, poleg tega pa tudi terpenoide, flavonoide in eterična olja. Kot zdravilna rastlina se uporablja že od antičnih časov, predvsem veliko v Indiji in na Kitajskem. V tradicionalni medicini so uporabljali konopljo za zdravljenje astme, bolečinskih stanj, depresije, menstrualnih krčev, proti slabosti, kašlju, vnetju, pa tudi kot anestetik in diuretik. V začetku 20. stoletja je postalo uživanje konoplje priljubljeno tudi v Evropi in ZDA, kjer se je konopljin tinktura uporabljala za zdravljenje krčev pri dojenčkih, tetanusa, kolere in stekline, obenem pa so pacienti uporabljali konopljo tudi za lajšanje simptomov motenj razpoloženja, kot so tesnoba, depresija, manija in histerija. Do leta 1940 je bila v ZDA izdelava pripravkov iz medicinske konoplje opisana kot monografija v Ameriški farmakopeji, kasneje pa so monografijo, po uvedbi Akta prepovedanih drogah, iz farmakopeje umaknili. V zadnjih nekaj letih je preučevanje kanabinoidov in njihovo farmakološko delovanje osrednja tema raziskovalnih laboratorijev širom po svetu. V prispevku bomo razjasnili dokazane farmakološke učinke in ugotovili dejansko uporabo izvlečkov konoplje pri zdravljenju in lajšanju patofizioloških stanj.

Selektivno zaviranje imunoproteasoma v premagovanju odpornosti kronične limfocitne levkemije na sodobna tarčna zdravila

Damjan Avsec, Marja Škrlić Miklavčič, Irena Mlinarič-Raščan

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Mentorica: Irena Mlinarič-Raščan

Kronična limfocitna levkemija (KLL) je s pojavnostjo 4–5 obolelih/100.000 prebivalcev letno najpogostejše hematološko maligno obolenje pri odraslih v Zahodnem svetu. Zanj je značilno progresivno kopičenje na videz zrelih, a funkcijsko nesposobnih monoklonskih CD5+, CD19+ limfocitov B v krvi, kostnem mozgu in limfnih vozlih. Zdravljenje KLL je dolga leta temeljilo na kemoimunoterapiji v obliki sheme FCR (fludarabin, ciklofosfamid in rituksimab). Z odobritvijo zaviralca Brutonove tirozin-kinaze ibrutiniba in zaviralca fosfatidilinozitol 3-kinaze idelaliziba v letu 2014 se je pričela doba tarčnih zdravil v KLL. Od 2016 je za zdravljenje KLL na voljo tudi antagonist antiapoptotičnega proteina Bcl-2 venetoklaks. Kljub izrazitemu izboljšanju kliničnih izidov bolnikov, neodzivnost na terapijo, številni neželeni učinki in pojav odpornosti na tarčna zdravila predstavljajo omejitve v obvladovanju KLL.

Namen našega dela je bil preučiti potencial imunoproteasoma kot tarče v KLL. Imunoproteasom je poglavitna oblika proteasoma v celicah imunskega izvora, vključno z limfociti B. Na *in vitro* modelu KLL (celice MEC-1) smo pokazali, da selektivni zaviralec imunoproteasoma ONX-0914 deluje koncentracijsko in časovno odvisno citotoksično ter sproži programirano celično smrt po mehanizmu apoptoze. Ker pri zdravljenju KLL pogosto kombiniramo več zdravil, smo preverili, ali zaviranje imunoproteasoma okrepi protirakavo delovanje tarčnih zdravil. Vzpostavili smo, da zaviranje imunoproteasoma z ONX-0914 deluje sinergistično citotoksično z ibrutinibom, idelalizibom in venetoklaksom. Da bi ovrednotili potencial selektivnega zaviranja imunoproteasoma v premagovanju odpornosti KLL, smo vzpostavili venetoklaks odporne celice MEC-1 VER tako, da smo celice MEC-1 več tednov gojili v prisotnosti naraščajočih koncentracij venetoklaksa. Primerjava jakosti delovanja zaviralca imunoproteasoma ONX-0914 na celicah MEC-1 in MEC-1 VER je razkrila, da pojav odpornosti na venetoklaks ne vpliva na njegovo aktivnost. Še več, dodatek 250 nM ONX-0914 premosti odpornost celic MEC-1 VER na venetoklaks.

Zaključimo lahko, da selektivno zaviranje imunoproteasoma izkazuje velik potencial tako za zdravljenje kot tudi za premagovanje odpornosti KLL na tarčna zdravila. Nadaljnje raziskave na primarnih celicah bolnikov s KLL bodo dokončno vzpostavile potencial imunoproteasoma kot tarče in selektivnih zaviralcev imunoproteasoma kot novih učinkovin v KLL.

Razvoj fluorescentnih probiotikov za njihovo spremljanje v različnih eksperimentih

Spase Stojanov^{1,2}, Špela Zupančič², Aleš Berlec^{1,2}

¹Odsek za Biotehnologijo, Institut »Jožef Stefan«

²Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani

mentorja: izr. prof. dr. Aleš Berlec, doc. dr. Špela Zupančič

Vaginalne okužbe so ena najpogostejših težav, ki zmanjšuje kakovosti življenja žensk po vsem svetu. Več kot 70% odraslih žensk se namreč v svojem življenju sooči s katero izmed vaginalnih okužb, proti katerim uporabljajo različne vrste zdravil, zlasti antibiotike in antiparazitike. Uporaba teh zdravil lahko povzroča neželene učinke, npr. pojav odpornih patogenov in ponovitev okužb. Da bi se izognili neželenim učinkom, potrebujemo nove pristope k zdravljenju vaginalnih okužb.

Naše telo je dom mnogim mikroorganizmom, ki se nahajajo na različnih površinah našega telesa, kot so prebavila, koža, ustna votlina in vagina, ter jih imenujemo mikrobiota. V vagini najdemo okrog 50 različnih vrst mikroorganizmov, med katerimi prevladujejo bakterije iz rodu *Lactobacillus*, in sicer *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. iners* in *L. plantarum*. Njihov upad povzroči razrast patogenih mikroorganizmov, kot so *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* in *Escherichia coli*, ki so odgovorni za pojav vaginalnih infekcij, kot sta bakterijska vaginoza in vaginalna kandidiaza. Ponovna vzpostavitev normalne mikrobiote v vagini z aplikacijo laktobacilov kot probiotikov lahko prepreči rast vaginalnih patogenov s proizvodnjo mlečne kisline, vodikovega peroksida in bakteriocinov.

V raziskavi smo želeli odpraviti dve pomanjkljivosti vaginalnih probiotikov, in sicer pomanjkanje optimalne farmacevtske oblike in pomanjkanje orodij za njihovo spremljanje po aplikaciji. V našem laboratoriju smo pripravili 4 različne vaginalne laktobacile, in sicer *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* in *L. plantarum*, ki izražajo fluorescentne proteine z različnimi spektralnimi lastnostmi, kar omogoča njihovo razlikovanje v mešanicah. Izražanje fluorescentnih proteinov omogoča varno in učinkovito spremljanje bakterij v raziskovalne namene, njihove porazdelitve in usode po aplikaciji v različnih oblikah (raztopina, poltrdna, trdna oblike) in pri različnih modelnih sistemih (celični modeli, tkiva, živali). Pripravljene bakterije bomo s pomočjo elektrostatskega sukanja vključili v polietilen oksidna nanovlakna, ki hkrati predstavljajo trdno farmacevtsko obliko in omogočajo sušenje probiotikov.

Pridobljeni rezultati bodo ključni pri nadaljnjem vgrajevanju nespremenjenih probiotikov in bodo predstavljali pomemben korak k razvoju novega probiotičnega zdravila, ki bo temeljil na nanotehnologiji.

Sinteza magnetnih nanoverig za ciljno dostavo zdravilnih učinkovin

Tamara Jarm¹, Deja Juriševič¹, Gašper Pernek¹, Črt Dragar², Slavko Kralj²

¹ Gimnazija Vič

² Institut Jožef Stefan

Mentorji: Slavko Kralj, Gašper Pernek, Črt Dragar

Cilj najine raziskovalne naloge je bil razviti postopek za sintezo magnetnih nanoverig, ki bi bile bolj učinkovite in varne za uporabo, poleg tega bi imele zadostno koloidno stabilnost in bi bile magnetno vodljive, hkrati pa bi lahko prenašale zadostno količino zdravilne učinkovine. V laboratoriju na Institutu Jožef Stefan, na Odseku za sintezo materialov K8, sva nanodelce najprej združili v nanoskupke, nato pa jih s pomočjo homogenega magnetnega polja uredili v nanoverige. Nanoverige sva nato delno izpraznili, in sicer z delnim raztapljanjem nanodelcev v nanoverigi, ter jih napolnili z zdravilno učinkovino (ibuprofen). Sintetizirane nanoverige sva ovrednotili s presežno elektronsko mikroskopijo (TEM) in tudi z drugimi analitičnimi metodami (porozimeter, magnetometer, termogravimetrična analiza), s katerimi sva dokazali uspešno napolnjenost nanoverig z zdravilno učinkovino.

Vloga polimorfizmov v izbranih genih pri odzivu na anti-TNF terapijo pri bolnikih s Crohnovo boleznijo

Aleks Brumec¹, Helena Lonjak¹, Katja Repnik², Uroš Potočnik^{2,3}

¹Prva gimnazija Maribor

²Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru

³Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru

mentorji: mag. Helena Lonjak, dr. Katja Repnik, dr. Uroš Potočnik

V raziskovalni nalogi smo raziskovali farmakogenetiko Crohnove bolezni (CB), obliko kronične vnetne črevesne bolezni (KVČB). Vzrok nastanka bolezni ni znan, znano pa je, da je bolezen posledica kombinacije okoljskih in genetskih dejavnikov. Namen te raziskave je poiskati nove gene oz. polimorfizme ter njihovo povezavo z odzivom na zdravljenje z anti-TNF terapijo, ki zavira fiziološki odziv na provnetni citokin TNF, ki vzpodbuja vnetje in je prisoten pri boleznih kot je KVČB. Terapija proti TNF se je izkazala kot zelo uspešna predvsem pri težjih oblikah bolezni, vendar je neodziv na terapijo prisoten pri okoli 30% bolnikov, zato je smiselno odkriti takšne genetske označevalce, s katerimi bi lahko že pred začetkom zdravljenja napovedali odziv na terapijo ter s tem zmanjšali obremenitev bolnika zaradi neučinkovite terapije kot tudi stroške zdravljenja. V naši raziskavi smo izbrali tri SNP-je, potencialno povezane z odzivom na anti-TNF terapijo. To so SNP-ji rs1061622 v genu *TNFRSF1B*, rs1800629 v genu *TNF* in rs1801274 v genu *FCGR2A* ter jih analizirali pri slovenskih bolnikih s CB, zdravljenimi z anti-TNF terapijo. Vzorce DNK smo pridobili iz biobanke Medicinske fakultete Univerze v Mariboru in jih genotipizirali z metodo PCR – RFLP, sam odziv na terapijo pa smo merili z uporabo IBDQ vprašalnika. Statistično smo podatke analizirali z uporabo programa SPSS. Ugotovili smo, da imajo bolniki z genotipom TT SNP-ja rs1801274 v genu *FCGR2A* boljši odziv po 4. in 12. tednu zdravljenja. Uspeli smo nakazati tudi na druge povezave med SNP-ji in odzivom na terapijo, vendar jih zaradi manjšega števila vzorcev nismo mogli dokazati.

Laboratorijska diagnostika okužb s koronavirusi.

Miroslav Petrovec

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

Laboratorijsko diagnostiko okužb s koronavirusi izvajajo laboratoriji z neposrednimi in posrednimi metodami. Med neposredne štejemo dokaz genoma, dokaz virusnih antigenov, osamitev virusov na celični kulturi in dokaz virusa z elektronsko mikroskopijo. Posredno dokazujemo okužbe z dokazom specifičnih protiteles usmerjenih proti antigenom virusa. V sodobnem času v vsakodnevni diagnostiki prevladuje laboratorijska diagnostika temelječa na dokazovanju virusnega genoma in metodi verižne reakcije s polimerazo (PCR), s katero dokazujemo tri različne gene koronavirusov. Je trenutno najbolj občutljiva in specifična metoda. Najbolj pogosta preiskovana kužnina je bris nosnega dela žrela, uporabne so tudi druge kužnine, veliko obeta vzorec sline. Dokaz specifičnih protiteles ni primerna diagnostična metoda za dokaz okužbe in ne dokazuje imunosti preiskovanca.

Kdo ali kaj je razlog za vnete dlesni? Bakterijski encimi gingipaini in škoda, ki jo povzročajo na dlesnih

Katarina Hočever^{1,2}, Matej Vizovišek¹, Alicia Wong³, Joanna Koziel³, Marko Fonović¹, Barbara Potempa⁴, Richard Larmont⁴, Jan Potempa^{3,4}, Boris Turk^{1,5}

¹ Oddelek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo, Institut »Jožef Stefan«

² Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana

³ Oddelek za mikrobiologijo, Fakulteta za biokemijo, biofiziko in biotehnologijo, Jagiellonska Univerza, Krakov, Poljska;

⁴ Oddelek za oralno imunologijo in infekcijske bolezni, Zobozdravstvena šola, Univerza Louisville, Louisville, ZDA;

⁵ Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

mentorja: Boris Turk, Jan Potempa

Se vam je že zgodilo, da si ščetkate zobe, izpljunete in v pljunku vidite kri? Večini svetovne populacije je ta prigoda poznana, saj se s tem sooča **več kot 75% prebivalstva**. Krvaveče in pordele dlesni so simptom vnetja dlesni, imenovanega gingivitis. Če gingivitisa ne zdravimo, se lahko razvije v paradontalno bolezen, ta pa se odraža v razgradnji dlesni, čeljustne kosti in izpadanju zob.

Eni izmed glavnih povzročiteljev gingivitisa so bakterije *P. gingivalis*, ki se razmnožujejo v obzobnih žepkih (prostorčki med dlesnijo in zobom). Poleg gingivitisa so te bakterije povezane tudi z Alzheimerjevo bolezenjo, revmatoidnim artritisom, aterosklerozo, rakom v ustni votlini itd. Zato je poznavanje njihovega delovanja ključno za iskanje zdravila za te težave.

Bakterije v okolico izločajo **gingipaine** - to so proteaze (encimi, ki cepijo proteine), ki so krive za največ težav pri paradontalni bolezni. Tekom našega dela smo raziskovali, katere proteine lahko gingipaini cepijo na površini celic dlesni in kako to vpliva na razvoj paradontalne bolezni.

Predstavljajmo si celico kot kroglo, iz katere štrlijo proteini. Gingipaini lahko površino celice pobrijejo t.j. te štrleče proteine odstrižejo tik ob celični membrani. Potem je površina celice spremenjena in njeno delovanje je drugačno, odcepljeni deli proteinov pa lahko reagirajo z okolico. Temu pojavu rečemo **šeding**.

Ugotovili smo, da pri nižjih koncentracijah gingipainov, ki so predstavljale začetno stanje bolezni, šeding poteka. Pri višjih koncentracijah, ki so sinonim za naprednejšo obliko bolezni, pa gingipaini celice najprej pobrijejo, nato pa razgradijo tudi odcepljene proteine.

Opazili smo, da gingipaini s površine odcepijo predvsem tiste molekule, ki skrbijo za stike med celicam. Te molekule so bistvene za obstoj celic, saj brez njih dlesnične celice odmrejo. Torej predvidevamo, da s temi cepitvami gingipaini sprožijo smrt celic. Kadar je gingipainov veliko, je tudi poškodovanih, odmrlih celic veliko in to se odraža kot odmiranje tkiva (dlesni) pri paradontalni bolezni.

Ciljanje glioblastomskih matičnih celic s kamelidnim nanotelesom proti FREM2 proteinu

Jovčevska Ivana¹, Šamec Neja¹, Zottel Alja¹, Kump Ana¹, Bolčina Lara^{1,2}, Krivec Eva^{1,3}, Muyldermans Serge⁴, Šribar Jernej⁵, Križaj Igor⁵, Stojan Jurij⁶, Komel Radovan¹

¹*Medicinski Center za Molekularno Biologijo, Inštitut za Biokemijo, Medicinska fakulteta Univerza v Ljubljani*

²*Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*

³*Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani*

⁴*Celična in Molekularna Imunologija, Vrije Universiteit Brussel, Bruselj, Belgija*

⁵*Inštitut Jožef Stefan*

⁶*Inštitut za Biokemijo, Medicinska Fakulteta, Univerza v Ljubljani*

Mentorji: Jovčevska Ivana, Šamec Neja, Zottel Alja

Možganski tumorji predstavljajo na svetovni ravni samo 1,35 % diagnosticiranih rakov. Kljub redki incidenci, glioblastom velja za najbolj agresivno in smrtonosno obliko malignega možganskega tumorja. V povprečju bolniki preživijo dve leti po postavljeni diagnozi. V prejšnji raziskavi (Vidak M. in sod., 2018) smo identificirali dva gena, *FREM2* in *SPRY1*, ki se diferencialno izražata v matičnih celicah glioblastoma. Z uporabo različnih proteomskih in transkriptomskih metod smo preučili njuno povezanost z glioblastomom (Jovčevska I. in sod., 2019). Najprej smo analizirali raven izražanja genov in njihovih proteinov v tkivih bolnikov z gliomi različnih stopenj. Nato smo z uporabo podatkov iz baze projekta The Cancer Genome Atlas pokazali povezanost med visoko ravno izražanja *FREM2* gena in podaljšanim preživetjem bolnikov z glioblastomom *IDH* divjega tipa.

Nanotelo proti FREM2 proteinu smo pridobili iz obstoječe knjižnice nanoteles. Pokazali smo, da se nanotelo veže na površino glioblastomskih matičnih celic. Analizirali smo tudi vpliv nanotelesa na celično viabilnost. Ugotovili smo, da nanotelo negativno vpliva na rast glioblastomskih matičnih celic brez da bi imelo učinek na rast ostalih celičnih linij. Izdelali smo tudi model vezave nanotelesa z antigenom. Naši rezultati kažejo, da je anti-FREM2 nanotelo specifično za matične celice glioblastoma. Menimo, da ima FREM2 pomembno vlogo pri gliomagenezi in je zato potrebno njegovo funkcijo podrobneje raziskati.

Vpliv genetske variabilnosti glutation S-transferaz na tveganje za pojav malignega mezotelioma

Maj Bavec¹, Marjeta Prašnikar¹, Katja Goričar²

¹Škofijska klasična gimnazija

²Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

Mentorici: Marjeta Prašnikar in Katja Goričar

Maligni mezoteliom (MM) je agresiven tumor, povezan z izpostavljenostjo azbestu. Genetska variabilnost proteinov, ki sodelujejo pri odstranjevanju kisikovih reaktivnih spojin (ROS), bi lahko vplivala na tveganje za nastanek MM. Glutation S-transferaze (GST) so proteini, ki odstranjujejo lipidne perokside iz celice. Geni za GST imajo prisotne polimorfizme, ki lahko vplivajo na učinkovitost odstranjevanja ROS in s tem na tveganje za nastanek MM. Namen raziskave je bil ugotoviti, ali polimorfizmi v genih *GSTM1*, *GSTT1* in *GSTP1* vplivajo na tveganje za nastanek MM ter nastanek metastaz pri MM.

Izvedli smo raziskavo primerov s kontrolami. Primerov je bilo 230, kontrol pa 212. Primeri so bili bolniki z MM, kontrole pa preiskovanci, ki so bili poklicno izpostavljeni azbestu in niso zboleli za nobeno azbestno boleznijo. Za določanje polimorfizmov v genih *GSTM1*, *GSTT1* in *GSTP1* smo uporabili verižno reakcijo s polimerazo in agarozno gelsko elektroforezo. Vpliv polimorfizmov na tveganje za pojav MM ali metastaz smo določali z logistično regresijo.

Bolniki, ki so imeli delecijo gena *GSTM1*, so imeli 2,6-krat manjšo verjetnost za pojav metastaz (razmerje oboj = 0,38; 95 % interval zaupanja = 0,17-0,83; $p = 0,016$). Ostali polimorfizmi v naši raziskavi niso vplivali na pojav metastaz, prav tako noben proučevan polimorfizem v genih za GST ni vplival na tveganje za pojav MM.

Analiza polietilena v kolenskih in kolčnih protezah z vibracijsko spektroskopijo

Matic Jože Grdadolnik¹, Arne Klemen Marušič¹, Alenka Mozer¹, Urban Novak²

¹Gimnazija Vič

²Kemijski inštitut

Mentorja: Alenka Mozer, dr. Urban Novak

Število ljudi z gibalnimi težavami zaradi okvar kolenskega ali kolčnega sklepa se hitro povečuje. Okvare sklepov, ki nastanejo zaradi staranja in različnih poškodb lahko pogosto odpravimo le z odstranitvijo okvarjenega sklepa in vsaditvijo novega, umetnega sklepa. Stroški takih operacij so izjemno visoki. Operacija zamenjave kolka, anestezija in štiri dnevna hospitalizacija naj bi v Sloveniji stale skoraj 10.000 evrov, v ZDA pa dobrih 20.000 evrov. Zaradi zapletov lahko stroški po nekaterih ocenah narastejo vse do 115.000 evrov. Zato je zelo pomembno, da sta umetni kolk ali koleno pred vsaditvijo brez napak v zgradbi, ki bi predstavljale nadaljnje težave po operaciji. Okužbe ali mehanske motnje materialov v umetnem sklepu ne bi smele biti razlog za ponovno operacijo.

Najšibkejšo točko v umetnih sklepih predstavlja polietilen visoke gostote in premreženosti (angleško UHMWPE – Ultra-high Molecular Weight Polyethylene). Uporablja se kot material za skodelico, ki drsi mimo glave stegenice iz titana. Četudi je UHMWPE trenutno najbolj primeren polimer za tako uporabo, lahko že majhne spremembe v njegovi kemijski zgradbi vplivajo na njegove mehanske lastnosti. Od teh je odvisno delovanje celotnega zamenjanega sklepa. Ker so mehanske lastnosti UHMWPE tesno povezane z njegovo kemično zgradbo, smo se pri preučevanju njegove strukture odločili za sistematično uporabo infrardeče (IR) in Ramanove spektroskopije. Iz vibracijskega spektra lahko razberemo podatke o kemijski zgradbi materiala. Nato lahko z našo metodo napovemo, ali je material primeren za nadaljnjo uporabo. Našli smo ustrezne spektralne parametre, ki so občutljivi na stopnjo kristaliničnosti, premreženosti in oksidacije. Te lastnosti materiala najbolj vplivajo na mehanske lastnosti polimera. Metodologijo smo preizkusili na vzorcih z znano strukturo.

Rezultati pridobljeni z uporabo vzorcev so pokazali, da je vibracijska spektroskopija hitro, učinkovito, neinvazivno in preprosto orodje za določanje stopnje oksidacije in kristaliničnosti UHMWPE. Te ugotovitve smo nato uspešno uporabili na pravih vzorcih poškodovanih umetnih sklepov.

Imajo gobe imunski sistem, s katerim se branijo pred škodljivci?

Jerica Sabotič

Odsek za biotehnologijo, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija

Goba je posebna oblika gliv, ki je namenjena njihovemu razmnoževanju. Tvorijo jih vrste iz dveh taksonomsko različnih skupin dikariontskih gliv, in sicer prostotrosnice (Basidiomycota) in zaprtotrosnice (Ascomycota). Ker imajo gobe ključno vlogo pri razmnoževanju, je njihova obramba pred različnimi škodljivci bistvenega pomena za preživetje. Glive se z različnimi strategijami branijo pred različnimi glivojedci in drugimi organizmi v okolju. Podobno kot pri rastlinah je njihova glavna obrambna strategija kemične narave, saj tvorijo toksine, s katerimi vplivajo na rast, razvoj ali preživetje svojih škodljivcev ali tekmecev. Poleg širokega nabora sekundarnih metabolitov uporabljajo glive tudi množico proteinov, ki delujejo kot odvrčilne snovi ali kot toksini. Številčnost in raznolikost strupenih proteinov je pri glivah osupljiva. Dve najbolj temeljito raziskani skupini proteinov so lektini in zaviralci proteaz, za katere velja, da so del obrambnega sistema gliv pred plenilci in zajedavci. V genomih gliv so ti obrambni proteini pogosto zapisani v več genih, ki se na genomu nahajajo blizu skupaj in njihova variabilnost spominja na variabilnost, ki jo najdemo v genih za protitelesa pri živalih in ljudeh. Proces tvorbe obrambnih molekul je natančno uravnan in omogoča vzpostavljanje stalne obrambe kot tudi sprožanje obrambe ob napadu določenih škodljivcev. Tako deluje tudi prirojeni imunski sistem pri rastlinah in živalih in zato bi lahko rekli, da ta verjetno predstavlja univerzalen način obrambe pri večceličnih organizmih.

Pomembnost sestave rastnega medija in mikro-atmosferskih pogojev za uspešno in vitro izolacijo in proliferacijo mezenhimskih matičnih celic iz različnih tkiv odraslih miši BALB/c

Maša Čater¹, Gregor Majdič^{1,2}

¹*Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani*

²*Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru*

Zahteve za optimalno rast matičnih celic se močno razlikujejo in so odvisne od živalske vrste in tkiva, iz katerega izvirajo matične celice. Najnovejše raziskave celo nakazujejo, da so zahteve lahko specifične tudi znotraj vrste med posameznimi linijami. V naši raziskavi smo uporabljali odrasle miši BALB/c, iz katerih smo izolirali matične celice iz štirih različnih tkiv: mod, maščobe, mišice in možganov. Za optimizacijo tako same izolacije kot tudi *in vitro* proliferacije matičnih celic smo testirali dva rastna medija in dve različni atmosferi. Prvi rastni medij je bil komercialni medij MesenCult, ki velja za standardni osnovni medij za rast mišjih mezenhimskih matičnih celic in ne vsebuje govejega seruma. Rast matičnih celic v MesenCultu smo primerjali z rastjo v mediju A20, ki smo ga razvili v našem laboratoriju s pomočjo modifikacije rastnega medija Animacel in je vseboval povečano koncentracijo govejega seruma. Poleg medijev smo primerjali rast tudi pri različnih atmosferskih pogojih; v normoksiji (21 % kisika, 5 % ogljikovega dioksida, ostalo dušik) in hipoksiji, kjer je bila koncentracija kisika znižana na 2 %. Ob uporabi standardnega medija MesenCult je prišlo do nezaželenega pojava zgodnje spontane diferenciacije celic, izoliranih iz maščobe, mišice in mod, medtem ko je bila izolacija celic iz možganov popolnoma neuspešna. Z novo dizajniranim medijem A20 smo uspeli uspešno izolirati matične celice iz vseh štirih tkiv in ohraniti njihovo matičnost skozi več pasaž. Atmosferski pogoji so se izkazali za enako pomembne za uspešno proliferacijo celic kot rastni medij, pri čemer smo ugotovili, da je vpliv vsebnosti kisika na rast celic izjemno različen in odvisen od vira celic oziroma izhodiščnega tkiva. Ugotovili smo, da lahko z optimiziranim rastnim medijem ter z uravnavanjem koncentracije kisika v atmosferi uspešno pridobivamo matične celice iz različnih tkiv odraslih miši BALB/c.

Podatkovno rudarjenje genske ekspresije tekom razvoja *Dictyostelium discoideum*

Karin Hrovatin¹, Mariko Katoh-Kurasawa², Gad Shaulsky², Blaž Zupan¹

¹Laboratorij za bionformatiko, Fakulteta za računalništvo in informatiko, Univerza v Ljubljani

²Oddelek za molekularno in humano genetiko, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, ZDA

Mentorja: Gad Shaulsky, Blaž Zupan

Ameba *Dictyostelium discoideum* je modelni organizem, ki se uporablja za razumevanje celične biologije. Ob neugodnih razmerah se amebe *D. discoideum* združijo v večcelično strukturo namenjeno razmnoževanju. Pri tem preidejo skozi več razvojnih stopenj. Cilj projekta je bil odkriti metabolne poti vključene v razvoj *D. discoideum*.

Za podatkovno rudarjenje smo uporabili podatke RNA sekvenciranja tekom razvoja divjega tipa in sevov z mutacijami v razvojnih regulatornih genih. Za te mutante je značilen nenormalen razvoj ali obstanek v razvojni stopnji, preko katere se sev ne more razviti.

Gene vključene v normalen prehod med razvojnimi stopnjami smo poiskali v divjem tipu na podlagi diferenčnega izražanja tekom razvoja. Za te skupine genov so bile najbolj značilne obogatitve za genske skupine signalizacije, celičnega cikla, adhezije in metabolizma ogljikovih hidratov. Da bi odkrili metabolne poti ohranjene v mutantih smo poiskali gene, ki so so-izraženi z drugimi geni znotraj posameznih sevov in tako potencialno vključeni v tesno regulirane metabolne poti. Kandidatne gene, ki so bili prisotni v več sevih, smo razdelili v skupine z gručenjem po metodi Louvain na podatkih izraženosti. S tem smo odkrili 21 gruč genov, mnoge izmed katerih so bile močno obogatene za znane genske skupine.

Da bi bolje razumeli metabolizem posameznih fenotipskih skupin mutantov smo poiskali gene z nenormalno metabolno okolico v teh mutantih. Za to smo poiskali gene, ki so tesno so-izraženi z drugimi geni (tj. sosedi) v divjem tipu, vendar si s taistimi sosedi niso blizu v mutantih. Večina mutantov, ki se je ustavila v kasnejših razvojnih stopnjah, je imela podoben, a manjši, set genov s spremenjeno metabolno okolico kot manj razviti mutanti.

Nekateri mutanti so tekom razvoja ponovno prešli v zgodnejše razvojne fenotipe. Poiskali smo gene, ki so bili čezmerno izraženi tekom tega prehoda. Te geni so bili obogateni za genske skupine signalizacije, mnogi izmed njih pa niso bili vključeni v že znane genske skupine.

Antibakterijsko delovanje rastlinskih in čebeljih pripravkov na bakterijo *Staphylococcus aureus*

Žiga Česen, Ana Mestinšek Mubi, Marjetka Kastelic Švab

Biotehniški center Naklo

Mentorica: mag. Marjetka Kastelic Švab, prof. biol., gosp.

Gnojne okužbe z bakterijo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) so zelo pogoste in velikokrat lahko vodijo do zapletov, če jih ne pričnemo zdraviti dovolj zgodaj. Gre za zelo agresivno bakterijsko vrsto, ki lahko postane odporna tudi na antibiotike (MRSA: proti meticilinu odporni *S. aureus*). Pred izvedbo raziskovalne naloge nas je zanimalo, če je stafilokokne gnojne okužbe možno zdraviti le s sintetično pridobljenimi antibiotiki oziroma, če bi lahko kot zdravilo ali za pomoč pri zdravljenju uporabljali tudi kemoterapevtike, ki jih lahko pripravimo v obliki hidrolatov in mazil. Velikokrat se namreč sprašujemo, kako so tovrstne poškodbe zdravili v preteklosti in kako učinkovito je alternativno zdravljenje danes. Da bi to ugotovili, smo odvzeli sladkorni bolnici bris gnojne diabetične razjede ter izolirali čisto kulturo *S. aureus*. Bakterijsko vrsto smo identificirali z barvanjem po Gramu, katalaznim in oksidaznim testom, opazovanjem hemolize ter določanjem morfoloških značilnosti kulture. Nato smo pripravili suspenzije različnih čebeljih izdelkov (gozdni, gorenjski, mediteranski, kostanjev, cvetlični in repični med, medeni mix, propolis) ter hidrolate kamilice, hmelja, konoplje, žajblja, trpotca, spiruline, ameriškega slamnika in ognjiča, ki smo jih z diferencialno destilacijo pridobili v laboratoriju. Uporabili smo tudi vlažilno hmeljevo kremo, gel aloe vere in macerat avokada. Izvedli smo difuzijske antibiogramе z devetnajstimi potencialno protimikrobno prepoznanimi rastlinami in čebeljimi izdelki. Celotno raziskavo smo opravili v šolskem mikrobiološkem laboratoriju. Z raziskavo smo dokazali, da najbolj učinkovito na *S. aureus* deluje propolis. Njegovo delovanje je primerljivo z delovanjem antibiotikov Amikacin in Norfloxacin, ki delujeta bakteriocidno na povzročitelja gnojnih razjed *S. aureus*. Poleg tega pa so šibkeje antibakterijsko delovali tudi hidrolat ameriškega slamnika, hidrolat ognjiča, vlažilna hmeljeva krema, suspenzija gozdnega medu in gel aloe vere.

Kvantitativno določanje biološko aktivnih učinkovin v navadni konoplji (*Cannabis sativa* subsp. *sativa* L.) in njena mikrobiološka kakovost

Luka Irenej Pečan¹, Roman Štukelj², Karmen Godič Torkar³, Marko Jeran^{2,4}

¹Gimnazija in veterinarska šola, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana

²Laboratorij za klinično biofiziko, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani

³Oddelek za sanitarno inženirstvo, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani

⁴Laboratorij za fiziko, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Mentorji: Marko Jeran, Roman Štukelj, Karmen Godič Torkar

Ponovni preporod raziskav konoplje, njena terapevtska obetavnost in klinična pomembnost so bila temeljna izhodišča za raziskovalno delo. Tradicionalno se navadno konopljo prideluje zaradi stebel in semen, v zadnjem času pa se je razširila tudi uporaba zelenih delov rastline (posušenih vršičkov), ki vsebujejo sekundarne metabolite kanabinoide. Vse večja uporaba konoplje in njenih derivatov v prehrani, medicini, kozmetiki in podobno, je odprla tudi vprašanje vpliva skladiščenja posušenih rastlinskih delov na njeno končno kakovost.

V raziskovalnem delu smo izvedli kemijsko in mikrobiološko analizo desetih sort konoplje za industrijski namen. V kemijskem delu smo z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC) ugotavljali vsebnost kanabinoidov v posušenih vršičkih konoplje iz dveh različnih rastnih sezon, kjer so izvajali sortni poskus za stebela (CRP projekt V4-1611). Ugotovili smo, da ima samo sorta Futura-75 skupno koncentracijo kanabidiola ($w_t\%$) v mejah sortne specifikacije (1,50 – 2,00 %), medtem ko je bila njegova koncentracija v preostalih devetih sortah iz obeh sezon pod spodnjo mejo specifikacije za posamezno sorto. Izmerjene vsebnosti Δ -9-tetrahidrokanabinola so se gibale v območju od 0,01 % pri sorti Uso-31, do 0,63 % pri sorti Antal. Vsi vzori so imeli skupni % Δ -9-tetrahidrokanabinola pod dovoljeno mejo 0,20 %, razen sorti Tizsa in Antal.

V mikrobiološkem delu smo v vzorcih konoplje po skladiščenju ugotavljali prisotnost in število tistih mikroorganizmov, ki jih Smernice za mikrobiološko varnost živil predpisujejo za uporabo pri pripravi zeliščnega poparka. Vsi vzorci so bili glede na normative skladni z zakonodajo. Ugotovili smo razlike v mikrobiološki kakovosti med posameznimi sortami, ki so bile sicer gojene v identičnih rastnih pogojih in kasneje obravnavane enako v vseh fazah skladiščenja. Analiziran rastlinski material je tako mikrobiološko in kemijsko varen za uporabo v prehrani ljudi.

OSTALI POVZETKI

Razmerje med strukturo in delovanjem izbranih rastlinskih fenolov in njihov mehanizem inhibicije katepsinov B in L

Liza Ulčakar, Marko Novinec

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: Marko Novinec

Katepsina B in L sta reprezentativna člana družine papainu podobnih peptidaz in se izražata v vseh človeških tkivih. Katepsin L je endopeptidaza, katepsin B pa ima lahko tako dipeptidilpeptidazo kot tudi endopeptidazno aktivnost. Oba encima med drugim sodelujeta pri nespecifični razgradnji proteinov ter procesiranju antigenov. Prekomerna aktivnost obeh encimov je povezana s številnimi bolezenskimi stanji kot so metastaziranje tumorjev, ateroskleroza in revmatična obolenja. Oba encima sta regulirana z endogenimi proteinskimi inhibitorji, znani pa so tudi eksogeni ortosterični in alosterični malomolekulski inhibitorji.¹

V literaturi je bila že dokazana in okarakterizirana inhibicija katepsina C s klorogensko in kavno kislino.² V naši raziskavi smo preizkusili vpliv teh dveh kislin in nekaterih drugih rastlinskih fenolov na aktivnost katepsinov B in L. Poleg klorogenske in kavne kisline smo testirali še cimetovo, ferulno, sinapinsko in *p*-kumarno kislino ter resveratrol. Zanimalo nas je, kako se mehanizem in moč inhibicije z enakimi spojinami razlikujeta med katepsinom B in L. Prav tako nas je zanimalo, kakšen vpliv na inhibicijo imajo različne substituentne in njihovi položaji na osnovnem fenolnem skeletu.

Aktivnost encimov smo merili fluorimetrično s sintetičnima fluorogenima substratoma Z-LR-AMC (katepsin L) in Z-FR-AMC (katepsin B). Cimetova, ferulna, sinapisna in *p*-kumarna kislina so oba encima inhibirale zelo šibko. Kavna in klorogenska kislina ter resveratrol pa so oba encima inhibirali z višjo afiniteto, zato smo okarakterizirali še njihov mehanizem inhibicije. Katepsin L so vse tri spojine inhibirale z linearnim uravnoteženim mešanim mehanizmom. Inhibicija katepsina B s kavno kislino je bila linearna akompetitivna, s klorogensko kislino pa linearna uravnotežena mešana. Inhibicija z resveratrolom je bila pri pH 5,5 počasna, pri pH 7,4 pa hitra, kar bi lahko pomenilo, da se resveratrol veže v okolico vezavnega mesta za substrat. Resveratrol, kavna in klorogenska kislina se od ostalih šibkih inhibitorjev razlikujejo po dodatni hidroksilni skupini na mestu *meta*, ki je očitno pomembna za vezavo fenolne spojine na katepsina B in L.

1. M. Novinec, B. Lenarcic: Papain-like peptidases: Structure, function, and evolution. *Biomol. Concepts* **2013**, 4(3), str. 287–308.
2. M. Rebernik, T. Snoj, M. Klemenčič, M. Novinec: Interplay between tetrameric structure, enzymatic activity and allosteric regulation of human dipeptidyl-peptidase I. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, 675, str. 108121.

Identifikacija proteinskih tarč derivata pirazola v bakteriji *Escherichia coli*

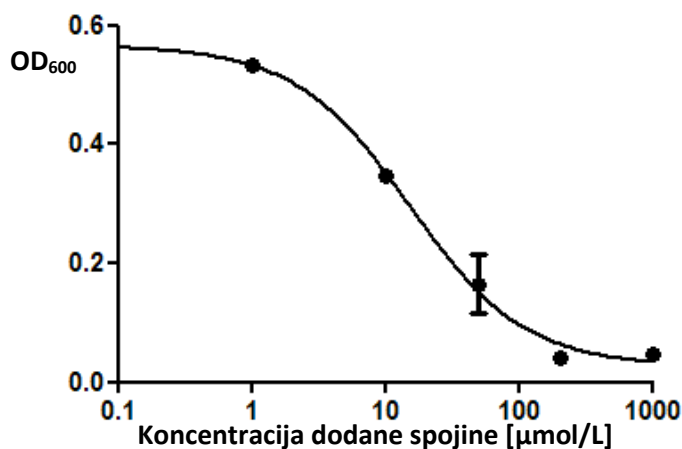
Nika Mikulič Vernik, Marko Novinec

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentor: dr. Marko Novinec

Kemoterapevtiki so kemični agensi, ki se uporabljajo za zdravljenje ali kontrolo različnih bolezni, predvsem zavirajo razmnoževanje različnih patogenov. Mikroorganizmi pa lahko pridobijo odpornost na antimikrobne učinkovine kljub temu, da so bili v osnovi nanje občutljivi. Skoraj vsi mikroorganizmi, ki proizvajajo antibiotike, v svojem genomu vsebujejo zapis za odpornost nanje (zapis na bakterijskem kromosomu, R plazmidu ali transpozonu), zaradi horizontalnega prenosa genov pa je možno, da se ta prepis prenese tudi na ostale, ali pa do odpornosti pride zaradi spontanah naključnih mutacij. Danes mnoge infekcijske bolezni povzročajo prav odporni sevi mikroorganizmov, kar je razlog za probleme v zdravljenju in naraščajočo ceno. Odkrivanje novih protimikrobnih učinkovin in njihove biološke funkcije je zaradi tega za zdravstvo odločilnega pomena.

Izmed skupine sintetičnih spojin derivatov pirazola smo izbrali 4-(2-aminoetil)-1-(piridin-2-il)-1H-pirazol-5-ol, ki je povzročal zaustavitev rasti bakterije *Escherichia coli*. Z dilucijskim antibiogramom smo preliminarno določili minimalno inhibitorno koncentracijo delovanja spojine, za katero lahko trdimo, da je okoli 100 $\mu\text{mol/L}$ * (slika 1).



Slika 1: Optična gostota kulture bakterije *E. coli* glede na koncentracijo dodane spojine

Spojino smo imobilizirali na afinitetni nosilec in z afinitetno kromatografijo iskali njene proteinske tarče v celičnem lizatu bakterije *Escherichia coli*. NaDS-PAGE analiza eluatov je pokazala prisotnost dveh močnih lis pri okoli 25 kDa in 40 kDa. Celoten vzorec smo poslali na analizo vsebnosti proteinov z masno spektrometrijo. Rezultati analize so pokazali, da sta v eluatu v večji koncentraciji prisotna predvsem dva proteina – Fe-S podenota suksinat dehidrogenaze in treonin dehidrogenaza. Spojina torej vpliva neposredno na metabolizem bakterijske celice.

*zaradi izrednih okoliščin eksperimentov nismo uspeli ponavljati, zato nismo uspeli določiti natančnejše minimalne inhibitorne koncentracije ali minimalne baktericidne koncentracije.

Genetsko ozadje družinskih eritrocitoz v Sloveniji

Eva Drnovšek¹, Julija Lazarevič¹, Martina Fink³, Saša Anžej Doma³, Špela Žula³, Aleša Kristan², Helena Podgornik³, Tadej Pajič³, Nataša Debeljak², Irena Preložnik Zupan³

¹*Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*

²*Medicinski center za molekularno biologijo, Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani*

³*Klinični oddelek za hematologijo, Interna klinika, UKC Ljubljana*

Mentorici: Nataša Debeljak, Irena Preložnik Zupan

Izhodišče: Eritrocitoza pomeni povečano maso eritrocitov v krvi. Poznamo primarne zaradi motenj znotraj kostnega mozga in sekundarne zaradi motenj izven kostnega mozga. Obe delimo na prirojene (družinske) in pridobljene. Najbolj znana primarna pridobljena je prava policitemija s spremembami v genu *JAK2*, sekundarne pridobljene so posledica pljučnih, srčnih, ledvičnih bolezni. Družinske eritrocitoze (DE) so skupina redkih dednih bolezni s spremembami v genih, vključenih v zaznavo ravni kisika v krvi ali vezavo kisika na hemoglobin.

Namen: Opredelitev genetskega ozadja eritrocitoz je pomembna za izbiro zdravljenja. V Sloveniji določajo prisotnost različic *JAK2*, ne pa genetike v smeri DE. Namen retrospektivne raziskave je bil opredeliti ozadje eritrocitoz z novim diagnostičnim algoritmom, opraviti genetsko analizo pri sumu na DE in jo vpeljati v redno klinično prakso.

Metode: Vključili smo bolnike, obravnavane med letoma 2011 in 2019 v UKC Ljubljana, s hematokritom in/ali hemoglobinom nad referenčnimi vrednostmi vsaj dvakrat v razmaku $\geq$ dveh mesecev. Pridobili smo podatke o pridruženih boleznih, življenjskem slogu in rezultatih preiskav. Pri sumu na DE smo opravili genetsko analizo z metodo nove generacije sekvenciranja (NGS) s kliničnim panelom, ki omogoča analizo genov povezanih z DE (24 genov) in hemokromatozo (15 genov).

Rezultati: Znotraj ~200.000 bolnikov z analizo krvne slike v izbranem obdobju je imelo 121 bolnikov *JAK2* negativno eritrocitozo. Od tega je imelo sekundarno pridobljeno eritrocitozo 32 (26%) bolnikov, 75 (62%) bi potrebovalo nadaljnjo diagnostiko za natančno opredelitev, 14 (12%) pa je bilo kljub ustrezni diagnostiki idiopatskih. Z analizo NGS smo do sedaj pri enem bolniku potrdili že znano vzročno različico rs137853036 v genu *EPAS1* in tako družinsko eritrocitozo tipa 4 (ECYT4). Novo odkrite različice še raziskujemo.

Zaključek: Opredelili smo 32 bolnikov s sekundarno pridobljeno eritrocitozo. Pri enem smo postavili diagnozo prirojene ECYT4. Vpliv odkritih novih različic bomo opredeljevali s funkcijskimi analizami.

Vpliv kovinskih ionov na aktivnost izbranih katepsinov

Milica Janković, Primož Bembič, Marija Kisilak, Marko Novinec, Iztok Turel

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

Mentorja: Marko Novinec, Iztok Turel

Katepsini, proteaze iz skupine papainu podobnih encimov imajo v celici pomembno vlogo pri ohranjanju homeostaze. Sodelujejo pri procesih znotrajcelične razgradnje proteinov, pretvorbi zunajceličnega matriksa, rasti kosti ter procesiranju proteinov. Prekomerna aktivnost oz. nepravilno delovanje katepsinov je zaradi tega povezano s številnimi patološkimi stanji.

V okviru raziskovalnega dela smo preučevali vpliv in mehanizme delovanja izbranih kovinskih ionov (Cd^{2+} , Ce^{3+} , Ce^{4+} , Ga^{3+} , La^{3+} , Pb^{2+} , Zn^{2+}) na katepsine B, L, K in S (cisteinske proteaze). V vseh primerih smo vpliv in mehanizem delovanja kovinskih ionov najprej določali s spremljanjem hidrolize ustreznih sintetičnih substratov. Za izbrane kovinske ione smo pripravili diagrame specifične hitrosti, na osnovi katerih smo določili ustrezne kinetične parametre za posamezen kovinski ion. Rezultati, ki jih dobimo z meritvami razgradnje sintetičnega substrata, ne veljajo nujno za naravne substrate, zato smo izvedli tudi kvantitativne analize aktivnosti katepsinov v prisotnosti visokih koncentracij kovinskih ionov, pri čemer smo kot substrat uporabili netopen elastin, kolagen ali azokazein.

Ugotovili smo, da imajo različni kovinski ioni različne mehanizme delovanja na posamezne katepsine. Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} ioni so v vseh primerih delovali kot linearni oz. popolni inhibitorji encimske aktivnosti. Ce^{4+} ioni so se v vseh primerih obnašali kot hiperbolični oz. delni inhibitorji, bodisi po mehanizmu mešane (katepsin K) ali kompetitivne (katepsini B, S in L) inhibicije. Ga^{3+} in La^{3+} ioni pri katepsinu L delujejo kot popolni inhibitorji, pri preostalih treh katepsinih pa kot delni inhibitorji, pri čemer pri katepsinu K in S delujejo po mehanizmu mešane, pri katepsinu B pa Ga^{3+} ioni delujejo po mehanizmu kompetitivne inhibicije. Podobno kot Ga^{3+} in La^{3+} se obnašaja tudi Ce^{3+} ioni, s to razliko, da v primeru katepsina B delujejo kot popolni inhibitorji.

Rezultate lahko deloma interpretiramo s pomočjo koncepta trdih in mehkih kislin oz. baz (HSAB). Tiolna skupina v aktivnem mestu cisteinskih proteaz predstavlja mehko bazo, ki močneje interagira z mehкими kislinami, kar se odraža v obliki kompetitivne inhibicije. V primeru trdih kislin je interakcija z mehko bazo šibkejša, posledično imamo zgolj delno inhibicijo.

Analiza robustnosti sintetičnega gensko regulatornega omrežja pri načrtovanju biološkega procesorja

Jurij Nastran, Žiga Pušnik, Miha Moškon

Fakulteta za računalništvo in informatiko, UL

Mentorja: Miha Moškon, Žiga Pušnik

V okviru raziskovalne naloge demonstriramo nove metode analize matematičnega modela programabilnega biološkega procesorja. Teoretični model procesorja je sestavljen iz oscilatorja, programskega števca, programa shranjenega v ukaznem pomnilniku in dekodirne logike. Naslavljanje ukazov v pravilnem vrstnem redu je doseženo z Johnsonovo izvedbo programskega števca, ki vrši preklope stanj ob pozitivni fronti biološkega oscilatorja. Za izvedbo biološkega programa z več ukazi je potreben večji števec, njegova skalabilnost pa predstavlja potencialen problem predlagane topologije biološkega procesorja.

Simulacija delovanja procesorja pri danem naboru parametrov poteka z reševanjem sistema diferencialnih enačb, ki opisujejo dinamiko sintetičnega gensko regulatornega omrežja. Na podlagi 12 med seboj neodvisnih parametrov lahko s simulacijo določimo, ali je potek delovanja procesorja dopusten. Za ocenitev robustnosti procesorja računamo torej volumen hipertelesa vseh dopustnih naborov parametrov v 12-dimenzionalnem prostoru.

Za računanje volumna uporabimo tako imenovane 'glokalne' metode, ki temeljijo na globalnem in lokalnem preiskovanju visokodimenzionalnega prostora zadovoljivih rešitev. Implementiramo genetske algoritme ter večkratno vzorčenje v predelih prostora, določenih z metodo glavnih komponent. Pridobljene dopustne točke nato poskušamo čim bolj optimalno omejiti za učinkovito merjenje volumna telesa na podlagi razmerja naključnih vzorčenj dopustnih točk.

Za omejujoče telo izberemo hiperelipsoide namesto standardnih hiperkvadrov ter demonstriramo njihovo uporabnost pri računanju robustnosti biološkega procesorja. Hiperelipsoide prilegamo točkam na podlagi elipsoidne metode, s pomočjo katere nam uspe povečati učinkovitost merjenja volumna za več kot magnitudo. Za enako natančno oceno robustnosti biološkega procesorja potrebujemo po implementaciji elipsoidne metode tudi do 20-krat manj vzorčenj. Z navzkrižnim preverjanjem ugotovimo tudi, da uporaba hiperelipsoidov ne pomeni občutnega povečanja volumna izpuščenih dopustnih točk, kar potrdi uporabnost novega pristopa.

V okviru našega dela tako demonstriramo učinkovitost novih metod za ocenjevanje robustnosti predlaganega biološkega procesorja. Do podobnega problema merjenja volumna v visokodimenzionalnem prostoru naletimo tudi pri merjenju robustnosti podobnih modelov drugih bioloških sistemov. Zato so naše metode uporabne tudi v sorodnih problemskih domenah ter imajo potencial, da tudi druge vodijo do veliko učinkovitejše ocene robustnosti.

Ali lahko s pomočjo spektroskopije razložimo vpliv epigenetskih sprememb na potek bolezni?

Gregor Kržmanc¹, Tadej Strah¹, Uroš Javornik², Janez Plavec², Alenka Mozer¹

¹Gimnazija Vič

²Kemijski inštitut

Mentorji: Uroš Javornik, Janez Plavec in Alenka Mozer

Študije nekanoničnih struktur DNK pomagajo razumeti njihovo vlogo pri razvoju bolezenskih stanj ter odkrivanju potencialnih tarč za vplivanje na razvoj bolezni. Metilacija citozinskih organskih baz je epigenetski proces, ki lahko vpliva na izražanje genov. Študije kažejo, da metilacijski vzorci na z gvaninom bogati promotorski regiji Pu39 antiapoptotskega gena *BCL-2* pomembno vplivajo na izražanje gena. Motnje v izražanju omenjenega gena so povezane z rakavimi obolenji in drugimi boleznimi. V tej raziskavi z uporabo UV, CD in NMR-spektroskopije preučujemo vpliv CpG-metilacije na strukturo zaporedja BCL2MidG4, ki je del regije Pu39.

Naši rezultati kažejo, da lahko v vzorcih s CpG-metiliranimi in nemetiliranimi BCL2MidG4-oligonukleotidi pod določenimi pogoji hkrati soobstajajo G-kvadrupleksi, i-motivi in vijačnica B-DNK, vendar v prisotnosti obeh verig DNK unimolekularni G-kvadrupleksi ne morejo tekmovati z B-DNK, i-motivi pa se razvijejo že pri pribl. 20 °C. Rezultati kažejo, da metilirani oligonukleotidi tvorijo bolj stabilno dvojno vijačnico s približno 3 °C višjo T_m . Poskusi z modificiranim zaporedjem BCL2Mid so pokazali, da metilacija rahlo poviša stabilnost tvorjenih G-kvadrupleksov v enojni verigi. Iz dobljenega sklepamo, da metilacija ob prisotnosti obeh komplementarnih verig BCL2MidG4 stabilizira tako dvojno vijačnico kot G-kvadruplekse, a je vpliv stabilizacije večji pri vijačnici. Naša opažanja podpirajo teorijo, da sprememba stabilnosti sekundarnih struktur vpliva na regulacijske mehanizme izražanja gena *BCL-2*. Vse opažene strukture tvorjene iz metilirane DNK so bolj stabilne od nemetiliranih, kar se lahko odraža v nižjem izražanju gena.

Bazične raziskave, kot je naša, so pomembne za razumevanje temeljnih bioloških celičnih procesov in tako razvoja bolezenskih stanj. Epigenetski procesi predstavljajo obetavne tarče za zdravljenje določenih bolezni.

Epigenetika, most med okoljem in geni

Katarina Kouter¹, Iris Šalamon¹, Tomaž Zupanc², Alja Videtič Paska¹

¹*Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani*

²*Inštitut za sodno medicino, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani*

Leta 1942 je Waddington s pojmom epigenetika poimenoval vpliv okoljskih dejavnikov na genom. Gre za način komunikacije okolja z genomom. Pojem epigenetika vključuje tri različne načine komunikacije okolja z genomom; metilacijo DNA, posttranslacijske spremembe histonov in delovanje nekodirajočih RNA. Metilacija DNA na genom vpliva preko procesa metilacije citozinov v CpG otočjih, kar lahko privede do spremenjenega vzorca in stopnje izražanja genov. Posttranslacijske spremembe histonov vključujejo različne spremembe histonskih repov, kot sta npr. acetilacija in metilacija. Prva vpliva na povišano izražanje genov, druga pa izražanje zavira. Nekodirajoče RNA omogočijo razgradnjo mRNA že prepisanih genov, kar deluje zaviralno na prepisane gene.

Področje epigenetike doživlja svoj razcvet zadnjih 20 let, število raziskav pa z leti močno narašča. Epigenetski mehanizmi so že bili povezani s številnimi bolezenskimi stanji, številne raziskave pa so v teku. Pomembno področje preučevanja epigenetskega uravnavanja so tudi duševne motnje. Znotraj naše raziskovalne skupine raziskujemo vprašanje biološko-molekularne osnove samomorilnega vedenja. Izsledki analiz nakazujejo, da obstajajo številne razlike v ravni metilacije DNA med žrtvami samomora in kontrolnimi osebami, pri čemer je analiza genske ontologije pokazala, da gre predvsem za gene, ki so povezani s strukturno integriteto celice in uravnavanjem živčnega sistema. Rezultati naših analiz tako dajejo nov uvid v spremenjeno stanje metilacije DNA pri samomorilnem vedenju in nakazujejo možnost spremenjene plastičnosti možganov.

Raziskave trenutno nadaljujemo s preučevanjem posttranslacijskih sprememb histonov. Integracija podatkov o stanju dveh epigenetskih sprememb (metilacije DNA in stanja histonov) nam bo omogočila dodaten vpogled v spremenjeno epigenetsko stanje in bo predstavljala korak k boljšemu razumevanju in kliničnemu spremljanju duševnih motenj.

Genetska variabilnost mehanizmov uravnavanja izražanja IL-1 β in tveganje za nastanek malignega mezotelioma in plevralnih plakov

Petra Piber¹, Neža Vavpetič¹, Katja Goričar², Alenka Franko^{1,3}, Vita Dolžan²

¹ Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

² Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

³ Klinični inštitut za medicino dela, prometa in športa, Univerzitetni klinični center Ljubljana

Mentorji: Alenka Franko, Katja Goričar in Vita Dolžan

Izhodišče: Izpostavljenost azbestu vodi v razvoj plevralnih plakov in malignega mezotelioma (MM). Azbestna vlakna sprožijo sproščanje vnetnega mediatorja IL-1 β , ki lahko prispeva k večjemu tveganju za pojav MM. Na izražanje IL-1 β lahko vpliva tudi genetska variabilnost *IL1B* in regulatorne miRNA *MIR146A*.

Namen: Namen raziskave je bil preučiti povezavo med polimorfizmi *IL1B* in *MIR146A* ter tveganjem za razvoj MM in plevralnih plakov.

Preiskovanci in metode: Izvedli smo raziskavo primerov s kontrolami. Bolniki z MM in preiskovanci s plevralnimi plaki so predstavljali primere, kontrolno skupino so predstavljali preiskovanci, prav tako poklicno izpostavljeni azbestu, ki niso zboleli za nobeno boleznijo, povezano z izpostavljenostjo azbestu. Polimorfizme *IL1B* in *MIR146A* smo določali s pomočjo kompetitivnega alelna specifičnega PCR. Z logistično regresijo smo analizirali povezavo med polimorfizmi in MM ali plevralnimi plaki.

Rezultati: Na zmanjšanje tveganja za pojav MM je statistično značilno vplival polimorfizem *MIR146A* rs2910164 (RO = 0,31, 95% IZ = 0,13-0,73, p = 0,008). Homozigoti za polimorfni alel so imeli manjše tveganje za razvoj MM, tudi po prilagoditvi po spolu in starosti (RO = 0,34, 95% IZ = 0,14-0,85, p = 0,020). Nosilci vsaj enega polimorfnege alela *IL1B* rs1143623 so prav tako imeli manjše tveganje za nastanek MM po prilagoditvi po starosti, spolu in izpostavljenosti azbestu (RO = 0,50, 95% IZ = 0,28-0,92, p = 0,025). Interakcija med polimorfizmoma *IL1B* rs1143623 in *IL1B* rs1071676 je imela statistično značilen vpliv na povečanje tveganja za MM (p = 0,050). Ostali preučevani polimorfizmi niso imeli statistično značilnega vpliva na tveganje za pojav MM ali plevralnih plakov.

Zaključek: Ključna ugotovitev raziskave je, da sta polimorfizma *MIR146A* rs2910164 in *IL1B* rs1143623 povezana z manjšim tveganjem za nastanek MM. Pokazali smo tudi vpliv interakcije med polimorfizmoma *IL1B* rs1143623 in *IL1B* rs1071676 na povečanje tveganja za razvoj MM.

Prvi predstavnik podtipa kačjih metaloproteinaz P-IIIe zavira agregacijo trombocitov

Kity Požek^{1,2}, Adrijana Leonardi¹, Igor Križaj¹

¹ *Inštitut Jožef Stefan, Odsek za molekularne in biomedicinske znanosti*

² *Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo*

Modrasov (*Vipera a. ammodytes*) strup sestavljajo številne farmakološko aktivne molekule, ki mu služijo pri obrambi, lovu in prebavi. Prevladujejo proteini, ki predstavljajo več kot 90 % suhe mase strupa, in delujejo toksično na kri, žile, živčevje, mišice ali druge organe. Približno četrtno modrasovih toksinov spada v družino metaloproteinaz (SVMP), ki pri zastrupljenih v glavnem povzročajo krvavitve in motnje strjevanja krvi. Raziskave toksinov prispevajo k razumevanju mehanizmov delovanja strupa in pripravi učinkovitega protistrupa. Poleg tega lahko služijo pri razvoju molekularnih orodij, uporabnih v medicinskih raziskavah in diagnostiki ter novih zdravilnih učinkovin za zdravljenje motenj strjevanja krvi, mišičnih ali živčnih obolenj in še nekaterih drugih bolezni.

Na Inštitutu Jožef Stefan so v strupu modrasa odkrili SVMP, poimenovano VaaMPIII-3, ki ni sodila v nobeno od znanih vrst SVMP in tako definirali nov podtip SVMP, P-IIIe [1]. V naši raziskavi smo preučili nekatere lastnosti te originalne vrste proteina. Najprej smo razvili postopek za učinkovito izolacijo VaaMPIII-3 iz modrasovega strupa. Ta je vključeval kromatografske metode, s katerimi smo strupne proteine ločili po velikosti (gelska izključitvena kromatografija), naboju (ionsko-izmenjevalna kromatografija), sposobnosti tvorbe disulfidne vezi (kvalentna kromatografija) in hidrofobnosti (RP-HPLC). Očiščen protein smo biokemijsko okarakterizirali s pomočjo gelske elektroforeze (NaDS-PAGE), izoelektričnega fokusiranja, Edmanove razgradnje in drugih metod. Ugotovili smo, da je VaaMPIII-3 kisel glikoprotein s heterogeno izoelektrično točko. V strupu se nahaja v monomerni obliki z navidezno molekulsko maso 21 kDa. Z določitvijo N-končnega aminokislinskega zaporedja VaaMPIII-3 smo ugotovili, da se na mestu 6 nahaja prost cisteinski ostanek, ki sodeluje pri tvorbi intermolekularne kovalentne vezi med dvema molekulama VaaMPIII-3. Farmakološki učinek VaaMPIII-3 smo preverili na krvni plazmi, bogati s trombociti, in ugotovili, da zavre agregacijo trombocitov, spodbujeno s kolagenom, ADP ali arahidonsko kislino. Agregacija trombocitov je pomemben del procesa strjevanja krvi, saj omogoča nastanek trombocitnega čepa (tromba), ki začasno zapre rano in ustavi krvavitev. VaaMPIII-3 torej deluje antitrombotsko in bi lahko bil primerna osnova za razvoj novega zdravila proti strjevanju krvi.

[1] Leonardi et al. (2019) *J. Proteome Res.* 18, 2287-2309.

Ligand-vezavne lastnosti hidrofobnega žepa EpCAM in njegov vpliv na regulirano intramembransko cepitev

Jošt Hočevar, Brigita Lenarčič, Miha Pavšič

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentorja: Brigita Lenarčič, Miha Pavšič

EpCAM je človeški transmembranski glikoprotein tipa I, ki se izraža na nizki ravni v celicah črevesnega epitelijskega tkiva, kjer je prisoten na bazolateralni membrani. Njegove okvare so pogosto letalne, ker vodijo v disfunkcijo številnih tkiv. Poleg tega se izraža na visoki ravni v nekaterih matičnih celicah in celicah različnih karcinomov. Zaradi slednje lastnosti je bil predlagan kot potencialna tarča pri zdravljenju nekaterih karcinomov, razvita pa so bila številna uspešna terapevtska protitelesa. Obenem pa je naše razumevanje njegove vloge v celičnih procesih omejeno. Udeležen je v celični diferenciaciji, proliferaciji in signalizaciji. Eden izmed mehanizmov, ki omogoča njegovo udeležbo v omenjenih celičnih procesih, je proliferativno signaliziranje preko regulirane intramembranske cepitve. Zunajcelični del EpCAM (EpEX) lahko odcepi metaloproteaza TACE (tudi ADAM17), preostal, na plazmalemo vezan del, pa lahko nadalje cepi presenilin-2 v γ -sekretaznem kompleksu. Sproščeni, znotrajcelični del EpCAM (EpICD) tvori kompleks s proteinoma FHL2 in β -kateninom, ki lahko preide v jedro. Tam se poveže še s proteinom LEF-1. Nastali kompleks poveča izražanje proliferativnih in pluripotentnih dejavnikov. Po eksperimentalni določitvi strukture EpEX je bila v C-končni domeni opažena prisotnost hidrofobnega žepa z vezanim neionskim detergentom decil- β -D-maltopiranozidom, ki je bil uporabljen kot kristalizacijski aditiv. Predpostavljamo, da omenjen žep morda igra pomembno vlogo pri regulaciji proliferativnega signaliziranja preko regulirane intramembranske cepitve. V okviru raziskovalnega dela smo načrtali in pripravili mutantne oblike EpCAM, ki imajo fizično zaprt hidrofoben žep. Zaprtje smo potrdili s simulacijo molekulske dinamike. Mutantne oblike EpCAM so bile bolj dovzetne do regulirane intramembranske cepitve v rakavih črevesnih celicah HCT8 z izbranim genom za EpCAM. Opazili smo tudi spremembo lokalizacije. Poslužili smo se tudi molekulske umestitve, s katero smo želeli preučiti ligand-vezavne lastnosti hidrofobnega žepa. Umeščali smo maščobne kisline različnih dolžin, pri čemer smo opazili energijski minimum okoli 16. C-atoma. Vezanje molekul v hidrofoben žep smo preverili tudi *in vitro*.

Molekularno prepoznavanje med katepsini in njihovimi substrati

Jure Loboda¹, Piotr Sosnowski², Livija Tusar^{1,2}, Robert Vidmar¹, Matej Vizovisek¹, Jaka Horvat⁵, Gregor Kosec⁵, Francis Impens^{3,4}, Hans Demol³, Boris Turk¹, Kris Gevaert^{3,4}, Dusan Turk^{1,2}

¹*Department of Molecular and Structural Biology, Jozef Stefan Institute*

²*Centre of excellence CIPKEBIP*

³*VIB Center for Medical Biotechnology, A. Baertsoenkaai 3, Ghent, Belgium*

⁴*Department of Biomolecular Medicine, Ghent University, A. Baertsoenkaai 3, Ghent, Belgium*

⁵*Acies Bio d.o.o.*

Cisteinski katepsini so proteaze, ki se nahajajo v lizosomih in poznih endosomih vseh celic. Njihova poglavitna naloga je razgradnja celičnih beljakovin (proteinov). To storijo tako, da cepijo peptidno (oziroma amidno) vez med sosednima aminokislinama. Nekateri katepsini lahko prekinejo peptidno vez na C ali N koncu molekul (eksopeptidazna aktivnost), drugi pa kjerkoli drugje (endopeptidazna aktivnost). Kljub sorodnosti pa nekateri izmed katepsinov sodelujejo pri specifičnih procesih. Katepsin K, na primer, uporabljajo kostne celice, imenovane osteoklasti, za razgradnjo celičnega matriksa. Katepsine V, L in S uporabljajo celice imunskega odziva pri pripravi ustreznih protiteles proti bakterijam in virusom, medtem ko je katepsin B povezan z invazivnostjo in slabo prognozo določenih tumorjev.

V naši raziskovani skupini si prizadevamo, da bi pojasnili vloge katepsinov in določili njihov vpliv na delovanje posameznih celic in organizma. Pri tem je pomembno, da lahko prepoznamo in napovemo njihove molekularne tarče, kar pa lahko naredimo s prepoznavanjem njihove specifičnosti. V ta namen smo v kvasovkah s pomočjo genske rekombinacije pripravili cisteinske katepsine V, L in K. Povezali smo se tudi z raziskovalci iz tujine, ki so pripravili kratke peptide, sestavljene iz 6 - 10 aminokislin, ki smo jih pridobili s proteomsko analizo celičnih proteinov. Naša vloga pri tem je bila, da preverimo, če se aminokislinska zaporedja obnašajo enako v peptidih in proteinih. Kompleksom med katepsinom V in peptidi smo nato z metodo rentgenske difrakcije določili 3D strukturo in analizirali molekularne povezave med njimi. Poleg tega smo s pomočje tekočinske kromatografije visoke ločljivosti in masne spektroskopije ugotovili, med katerimi aminokislinami cepijo katepsini V, L in K te iste peptide. Te podatke smo nato primerjali s cepitvami proteinov, katerih sekvenca vsebuje med drugim tudi aminokislinsko zaporedje identično našim peptidom. Ugotovili smo, da katepsini lahko cepijo enaka zaporedja v peptidih drugače kot v proteinih.

Analiza cepitve proteina EpCAM z disintegrinsko metaloproteazo TACE *in vitro*

Katarina P. van Midden, Aljaž Bratina, Aljaž Gaber, Brigita Lenarčič

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

mentorja: Aljaž Gaber in Brigita Lenarčič

Disintegrinska metaloproteaza TACE (znana tudi pod imenom ADAM17) je pomemben regulator različnih signalnih poti, ki vključujejo razvoj, imunost, vnetje in nastanek tumorjev. Na površini celice cepi več kot 90 substratov, med katere spadajo tudi citokini, rastni faktorji in adhezijske molekule. Kljub mnogim raziskavam molekularni mehanizmi cepitve nekaterih substratov še vedno niso pojasnjeni. Eden izmed njih je tudi dimerni transmembranski glikoprotein EpCAM, ki se pogosto povišano izraža pri karcinomih in je zato pomembna tarča za protirakave terapije. Cepitev s TACE je prvi korak v signalni poti, ki se prične z regulirano intramembransko proteolizo in sproži prepisovanje onkogenov. S celičnimi študijami in analizo z masno spektrometrijo je bilo pokazano, da se cepitveni mesti na EpCAM nahajata v žlebu med obema podenotama dimera in sta zato proteazi TACE težko dostopni. Mehanizem cepitve proteina EpCAM s TACE tako še ni pojasnjen. Da bi odkrili, ali dimerizacija proteina EpCAM ovira cepitev s TACE in ali so za prepoznavo substrata in cepitev potrebni še kakšni drugi faktorji, smo pripravili različne konstrukte celotnega proteina in zunajcelične domene TACE ter jih izrazili v insektni celični liniji Sf9. Optimizirali smo izražanje in čiščenje topne ektodomene TACE (TACE-EX) ter pripravljen konstrukt uporabili za prvo *in vitro* analizo cepitve različnih oblik ektodomene proteina EpCAM. S cepitvami smo uspeli pokazati, da lahko TACE *in vitro* prepozna in cepi EpCAM na predvidenih mestih ter da dimerizacija proteina EpCAM ovira cepitev s TACE. To je tudi prva eksperimentalna potrditev hipoteze, da se mora za cepitev EpCAM nahajati v monomerni obliki. Interakcijo TACE z EpCAM smo študirali tudi z izdelavo modelov kompleksov različnih oblik teh dveh proteinov. Sodeč po modelih, ima pri regulaciji vezave in cepitve substrata pomembno vlogo unikatna regija CANDIS na C-koncu zunajceličnega dela TACE.

VIM, miR-124-3p in miR-9-5 prisotni v majhnih zunajceličnih veziklih so možni označevalci glioblastoma

Alja Zottel¹, Neja Šamec¹, Ivana Jovčevska¹, Ana Kump^{1,2}, Lucija Raspor Dall'Olio¹, Pia Pužar Dominkuš¹, Rok Romih³, Samo Hudoklin³, Jernej Mlakar⁴, Daniil Nikitin^{5,6}, Maxim Sorokin^{6,7,9}, Anton Buzdin^{5,7,8,9}, Lea Knez^{1,10}, Zala Žužek^{1,11}, Radovan Komel¹

¹MCMB, IBK, MF, UL Ljubljana;

²MPŠ, IJS, Ljubljana;

³IBC, MF, UL Ljubljana;

⁴IP, MF, UL Ljubljana;

⁵Ruska akademija znanosti, Moskva;

⁶Oncobox Ltd., Moskva, Rusija;

⁷I. M. Sečenov Prva Moskovska Državna Medicinska univerza, Moskva;

⁸OmicsWay Corp., CA, ZDA;

⁹Moskovski inštitut za fiziko in tehnologijo, Moskva;

¹⁰FKKT, UL Ljubljana

¹¹BF, UL Ljubljana

Glioblastom je najbolj pogosta oblika primarnega možganskega tumorja. SZO ga uvršča med najbolj agresivne maligne možganske tumorje s preživitveno dobo od 12 do 15 mesecev po postavitvi diagnoze. Zdravljenje vključuje maksimalno kirurško resekcijo, obsevanje in kemoterapijo. Nizka stopnja preživetja pacientov je v veliki meri posledica pomanjkanja biooznačevalcev, ki bi izboljšali diagnozo, prognozo in omogočili boljšo terapijo. En izmed najbolj obetajočih virov biooznačevalcev so majhni zunajcelični vezikli (angl. small extracellular vesicles; sEVs), ki jih celice sproščajo v zunajcelični prostor, so prisotni v različnih telesnih tekočinah in imajo pomembno vlogo v medcelični komunikaciji. Sestava zunajceličnih veziklov je zelo raznolika (miRNA, mRNA, proteini, lipidi) in odraža trenutno stanje celic. V naši raziskavi smo skušali odkriti in ovrednotiti nove možne označevalce glioblastoma. Določili smo izražanje miR-1-3p, miR-9-5p, miR-21-5p, miR-124-3p in miR-138-5p v tkivu glioblastoma, celičnih linijah glioblastoma in sEVs, ki jih celice izločajo. Rezultati so pokazali, da ima miR-21-5p znatno povečano izražanje v tkivu GBM, v primerjavi z gliomom nižje stopnje in referenčnim možganskim tkivom. miR-124-3p in miR-138-5p sta nad-izražena v referenčnem možganskem tkivu v primerjavi z glioblastomskim. V sEVs glioblastomskih matičnih celic sta bili miR-9-5p in miR-124-3p znatno nadizraženi v eni izmed glioblastomskih matičnih celic v primerjavi s sEV vseh ostalih celic. Na koncu smo tudi pokazali, da je VIM, tarča miR-124-3p in miR-138-5p, značilno nadizražen v sEVs zrelih GBM celic v primerjavi s sEVs matičnih celic GBM in tudi astrocitov. Iz rezultatov lahko sklepamo, da VIM prisoten v sEVs, predstavlja potencialno specifičen označevalec zrelih GBM celic, miR-9-5p in miR-124-3p pa označevalca sEVs matičnih celic glioblastoma.

Emisijski profili kemiluminiscence organskega hidrazida v protičnem mediju: fizikalni pristop proučevanja parametrov nastanka svetlobe in razvoj optimalnega sistema

Vid Nemec¹, Luka Čiča¹, Mitja Drab^{2,3}, Marko Jeran^{2,4}

¹Gimnazija in veterinarska šola, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana

²Laboratorij za fiziko, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

³Laboratorij za klinično biofiziko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

⁴Laboratorij za klinično biofiziko, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentorja: Marko Jeran in Mitja Drab

Kemiluminiscenca predstavlja emisijo svetlobe, ki se sprosti ob kemijski reakciji. O tovrstnem fenomenu govorimo, kadar eksotermna reakcija proizvaja molekule v elektronsko vzbujenem stanju. Ko se te molekule vračajo v osnovno stanje, sprostijo energijo v obliki svetlobe. Vsem poznana vrsta svetlobe, ki se odvija v bioloških sistemih, je bioluminiscenca. Emisijo svetlobe na kopnem sproščajo mnoga živa bitja, vsem poznana je predvsem bioluminiscenca kresnice.

Pri oksidaciji modelnega reagenta družine hidrazidov aromatskih karboksilnih kislin, luminola, smo opazovali pojav nastanka emisije svetlobe. S funkcijo najboljšega prileganja smo našli analitični približek eksponentne relaksacije in podali parametre, ki najboljše opišejo eksperimentalne podatke. Pri kvantitativnem določanju količine emitirane svetlobe smo ponovno izhajali iz opisa najboljšega prileganja. Ploščina pod grafi je premo sorazmerna količini oddane energije. Z njihovim integriranjem smo dobili količino oddane energije, ki je bila v našem primeru v obliki izsevane svetlobe (fotonov). Ugotovljeno je bilo, da količina oksidanta, katalizatorja in fluorescenčnega barvila, igrajo pomembno vlogo pri nastanku emisije svetlobe. Vsak izmed njih ima v reakcijskem sistemu optimalno delovanje. Prevelika količina le-teh vodi v zmanjšanje intenzivnosti svetlobe in prenizka v nepopolno aktivacijo. Najbolj učinkovit sistem luminolove oksidacije pri *pH* vrednosti 9,00 je vseboval 1,71 mM raztopino bakrovih(II) ionov in 1,06 $\mu\text{mol/mL}$ fluoresceina (v obliki dinatrijeve soli). Reakcijo uspešno aktivira 0,050 % raztopina vodikovega peroksida kot oksidanta.

Protimikrobno delovanje macerata iglic navadne smreke (*Picea abies*) na bakterije *Legionella pneumophila*

Hana Remškar¹, Anja Sedušak Kljakič¹, Martina Oder², Marko Jeran^{3,4}

¹Gimnazija in veterinarska šola, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana

²Oddelek za sanitarno inženirstvo, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani

³Laboratorij za klinično biofiziko, Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani

⁴Laboratorij za fiziko, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Mentorja: Marko Jeran in Martina Oder

V raziskovalnem delu smo preučevali delovanje maceratom iglic navadne smreke (*Picea abies*) na bakterije rodu *Legionella*. Gre za patogeno skupino gram-negativnih bakterij, ki vključuje vrsto *Legionella pneumophila*, katera med drugim povzroča legionelozo.

Iz iglic zdrave navadne smreke smo pripravili etanolni in *n*-heksanski macerat. Maceratoma smo z uporabo FTIR-spektroskopije kvantitativno določili vsebnost limonena in borneola, ki predstavljata pomembni biološko aktivni učinkovini. Večjo vsebnost limonena smo zaznali v maceratih iz nepolarnega *n*-heksanana in borneola iz polarnega etanola. Mikrobiološke raziskave so pokazale, da oba tipa maceratom v območju od 2 do 18 utežnih % ne kažeta delovanja na bakterijo *Legionella pneumophila*. V nadaljevanju smo na modelni organizem z etanolnim maceratom, ki je pri 50 utežnih % pokazal izrazit pojav inhibicijske cone, pokazali tudi njegovo optimalno delovanje.

Evolucija TDP-43 in njegovih psevdogenov pri sesalcih

Luka Gnidovec, Vera Župunski

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

Mentorica: Vera Župunski

TDP-43 je RNA-vezavni protein iz družine heterogenih jedrnih ribonukleoproteinov (hnRNP). Odkrit je bil kot modulator ekspresije gena HIV-1, kasneje pa so mu znanstveniki pripisali še mnogo drugih funkcij. Sodeluje v praktično vseh stopnjah procesiranja RNA, od regulacije transkripcije in alternativnega izrezovanja intronov, do transporta mRNA v celici in regulacije translacije. Pomemben je tudi pri tvorbi stresnih granul in procesiranju nekaterih nekodirajočih RNA (npr. miRNA).

Človeški gen, ki zapisuje za TDP-43, se imenuje *TARDBP*. Sestavljen je iz šestih eksonov in vmesnih intronov. *TARDBP* je evolucijsko precej ohranjen, kar kaže na pomembno funkcijo proteina TDP-43. Poleg gena *TARDBP* se v človeškem genomu nahaja še pet njegovih psevdogenov. Psevdogeni so deli DNA, ki so nastali z duplikacijo določenega gena, in zaradi različnih mutacij ne kodirajo proteina. Čeprav je dolgo prevladovalo mnenje, da so te sekvence brez posebne funkcije v genomu, se je v zadnjem času v več raziskavah pokazala njihova vloga v regulaciji izražanja njihovih starševskih genov. Poleg tega pa so pomembni pri raziskovanju evolucije genomov.

Glede na nastanek psevdogene delimo na neprocesirane in procesirane. Neprocesirani psevdogeni nastanejo z gensko duplikacijo. Ta tip psevdogenov obdrži gensko strukturo intronov in eksonov. Pri procesiranih psevdogenih pa pride do retrotranspozicije, kjer se cDNA, reverzno prepisana iz mRNA, vgradi v genomsko DNA. Ker je mRNA že sprocesirana, taki psevdogeni nimajo intronov. Psevdogeni *TARDBP* so procesirani. Nahajajo se na kromosomih 2, 6, 8, 13 in 20.

V diplomski nalogi smo razložili evolucijske odnose TDP-43 pri sesalcih. Evolucijsko drevo smo zgradili s pomočjo mRNA zaporedij homologov TDP-43, ker so proteinska zaporedja preveč podobna. Zbrali smo 66 mRNA zaporedij vseh treh skupin sesalcev, jih poravnali s programom MUSCLE in s pomočjo programa PhyML določili njihovo filogenijo. Poleg tega smo ugotovili, kdaj je prišlo do nastanka procesiranih psevdogenov TDP-43 na kromosomih 2, 8, 13 in 20. Zbrana zaporedja kažejo na veliko ohranjenost teh štirih človeških psevdogenov predvsem pri človeku podobnih opicah in opicah starega sveta, deloma pa tudi pri opicah novega sveta.

Analiza interakcije med zunajceličnima domenama EpCAM in EGFR

Uroš Prešern, Aljaž Gaber, Brigita Lenarčič

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani

Mentorja: Aljaž Gaber, Brigita Lenarčič

EGFR in EpCAM sta transmembranska glikoproteina, ki sta prekomerno izražena v številnih karcinomih, kjer sodelujeta pri različnih procesih povezanih z nastankom in napredovanjem raka. Njuna vloga v celičnem signaliziranju je poznana že dlje časa, pred kratkim pa je bilo odkrito, da proteina med seboj tudi interagirata, pri čemer zunajcelična regija EpCAM (EpEX) deluje kot ligand EGFR. EpEX se od ostalih ligandov EGFR strukturno razlikuje po odsotnosti EGF-podobne domene, preko katere poteka vezava klasičnih ligandov na EGFR. Z namenom preučitve vezave EpEX na EGFR smo želeli kompleks strukturno okarakterizirati z uporabo treh metod za analizo proteinskih interakcij: gelska filtracija, prečno povezovanje in ozkokotno sipanje rentgenske svetlobe (SAXS). Zunajcelično regijo EGFR in različne proteinske konstrukte EpEX, potrebne za analizo, smo pripravili v insektnih celicah. Prisotnost kompleksa nam je uspelo potrditi z analizo prečnega povezovanja, iz katere lahko sklepamo, da se EpEX veže na EGFR bodisi v monomerni ali dimerni obliki. Po drugi strani nam prisotnost kompleksa ni uspelo potrditi z gelsko filtracijo in meritvami SAXS. Glede na to, da so v ostalih raziskavah, kjer sta bila EGFR in EpEX izražena v sesalskih celicah, interakcijo zaznali tudi pri zelo nizkih koncentracijah, je naša glavna hipoteza, da so za interakcijo med EGFR in EpEX ključne posttranslacijske modifikacije, ki pa se med insektnimi in sesalskimi celicami razlikujejo.

Vpliv uporabe različnih topil na ekstrakcijo kurkuminoidov in njihovo protimikrobno delovanje na bakterijo *Staphylococcus aureus*

Aida Brkopec, Lara Redek Žnidaršič, Špela Grmovšek, Vojka Zupančič

Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma, Kmetijska šola Grm in biotehniška gimnazija

Mentorica: Vojka Zupančič

Kurkuma je tradicionalna indijska rastlina, ki vsebuje številne zdravilne učinkovine, med drugim tudi kurkuminoide. Najbolj poznan in preučen kurkuminoid je kurkumin, aktivna komponenta kurkume, ki jo že več kot dva tisoč let zaradi protivnetnih in drugih za zdravje blagodejnih učinkov koristijo v alternativnem zdravstvu kot začimbo in kot prehransko dopolnilo.

Namen našega dela je bil identificirati kurkuminoide kurkume s poudarkom na kurkuminu in preveriti njihovo protimikrobno učinkovitost na Grampozitivno bakterijo *Staphylococcus aureus*. Ugotoviti smo želeli, ali uporaba (šestih) različnih topil vpliva na učinkovitost ekstrakcije in sestavo ekstraktov, ki smo jih pridobili iz sveže in suhe kurkume, ter dokazati inhibitorno delovanje kurkumina oz. kurkuminoidov na bakterijo *Staphylococcus aureus*. Ekstrakte iz sveže kurkume in iz kurkume v prahu smo pridobili z metodo konvencionalne ekstrakcije, z metodo tankoplastne kromatografije pa smo ugotavljali prisotnost kurkuminoidov in razlike v sestavi ekstraktov. Z metodo mikrodilucije smo preverjali protimikrobno učinkovitost treh izbranih ekstraktov. Na podlagi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da uporaba različnih topil vpliva na učinkovitost ekstrakcije in sestavo ekstraktov ter dokazali, da imajo kurkumin in ostali kurkuminoidi v kurkumi protimikrobne lastnosti. Najboljši izkoristek in sestava ekstrakta kurkume je bila pri ekstrakciji s topilom diklorometanom. Diklorometanski ekstrakt iz kurkume v prahu je tudi najučinkoviteje zaviral rast bakterije *Staphylococcus aureus*, učinkovit pa je bil tudi ekstrakt, pridobljen z uporabo etanola, ki je v omejeni količini edino zdravju neškodljivo uporabljeno topilo.

LAPANJETOVI NAGRAJENCI

za leto 2020

Lapanjetova nagrada:

prof. dr. Kristina SEPČIČ

Lapanjetovo priznanje:

doc. dr. San HADŽI

Egerolizinski proteini iz glivnega rodu *Pleurotus* in njihova uporaba

Kristina Sepčić

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Egerolizini (Pfam 06355; InterPro IPR009413) so majhni (~13–20 kDa), β -strukturirani proteini, ki jih najdemo v različnih bakterijskih in evkariontskih vrstah. Egerolizinski proteini iz gob ostrigarjev (*Pleurotus sp.*) se specifično vežejo na umetne in biološke membrane, obogatene s sfingolipidi. Ta interakcija je še posebej močna v primeru vezave na insektne celice ali na umetne lipidne membrane, ki vsebujejo fiziološko relevantne koncentracije poglavitnega nevretenčarskega sfingolipida – ceramid fosfoetanolamina. Omenjeni egerolizini lahko v kombinaciji s proteinskim partnerjem pleurotolizinom B (PlyB), ki ga proizvaja ista goba, v omenjenih membranah tvorijo bikomponentne transmembranske pore. Tvorba por je osnova za selektivno toksičnost kompleksov egerolizin/PlyB proti ličinkam in odraslim osebkom koruznega in koloradskega hrošča. Omenjeni insekticidni kompleksi reagirajo z lipidnim receptorjem v črevesu žuželke, in ne z mutacijam podvrženimi proteinskimi receptorji, kot je opisano za komercialno uporabne insekticidne Cry proteine bakterije *Bacillus thuringiensis*. Zato je verjetnost, da bodo žuželke razvile odpornost proti insekticidom na osnovi kompleksov egerolizin/PlyB, bistveno manjša. Sposobnost egerolizinov iz ostrigarjev, da specifično interagirajo s sfingolipidi v membranah sesalskih celic, je lahko tudi osnova za njihovo uporabo kot označevalcev sfingomielina ali ceramid fosfoetanolamina ter domen, ki jih sfingolipidi tvorijo v celičnih membranah (npr. lipidni rafti).

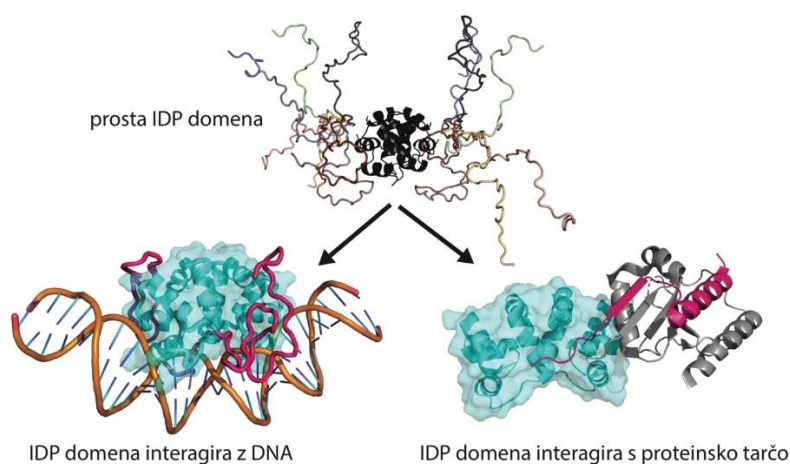
Intrinzično nestrukturirani proteini in regulacija bakterijskih TA modulov

San Hadži

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

Proteine si običajno predstavljamo kot skupek elementov sekundarne strukture, vijačnic in beta površin, ki zavzamejo določeno tridimenzionalno strukturo, proteinsko zvitje. V preteklih desetletjih pa se je izkazalo, da velik del proteoma sestavljajo proteini brez urejene strukture, t. i. intrinzično nestrukturirani proteini. Njihove strukture so prehodne, ponazorimo jih s strukturnimi ansambli. Lahko se strukturirajo pri vezavi na partnerske proteine. Intrinzično neurejeni proteini igrajo pomembno vlogo pri celični signalizaciji, transkripciji in pri nastanku intraceličnih brezmembranskih organelov.

Predstavil bom primer intrinzično nestrukturiranega bakterijskega proteina HigA2 in opisal njegovo vlogo pri regulaciji TA modula HigBA2. Bakterijski TA moduli so majhni operoni, udeleženi pri bakterijskem odgovoru na stres. Operon sestavljata toksin (ustavi rast celice) in delno nestrukturiran antitoksin. HigA2 antitoksin sestavljata globularna DNA-vezavna domena in nestrukturirana domena. Nestrukturirna domena pri vezavi na toksin zavzame urejeno strukturo in prepreči delovanje toksina tako, da konformacijsko preuredi aktivno mesto s premikom beta trakov. HigA2 antitoksin se preko globularne domene veže na regulatorno DNA regijo in represira izražanje operona *higBA2*. Presenetljivo je, da nestrukturirna domena pri vezavi na DNA sodeluje in vezavo ojača. Zmožnost nestrukturirane domene, da interagira tako s proteinsko tarčo - toksinom - kot tudi z DNA, uvede v sistem negativno kooperativnost, kar je vzrok za posebno odzivnost avtoregulacijskega mehanizma TA modula HigBA2. S primerom orišemo pomembno lastnost intrinzično nestrukturiranih proteinov: zmožnost specifično interagirati z več tarčami (promiskuitetnost) na strukturno različne načine (konformacijska plastičnost).



Zgornja slika ilustrira promiskuitetnost intrinzično neurejenga proteina HigA2. Prost HigA2 (zgoraj) opišemo z ansamblom struktur. Pri vezavi na proteinsko tarčo (spodaj desno) se nestrukturiran del zvije v alfa vijačnico in beta trak (prikazano v rožnati barvi). Pri vezavi na operatorsko regijo (spodaj levo) nestrukturiran del (rožnato) interagira z DNA in ojači vezavo.