

BIOmolekularec.si

Dan biomolekularnih znanosti

Zbornik povzetkov

Ljubljana, 25. 9. 2014

Organizator prireditve in založnik zbornika:
Slovensko biokemijsko društvo



Kraj prireditve:

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101

Uredniki zbornika:

Aljoša Bavec, Aleš Berlec, Blaž Cigić, Marko Dolinar, Uroš Potočnik

Programski in organizacijski odbor:

Blaž Cigić (predsednik), Aljoša Bavec, Aleš Berlec, Marko Dolinar,
Uroš Potočnik

Publikacija je dostopna na spletu: <http://biomolekularec.si/zbornik14.pdf>

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

577.2(082)(0.034.2)

DAN biomolekularnih znanosti (2014 ; Ljubljana)

Zbornik povzetkov [Elektronski vir] / BIOMolekularec.si [tudi] Dan biomolekularnih znanosti, Ljubljana, 25. 9. 2014 ; [organizator prireditve Slovensko biokemijsko društvo ; uredniki Aljoša Bavec ... et al.]. - El. knjiga. - Ljubljana : Slovensko biokemijsko društvo, 2014

Način dostopa (URL): <http://biomolekularec.si/zbornik14.pdf>

ISBN 978-961-91651-9-5 (pdf)

1. Bavec, Aljoša 2. Slovensko biokemijsko društvo
275596288

PROGRAM SREČANJA

9:00-9:10 Otvoritev: Janko Kos, predsednik Slovenskega biokemijskega društva

Sekcija 1:

Vodja sekcije: Aleš Berlec

- 9:10-9:25 Borut Štrukelj: Farmaceutvska biotehnologija: predstavitev skupine in raziskovalnih projektov
- 9:25-9:35 Andreja Majerle, Iva Hafner Bratkovič: Nova generacija raziskovalcev ved o življenju
- 9:35-9:45 Kosta Cerović: Proizvodnja bioplina iz različnih odpadkov
- 9:45-9:55 Staša Kosler: Razvoj gensko spremenjenih mlečnokislinskih bakterij za zdravljenje kronične vnetne črevesne bolezni
- 9:55-10:05 Aleš Zupančič: Samočistilnost tkanin na osnovi nanoprevlek
- 10:05-10:15 Pogovor z Miomirjem Kneževićem, soustanoviteljem več biotehnoloških podjetij

10:15-10:35 Odmor

Sekcija 2:

Vodja sekcije: Marko Dolinar

- 10:35-10:50 Marko Dolinar: Kaj delajo alge na Kemiji?
- 10:50-11:00 Dominik Jankovič, Florijan Jalševac, Diana Fink: Bionanomateriali na osnovi polipeptidov
- 11:00-11:10 San Hadži: Moduli toksin-antitoksin
- 11:10-11:20 Karla Makoter, Špela Gubič, Sara Kreft: Vrednotenje interakcij med (biološkimi) makromolekulami z encimskoimunskimi testi
- 11:20-11:30 Aljaž Gaber, Maja Kostanjevec, Miha Pavšič, Brigita Lenarčič: Optimizacija priprave, strukturna in biokemijska karakterizacija testikana-2 ter iskanje interakcijskih partnerjev v možganih
- 11:30-11:40 Nejc Kejžar, Jan Gojznikar: Vpliv pozitivno nabitih proteinov na internalizacijo eksogene DNK
- 11:40-11:50 Pogovor z Markom Novincem, prejemnikom Lapanjetovega priznanja za leto 2014

11:50-12:10 Odmor

Sekcija 3:

Vodja sekcije: Blaž Cigić

- 12:10-12:25 Tom Turk: Dobrodošli v svetu toksinov
- 12:25-12:35 Tjaša Prevc: Protičnost topila ima velik vpliv na hitrost reakcije antioksidantov s prostimi radikali
- 12:35-12:45 Matevž Štular, Pia Cerkovnik, Eva Natalija Novak Jevtić: Vpliv antioksidantov na spremembe celic povrhnjice kože po obsevanju z UV svetlobo
- 12:45-12:55 Nežka Kavčič, Katarina Pegan, Peter Vandenabeele, Vito Turk, Boris Turk: Nekroptoza - nova oblika celične smrti
- 12:55-13:05 Gašper Žun: Razvoj metode za analizo aktivnosti oksidaz L-aminokislin v gelu in njena uporaba pri analizi vzorcev gob
- 13:05-13:15 Pogovor z Matejem Butalo, prejemnikom Lapanjetovega priznanja za leto 2014
- 13:15-14:15 Odmor za kosilo

Sekcija 4:

Vodja sekcije: Uroš Potočnik

- 14:15-14:30 Uroš Potočnik: Genetika in farmakogenomika kompleksnih bolezni
- 14:30-14:40 Omar Naneh, Davor Škofič-Maurer, Alenka Buh, Franci Merzel, Robert J. C. Gilbert, Gregor Anderluh: Luknjanje celic – preučevanje delovanja perforina
- 14:40-14:50 Tjaša Vižin, Anja Pišlar, Ib Jarle Christensen, Hans Jørgen Nielsen, Pika Meško Brguljan, Janko Kos: Glikolitični encim gama enolaza omogoča preživetje rakavih celic v stresnih pogojih
- 14:50-15:00 Ester Premate: Pogostost gena *iss* pri komenzalnih sevih bakterije *Escherichia coli*
- 15:00-15:10 Maja Križnik, Matevž Rupar, Špela Baebler, Kristina Gruden: Vloga malih RNA (miRNA) pri odgovoru rastlin krompirja (*Solanum tuberosum* L.) na okužbo s krompirjevim virusom Y
- 15:10-15:20 Pogovor z Alešem Premzlom, raziskovalcem in vodjo projektov v farmacevtski družbi Lek
- 15:20-15:40 Odmor

Sekcija 5:

Vodja sekcije: Aljoša Bavec

15:40-15:55 Radovan Komel: Nano-protitelesa in iskanje označevalcev matičnih celic raka

15:55-16:05 Sergej Pirkmajer, Tomaž Marš, Zoran Grubič: Presnovne bolezni in skeletna mišica

16:05-16:15 Gregor Lorbek, Žiga Urlep, Martina Perše, Jera Jeruc, Peter Juvan, Rok Keber, Simon Horvat, Damjana Rozman: Presnova in ravnovesje holesterola pri miših s pogojno izbitim genom Cyp51 v jetrih

16:15-16:25 Mojca Grižnik, Julija Herman in Nika Kaplja: Primerjava komponent strupov modrasa in navadnega gada za izbiro ustrezne imunoterapije

16:25-16:35 Petra Malavašič, Anja Pucer, Vesna Brglez, Igor Križaj, Jože Pungerčar in Toni Petan: Fosfolipaze, lipidne kapljice in preživetje celic raka dojke

16:35-16:45 Pogovor s Sašo Golob, slovensko olimpijko in študentko medicine

16:45-17:00 Odmor

od 17:00 **PODELITEV LAPANJETOVIH NAGRAD IN SKUPŠČINA SBD**

Skupščina Slovenskega biokemijskega društva, podelitev Lapanjetovih nagrad in predavanja nagrajencev

Boris Turk - Lapanjetova nagrada: Cisteinski katepsini: od biologije do medicine

Matej Butala - Lapanjetovo priznanje: Trenutek, ko bakterija zazna poškodbo DNA

Marko Novinec - Lapanjetovo priznanje: Uravnavanje aktivnosti katepsina K izven aktivnega mesta

Družabni večer

KAZALO POVZETKOV

<i>Borut Štrukelj</i> Farmacevtska biotehnologija: predstavitev skupine in raziskovalnih projektov	9
<i>Andreja Majerle, Iva Hafner Bratkovič</i> Nova generacija raziskovalcev ved o življenju	10
<i>Kosta Cerović</i> Proizvodnja bioplina iz različnih odpadkov	11
<i>Staša Kosler</i> Razvoj gensko spremenjenih mlečnokislinskih bakterij za zdravljenje kronične vnetne črevesne bolezni	12
<i>Aleš Zupančič</i> Samočistilnost tkanin na osnovi nanoprevlek	13
<i>Marko Dolinar</i> Kaj delajo alge na Kemiji?	14
<i>Dominik Jankovič, Florijan Jalševac, Diana Fink</i> Bionanomateriali na osnovi polipeptidov	15
<i>San Hadži</i> Moduli toksin-antitoksin	16
<i>Karla Makoter, Špela Gubič, Sara Krefc</i> Vrednotenje interakcij med (biološkimi) makromolekulami z encimskoimunskimi testi	17
<i>Aljaž Gaber, Maja Kostanjevec, Miha Pavšič, Brigita Lenarčič</i> Optimizacija priprave, strukturna in biokemijska karakterizacija testikana-2 ter iskanje interakcijskih partnerjev v možganih	18
<i>Nejc Kejžar, Jan Gojznikar</i> Vpliv pozitivno nabitih proteinov na internalizacijo eksogene DNK	19
<i>Tom Turk</i> Dobrodošli v svetu toksinov	20
<i>Tjaša Prevc</i> Protičnost topila ima velik vpliv na hitrost reakcije antioksidantov s prostimi radikali	21
<i>Matevž Štular, Pia Cerkovnik, Eva Natalija Novak Jevtič</i> Vpliv antioksidantov na spremembe celic povrhnjice kože po obsevanju z UV svetlobo	22
<i>Nežka Kavčič, Katarina Pegan, Peter Vandenabeele, Vito Turk, Boris Turk</i> Nekroptoza - nova oblika celične smrti	23
<i>Gašper Žun</i> Razvoj metode za analizo aktivnosti oksidaz L-aminokislin v gelu in njena uporaba pri analizi vzorcev gob	24
<i>Uroš Potočnik</i> Genetika in farmakogenomika kompleksnih bolezni	25
<i>Omar Naneh, Davor Škofič-Maurer, Alenka Buh, Franci Merzel, Robert J. C. Gilbert, Gregor Anderluh</i> Luknjanje celic – preučevanje delovanja perforina	27

<i>Tjaša Vižin, Anja Pišlar, Ib Jarle Christensen, Hans Jørgen Nielsen, Pika Meško Brguljan, Janko Kos</i>	
Glikolitični encim gama enolaza omogoča preživetje rakavih celic v stresnih pogojih	28
<i>Ester Premate</i>	
Pogostost gena <i>iss</i> pri komenzalnih sevih bakterije <i>Escherichia coli</i>	29
<i>Maja Križnik, Matevž Rupar, Špela Baebler, Kristina Gruden</i>	
Vloga malih RNA (miRNA) pri odgovoru rastlin krompirja (<i>Solanum tuberosum</i> L.) na okužbo s krompirjevim virusom Y	30
<i>Radovan Komel</i>	
Nano-protitelesa in iskanje označevalcev matičnih celic raka	31
<i>Sergej Pirkmajer, Tomaž Marš, Zoran Grubič</i>	
Presnovne bolezni in skeletna mišica	32
<i>Gregor Lorbek, Žiga Urlep, Martina Perše, Jera Jeruc, Peter Juvan, Rok Keber, Simon Horvat, Damjana Rozman</i>	
Presnova in ravnovesje holesterola pri miših s pogojno izbitim genom <i>Cyp51</i> v jetrih	33
<i>Mojca Grižnik, Julija Herman in Nika Kaplja</i>	
Primerjava komponent strupov modrasa in navadnega gada za izbiro ustrezne imunoterapije	34
<i>Petra Malavašič, Anja Pucer, Vesna Brglez, Igor Križaj, Jože Pungerčar in Toni Petan</i>	
Fosfolipaze, lipidne kapljice in preživetje celic raka dojke	35
<i>Alexandra Bogožalec</i>	
Virus induced gene silencing (VIGS) – ali kako potrdimo sodelovanje genov pri odgovoru rastline na biotski stres	36
<i>Špela Stangler Herodež</i>	
Sistematska povezava med biokemijo, genetiko in molekularno biologijo kot del znanosti o življenju	37
<i>Tine Prolič Kalinšek, Gašper Razinger, Nataša Debeljak</i>	
Analiza izražanja eritropoetinskega receptorja	38
<i>Tjaša Lukan, Anna Coll, Ana Lazar, Špela Baebler in Kristina Gruden</i>	
Omrežje uravnavanja transkripcije signalizacijskih komponent v interakciji med krompirjem in krompirjevim virusom Y	39
<i>Jelena Rajković, Gregor Kosec, Marcin Poreba, Marcin Drag, Dejan Caglič, Vito Turk in Boris Turk</i>	
Autophagins in the parasite <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
<i>Saša Rezelj</i>	
Opredelitev zgradbe in delovanja mutanta listeriolizina O	41
<i>Simon Žurga, Janko Kos in Jerica Sabotič</i>	
Vloga glikobiologije in lektinov v celični biologiji ter sladko spoznavanje z gobami	42
<i>Boris Turk</i>	
Cisteinski katepsini: od biologije do medicine	43
<i>Matej Butala</i>	
Trenutek, ko bakterija zazna poškodbo DNA	44
<i>Marko Novinec</i>	
Uravnavanje aktivnosti katepsina K izven aktivnega mesta	45

Farmacevtska biotehnologija: predstavitev skupine in raziskovalnih projektov

Borut Štrukelj

Fakulteta za farmacijo UL in Institut Jožef Stefan

Farmacevtska biotehnologija je eno od najhitreje razvijajočih se področij v medicini in farmaciji, kar se je še posebej odrazilo z razvojem rekombinantne tehnologije DNA. V sodobnem naboru zdravil predstavlja farmacevtska biotehnologija približno 25% delež, saj imamo na tržišču kopico rekombinantnih encimov, hormonov, citokinov, monoklonskih protiteles in ostalih kompleksnih proteinskih molekul. Prav tako pa je s pomočjo klasične farmacevtske biotehnologije in fermentorskih tehnik na razpolago veliko spojin vodnic oziroma izhodnih surovin za izdelavo končnih zdravilnih učinkovin, med katerimi so najbolj uporabljeni antibiotiki, statini in steroidi. Z vpeljavo znanj in metod sodobne biotehnologije in molekularne biologije omogoča farmacevtska biotehnologija tudi razvoj diagnostičnih in teranostičnih postopkov, obenem pa je osnova za odkrivanje novih fizioloških in patofizioloških mehanizmov.

V skupini raziskovalcev, ki deluje na Fakulteti za farmacijo UL in na Institutu Jožef Stefan se ukvarjamo s preučevanjem molekularnih mehanizmov delovanja nekaterih encimov, hormonov kot sta grelin in leptin, iščemo zaviralne peptide miostatina, razvijamo nove pristope k uporabi bakteriofagnega prikaza, ki je izjemno uporabna molekularna metoda za raziskave in razvoj v farmaciji in medicini, preučujemo uporabo protismislenih oligonukleotidov in mikro RNA molekul na področju genskega zdravljenja ter razvijamo nove rekombinantne probiotike, ki bodo osnova za razvoj biološkega pristopa zdravljenja kronične črevesne vnetne bolezni.

Nova generacija raziskovalcev ved o življenju

Andreja Majerle, Iva Hafner Bratkovič
Kemijski inštitut, Ljubljana

Vrhunska znanja iz področij ved o življenju so pogoj za razvoj človeških potencialov in okolja, predvsem na področju zdravja, tehnologij, pridobivanja hrane in obnovljivih virov energije. Raziskovalci s Kemijskega inštituta (KI), Fakultete za farmacijo (FFA) in Filozofske fakultete (FF) Univerze v Ljubljani (UL) smo pripravili projekt Nova generacija raziskovalcev ved o življenju (vede-o-zivljenju@ki.si), ki je bil namenjen slovenskim dijakom in njihovim učiteljem.

Projekt je potekal od 1. 10. 2012 do 31. 8. 2014, financirala sta ga Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada ter Ministrstvo za izobraževanje, znanost in šport. V projektu je sodelovalo 16 konzorcijskih partnerjev: KI, FFA in FF UL ter 13 srednješolskih ustanov iz 9 slovenskih regij. V posameznih aktivnostih so sodelovali tudi dijaki in učitelji drugih slovenskih srednjih šol.

Glavni cilj projekta je bil vzpostavitev medgeneracijskega in medregijskega sodelovanja dijakov, njihovih mentorjev ter vrhunskih znanstvenikov z namenom pridobivanja novega znanja, zgodnjega vključevanja v vrhunske raziskave ter razmišljanja o etičnih vprašanjih, povezanih z raziskavami in znanstvenimi dognanji.

V okviru projekta smo izvajali različne aktivnosti na več nivojih intenzivnosti in širine. Na številnih predavanjih na srednjih šolah smo raziskovalci predstavljali naše najbolj zanimive rezultate in ozadja raziskav. Dijaki so na ekskurzijah v naše laboratorije na KI in FFA UL spoznavali, kako raziskovalno delo poteka v praksi in se srečali z znanstveniki v njihovem delovnem okolju. Na delavnicah v srednjih šolah smo dijakom bolj poglobljeno predstavili področje, metodologijo raziskovanja in raziskovalne probleme. Na okroglih mizah, na katerih so z debatami sodelovali tudi dijaki, smo govorili o sintezni biologiji, bioloških zdravilih in etiki. Organizirali smo tudi dva poletna raziskovalna tabora, enega o sintezni biologiji in drugega o z dokazi podprti medicini. Dijakom ter njihovim mentorjem smo omogočili tudi vključevanje v znanstveno-raziskovalno delo, in sicer so dijaki pod strokovnim vodstvom raziskovalcev KI, FFA in FF UL raziskovali na področjih najnovejših spoznanj znanosti. V okviru projekta so dijaki naredili 32 raziskovalnih nalog. Vse aktivnosti projekta so bile za dijake brezplačne.

V projektu je sodelovalo blizu 4000 udeležencev iz vseh slovenskih regij in predstavlja velik uspeh na področju širjenja znanja o vedah o življenju in izobraževanja nadarjenih mladostnikov.

Proizvodnja bioplina iz različnih odpadkov

Kosta Cerovič
II. gimnazija Maribor

Mentorja: Zdenka Keuc (II. gimnazija Maribor) in Gregor Zupančič (Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani)

Zlato priznanje na državnem tekmovanju mladih znanstvenikov 2013, kategorija Ekologija z varstvom okolja-srednje šole

V nalogi sem preučil, kako bi z anaerobno razgradnjo izbranih odpadkov lahko pridobivali uporaben energetski vir – bioplin oz. bio-metan. Uporabil sem naslednje odpadke: majonezo, ki ji je potekel rok trajanja, odpadno blato iz bioloških čistilnih naprav, milnico, ki v različnih tehnoloških procesih nastaja kot odpadek, odpadni filtrni material, odpadna mineralna olja ter odpadna belilna sredstva.

Z uporabo modificirane standardne metode sem najprej določil kemijsko potrebo po kisiku (KPK) in zatem izmeril količino metana ter bioplina, ki se izloči pri anaerobni razgradnji omenjenih odpadnih snovi. Kot kriteriji za izbiro najustrežnejšega substrata (=odpadka) za pridobivanje bioplina in biometana so bili izbrani: delež odpadka, ki se pretvori v bioplin, delež bio-metana v bioplinu, hitrost reakcije, delež vlage v substratu, proizvodnja metana glede na KPK vrednost, delež zmanjšanja hlapnih trdnih snovi v substratu ter količina inhibitorjev, ki se nahajajo v substratu.

Rezultati kažejo, da ima odpadna majoneza največji biometanski potencial, na drugem mestu je odpadno blato čistilnih naprav. Majoneza ima naslednje prednosti: visoka proizvodnja bioplina (0,779 mL bioplina/mg hlapnih snovi), visoka koncentracija bio-metana (0,647mL CH₄ (g)) na miligram hlapnih snovi) in visoka koncentracija metana glede na izmerjeno KPK vrednost (0,256 mL CH₄(g)/mg KPK), zadovoljiva hitrost reakcije in visok odstotek metana v bioplinu. Delna pomanjkljivost je nizka vrednost vlage ter nedostopnost v večjih količinah. Odpadno blato je odličen kandidat s stališča vsebnosti vode kot tudi dejstva, da je nastali bioplin skoraj čisti metan. Preostali kandidati za proizvodnjo bioplina so se izkazali kot mnogo slabša izbira ali glede na izbrane kriterije neustrezni.

Razvoj gensko spremenjenih mlečnokislinskih bakterij za zdravljenje kronične vnetne črevesne bolezni

Staša Kosler

Institut Jožef Stefan, Ljubljana in Fakulteta za Farmacijo, Univerza v Ljubljani

Mentor doktoranda: Borut Štrukelj

Somentor doktoranda: Aleš Berlec

Med kronično vnetno bolezen (KVČB) prištevamo Crohnovo bolezen in ulcerozni kolitis. Gre za bolezen neznane etiologije z značilnim kroničnim doživljenjskim potekom z akutnimi zagoni ter vmesnimi krajšimi ali daljšimi mirovanji. Pri Crohnovi bolezni se lahko vnetje pojavi na katerem koli delu prebavne poti in lahko prizadene vse plasti črevesne stene, medtem ko se pri ulceroznem kolitisu to pojavlja le na površini sluznice debelega črevesja. Osnovni namen zdravljenja KVČB je prekinitev akutnega zagona bolezni in nato vzdrževanje mirovanja. Za zdravljenje so trenutno na voljo derivati salicilne kisline, kortikosteroidi, antibiotiki, imunosupresivi ter v zadnjih dvajsetih letih tudi veliko število bioloških zdravil, predvsem monoklonska protitelesa proti provnetnim citokinom. Največkrat se uporablja infliximab (Remicade®), ki v telesu sistemsko inhibira tumor nekrotizirajoči faktor alfa (TNF α). Nekajletna sistemska uporaba bioloških zdravil je razkrila tudi nekatere neželene sistemske učinke, ki so posledica zmanjšane koncentracije TNF α in ostalih provnetnih citokinov, kar povzroča trikratno povečano verjetnost razvoja oportunističnih infekcij (tuberkuloze) in nekaterih vrst raka.

V okviru doktorske naloge želimo pripraviti osnovo za alternativno metodo zdravljenja z usmerjenim lokalnim delovanjem v lumnu črevesja. Pripravili smo rekombinantne probiotične bakterije *Lactococcus lactis*, ki so sposobne vezave provnetnih citokinov 17 oziroma 23.

Na površini bakterij smo izrazili vezavne proteine; protein za vezavo provnetnega citokina 17 ter protein za vezavo provnetnega citokina 23. Vezavo rekombinantnih citokinov smo nato potrdili z metodo ELISA.

Delo bomo nadaljevali s predkliničnimi študijami ter pripravili osnovo za nadaljnji razvoj alternativnega zdravila za zdravljenje KVČB, ki bo cenovno in terapevtsko ugodnejši od obstoječih načinov.

Samočistilnost tkanin na osnovi nanoprevlek

Aleš Zupančič
Gimnazija Novo mesto

Mentorji: Marija Kočar (Gimnazija Novo mesto), Boštjan Erjavec (Kemijski inštitut, Ljubljana) in Tatjana Tišler (Kemijski inštitut, Ljubljana)

Zlato priznanje na državnem tekmovanju mladih znanstvenikov 2013, kategorija Interdisciplinarna področja - srednje šole

Cilj našega raziskovalnega dela je bil razvoj tkanine s takšnim nanosom različnih nanodelcev, ki bo omogočala najvišjo možno stopnjo samočistilnosti in bo okolju in ljudem prijazna. Želeli smo tudi, da bi bili nanosi posameznih nanodelcev na tkanini čim bolj homogeni ter da bi prekrivali vlakno v celoti. Tako ne bi prišlo do neželenih izpustov strupenih nanodelcev v okolje oz. v človeka preko kože. Za raziskavo smo uporabili liocelna vlakna, ki smo jih obdelali v različnih suspenzijah nanodelcev. Preiskovali smo fotokatalizo nanodelcev TiO_2 , ZnO ter Fe_2O_3 . S pomočjo absorpcijskih spektrov smo določili optimalno razmerje med posameznimi nanodelci za zagotavljanje kar najvišje absorbance tudi v vidnem delu sončnega spektra. Nanose na tkanino, obdelano v suspenziji z najširšim absorpcijskim spektrom, smo pregledali pod elektronskim mikroskopom ter določili kakovost le-teh. Izvedli smo test samočistilnega učinka. Kot preiskovano snov za razgradnjo smo uporabili model organskega onesnaževalca bisfenola A. Preverili smo, kolikšen del nanodelcev se sprosti v okolje pri stresanju dela tkanine v vodi in ali so nanodelci, ki so se pri tem sprostili v vodo, strupeni za vodne organizme: vodne bolhe *Daphnia magna*, morske bakterije *Vibrio fischeri* ter tropske ribe *Danio rerio*. Rezultati kažejo na to, da lahko z uporabljeno metodo pripravimo učinkovite nanose, ki so zelo homogeni in prekrivajo vlakno v celoti. Po 2 urah obsevanja tkanine s halogensko žarnico smo uspeli razgraditi 23 % bisfenola A, kar kaže na visoko fotokatalitsko lastnost tkanine. Pri intenzivnem stresanju se zelo majhen del nanodelcev sprosti v vodo, pri čemer ti nanodelci niso strupeni za nobenega izmed preiskovanih organizmov.

Kaj delajo alge na Kemiji?

Marko Dolinar

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

marko.dolinar@fkkt.uni-lj.si

Cianobakterije, ki jih nekateri še vedno imenujejo modrozeleni alge, niso alge, saj imajo celice zgrajene zelo podobno kot bakterije. So enoceličarji, ki niso vedno enocelični. Živijo od vode in sonca in nam dajejo kisik, ki ga dihamo. Ob tem ogljikov dioksid pretvarjajo v organsko snov - sladkorje, lahko pa tudi še kaj drugega, kar je za človeka morda še bolj pomembno - obnovljiva goriva, na primer olja, ali pa vodik. Alge so torej na Kemiji zato, ker so prave kemijske tovarne. Če jih razumemo, jih lahko spremenimo na tak način, da bodo proizvajale snovi, ki jih želimo. V našem primeru delajo vodik, vodik pa bo pogonjal motorje.

Ko spreminjamo gensko zasnovo organizmov, pa čeprav so to bakterije, moramo poskrbeti, da gensko spremenjeni organizmi ne zaidejo v okolje. Z njimi delamo v 'zaprtih sistemih', laboratorijih, v katerih še posebej pazimo na to, da žive celice ne morejo ulti. Če pa bi cianobakterije uporabljali v velikem merilu, v bazenih, ali v med seboj povezanih fotobioreaktorjih, bi morali v celice vgraditi varnostne mehanizme, ki bi celice, ki bi zašle v okolje, uničili. To pa ni enostavno. V naši raziskovalni skupini poskušamo z orodji sintezne biologije pripraviti take cianobakterije, da bi se zunaj kontroliranega sistema za gojenje same uničile. To lahko naredimo tako, da preuredimo gene, jih postavimo pod spremenjeno kontrolo in morda v celice vstavimo nove gene iz sorodnih organizmov. S temi geni celica lahko proizvede encime za razgradnjo lastne DNA.

Če želimo celice spremeniti tako, da se bodo same uničile, moramo razumeti, kako celica umre. Zanimivo je, da bakterije vsebujejo nekatere encime, ki so podobni človeškim encimom, za katere vemo, da sodelujejo pri posebni, programirani celični smrti. A kaj ti encimi sploh počnejo pri bakterijah? To moramo šele ugotoviti. Potem je tu vprašanje, ali se laboratorijske cianobakterije sploh lahko križajo s cianobakterijami v okolju. Vemo, da cianobakterije v Sloveniji živijo, predvsem v jezerih in morjih, vprašanje pa je, ali so dovolj sorodne, da bi lahko prišlo do izmenjave genetskega materiala med laboratorijskimi in naravnimi. Ko pogledate enocelične cianobakterije pod mikroskopom, so tako majhne in podobnih oblik, da jih je med seboj zelo težko razlikovati. Zato poskušamo razviti molekularna orodja, s katerimi bi lahko razlikovali sorodne vrste med sabo. Pri tem uporabljamo podobne pristope kot forenziki v ameriških nadaljevanjih.

Biokemiki analiziramo proteine in nukleinske kisline, raziskujemo procese v živih celicah, uporabljamo orodja genske tehnologije in sintezne biologije. Zanima nas, kako delujejo encimi, kako se med seboj pogovarjajo celice, znamo pripraviti boljše protitelesa kot jih naredi narava, raziskujemo imunski odgovor in vlogo različnih molekul pri boleznih, ki jih še ne znamo pozdraviti. Čudimo se zapletenim potem prenosa kromosomskih fragmentov in načinom, ki so jih organizmi razvili v boju proti virusnim okužbam. Ni torej čudno, da je zanimanje za študij biokemije veliko, študij pa raznolik in ne ravno enostaven.

Biokemija in molekularna biologija sta zanimivi vеди s številnimi področji. Alge, ki so na prvi pogled domena biologov, so samo eno od možnih izhodišč za vstop v svet odkrivanja skrivnosti življenja na ravni molekul. Konec koncev so čudeži narave v svoji osnovi preplet biokemijskih reakcij.

Bionanomateriali na osnovi polipeptidov

Dominik Jankovič, Florijan Jalševac, Diana Fink
Srednja šola Črnomelj

Mentorji: Margareta Šavli (Srednja šola Črnomelj), Andrej Čufer (Srednja šola Črnomelj) in Helena Gradišar (Kemijski inštitut, Ljubljana)

Srebrno priznanje na državnem tekmovanju mladih znanstvenikov 2014, kategorija Interdisciplinarna področja - srednje šole

Bionanomateriali so materiali, ki imajo vsaj eno dimenzijo manjšo od 100 nm in katerih gradniki so biološke makromolekule, kot so nukleinske kisline in polipeptidi. Bionanostrukture pa imajo vse dimenzije na nanometrski skali. V naši raziskovalni nalogi smo se osredotočili na načrtovanje in pridobivanje nanostrukture, oblike štiristrane piramide. Piramida je bila načrtovana tako, da se tvori iz ene same polipeptidne verige PIR16, ki jo sestavlja šestnajst peptidnih segmentov, v točno določenem vrstnem redu med seboj povezanih s povezovalnim segmentom. Aminokislinske sekvence teh peptidov so bile načrtovane tako, da posamezen peptid tvori ovito α -vijačnico samo s svojim parom. Na ta način je omogočeno zvitje polipeptidne verige v piramidno strukturo, katere robovi predstavljajo ovite α -vijačnice. Rekombinantni polipeptid PIR16 smo pridobili v bakterijah in ga izolirali ter očistili s pomočjo afinitetne kromatografije. Z elektroforezo smo preverili, ali je polipeptid dovolj očiščen. Nato smo izvedli postopek, ki omogoča samosestavljanje polipeptida. Raztopino denaturiranega polipeptida pri nizki koncentraciji smo dializirali, pri čemer se je iz raztopine odstranjeval denaturant gvanidinijev hidroklorid. Tako so bili ustvarjeni pogoji za nastanek načrtovane nanostrukture. Nastale strukture smo karakterizirali, da bi pokazali, da smo resnično pridobili načrtovano strukturo. Z merjenjem dinamičnega sipanja svetlobe smo pokazali, da so nastale strukture res nanodimenzij, velike okoli 12 nm. Z merjenjem cirkularnega dikroizma smo preverili, da so nastale strukture α -vijačno zvite. Prav tako smo potrdili veliko temperaturno stabilnost struktur. Tudi z mikroskopom na atomsko silo so bili vidni delci ustreznih velikosti. Da gre nedvoumno za piramidne strukture, bi bilo potrebno pokazati še s transmisijskim elektronskim mikroskopom, ki je bil žal v času opravljanja raziskovalne naloge še v inštalaciji.

Moduli toksin-antitoksin

San Hadži

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani in Vrije Universiteit Brussles

Mentor doktoranda: Jurij Lah

Moduli toksin-antitoksin so majhni bakterijski operoni, ki pomagajo bakterijam preživeti v neugodnih razmerah recimo pri pomanjkanju hranil ali prisotnosti antibiotikov. Takrat se toksin sprosti iz proteinskega kompleksa toksin-antitoksin ter napade celično tarčo – na primer DNA girazo ali ribosom in na ta način spravi celico v stanje hibernacije.

Pri TA modulih je tudi zelo zanimiva avtoregulacija prepisovanja genov, saj je ključno pri regulaciji molsko razmerje med toksinom in antitoksinom. Tukaj bi rad predstavil model avtoregulacije enega izmed TA modulov HigBA2. Delovanje tega modula sem raziskoval z biokemijskimi metodami, preko strukturne biologije in z računalniškim modeliranjem. Modul je bolj preprost od do sedaj opisanih modulov (CcdBA, RelBE), a kljub minimalistični zgradbi omogoča kompleksno regulacijo. Na molekularni ravni bi pojasnil katere strukturne in termodinamske značilnosti omogočajo tako regulacijo. Raziskavo sem opravljal tekom doktorata, ki poteka na univerzi Vrije v Bruslju in na UL, FKKT.

Vrednotenje interakcij med (biološkimi) makromolekulami z encimskoimunskimi testi

Karla Makoter, Špela Gubič, Sara Kreft
Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

Mentorja: Marija Meznarič (Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer) in Peter Molek (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljana)

Srebrno priznanje na državnem tekmovanju mladih znanstvenikov 2014, kategorija Biologija - srednje šole

Leptin je proteinski hormon, ki ga izločajo maščobne celice in pomembno sodeluje pri uravnavanju energijskega ravnovesja organizma. Poleg tega leptin vpliva tudi na ostale fiziološke procese, kot so: imunski odziv, vzdrževanje reproduktivnih funkcij, uravnavanje plazemske koncentracije glukoze in arterijskega tlaka, angiogeneza in regeneracija tkiv. Povišana koncentracija leptina v krvi škodljivo vpliva na nastop in potek nekaterih resnih bolezni, kot so rakava obolenja, avtoimunske bolezni, ateroskleroza in sladkorna bolezen. Zaradi tega raste zanimanje za razvoj zaviralcev delovanja leptina, ki bi glede na dosedanje raziskave utegnili biti uporabni pri zdravljenju omenjenih bolezni. Nedavno so na Fakulteti za farmacijo (Univerza v Ljubljani) izolirali in pripravili več rekombinantnih enoverižnih fragmentov variabilne regije protiteles (scFv), ki se vežejo na leptinski receptor in zato predstavljajo potencialne antagoniste oz. zaviralce delovanja leptina, a jih je potrebno za uporabo v terapevtske namene izdatno preizkusiti.

Še pred testiranjem z uporabo celičnih kultur in laboratorijskih živali je potrebno do potankosti preučiti lastnosti fragmentov scFv na molekularnem nivoju. Zato smo se v okviru raziskovalne naloge lotili podrobnejšega vrednotenja interakcij med izbranimi rekombinantnima fragmentoma scFv 3L5 in 3L18 ter njuno tarčo, leptinskim receptorjem. V ta namen smo opravili več prirejenih različic encimskoimunskih testov (ELISA) in pridobili veliko uporabnih rezultatov za nadaljnje delo. Ugotovili smo, da se preiskovana fragmenta scFv specifično vežeta na zunajcelično regijo človeškega leptinskega receptorja, in sicer na vezavno mesto receptorja ali na del v njegovi neposredni bližini, saj pri vezavi fragmenta tekmujeta z leptinom v odvisnosti od njune koncentracije. Obenem smo s posebej prirejenima različicama kompetitivnega testa ELISA uspeli določiti vrednosti srednje inhibitorne koncentracije (IC₅₀) in ravnotežne disociacijske konstante (K_d), ustreznost uporabljenih metod pa smo potrdili z ustreznimi kontrolnimi testi. Določeni vrednosti IC₅₀ znašata 722 nM (scFv 3L5) in 1,24 μM (scFv 3L18), vrednosti K_d pa 53,7 nM (scFv 3L5) in 98,3 nM (scFv 3L18), iz česar se vidi, da je fragment 3L5 skoraj dvakrat močnejši vezalec in hkrati bolj učinkovit inhibitor vezave leptina na receptor.

Glede na poznane lastnosti terapevtskih protiteles na tržišču menimo, da je jakost vezave testiranih fragmentov scFv nekoliko prenizka za zadovoljivo učinkovitost pri preizkušanju na živalskih modelih. Takšni testi bi bili zaradi potrebnih visokih odmerkov tudi etično vprašljivi. Vseeno pa imata oba fragmenta raziskovalno in diagnostično uporabnost. Za izboljšanje terapevtske uporabnosti fragmentov scFv predlagamo njihovo spremembo s postopki mutageneze in sledečimi afinitetnimi selekcijami ter tvorbo celotnih molekul protiteles z vgrajenimi variabilnimi domenami izbranih fragmentov scFv.

Optimizacija priprave, strukturna in biokemijska karakterizacija testikana-2 ter iskanje interakcijskih partnerjev v možganih

Aljaž Gaber, Maja Kostanjevec, Miha Pavšič, Brigita Lenarčič
Katedra za biokemijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

Testikan-2 je modularen, zunajcelični proteoglikan, ki skupaj s testikanoma -1 in -3 sestavlja družino testikanov. Tridimenzionalna struktura testikanov še ni poznana. Tudi njihova vloga v organizmu, kljub nekaterim eksperimentalnim podatkom, še ni popolnoma razumljena.

Sistem za izražanje testikana-2 v insektnih celicah Sf9, ki ga je predhodno razvil dr. Miha Pavšič, smo dodatno optimizirali tako, da je bil izplen glikozilirane oblike testikana-2 4,33 mg/l, kar je 23,7 % več kot prej. Poleg tega smo pojasnili vpliv nekaterih parametrov, kot sta čas izražanja, in koncentracija insektnih celic ob okužbi na razmerje med cepljeno in necepljeno obliko proteina po izolaciji ter optimizirali postopek za ločevanje med njima. Dodatno smo poleg že pripravljenih zapisov za glikozilirano (Tst2g) in neglikozilirano obliko (Tst2deg) pripravili tri nove, skrajšane oblike testikana-2: N-končno regijo testikana-2 (N-regTst2), na C-koncu skrajšano obliko (Tst2-C) in na N- ter C-koncu skrajšano obliko (Tst2-NC).

S primerjavo spektrov cirkularnega dikroizma proteinov Tst2g in Tst2-C smo pokazali, da C-končna regija testikana-2 nima urejene strukture.

To delo je bilo predstavljeno v sklopu diplomske naloge Aljaža Gabra z naslovom »Optimizacija priprave in biokemijska ter strukturna karakterizacija testikana-2 v celi in skrajšanih oblikah.«, ki je bila opravljena pod vodstvom prof. dr. Brigite Lenarčič.

V nadaljevanju je študentka Maja Kostanjevec v sklopu svoje diplomske naloge s tehniko pull-down iskala interakcijske partnerje testikana-2 v govejih možganih. Rezultati kažejo, da testikan-2 interagira z α -1 in α -2 verigama kolagena I, kar je popolnoma nova ugotovitev. Naš namen je to ugotovljeno interakcijo tudi dodatno okarakterizirati in pojasniti njen biološki pomen.

Vpliv pozitivno nabitih proteinov na internalizacijo eksogene DNK

Nejc Kejžar, Jan Gojznikar
I. gimnazija v Celju

Mentorici: Mojca Alif (I. gimnazija v Celju) in Mojca Benčina (Kemijski inštitut, Ljubljana)
Zlato priznanje na državnem tekmovanju mladih znanstvenikov 2014, kategorija Kemija ali kemijska tehnologija - srednje šole

V raziskovalni nalogi nas je zanimal prenos krajše enoverižne DNK v celico v prisotnosti pozitivno nabitih proteinov. Kot osnovo smo vzeli oligonukleotid (ODN10104), označen s fluorescenčnim barvilom Cy3, in ga celoten eksperiment kombinirali z dvema pozitivno nabitima proteinoma, poli-L- in poli-D-lizinom.

Proteina smo najprej ločeno ustrezno označili s fluorescenčnim barvilom Cy5. Nezreagirano barvilo Cy5 smo iz mešanice odstranili s pomočjo gelske kromatografije. Koncentracijo izoliranih in očiščenih označenih proteinov smo določili z metodo BCA. Za eksperimente *in situ* smo uporabili celične kulture HEK293, HEK293T in celično linijo monocitov MonoMac 6.

V nadaljevanju smo spremljali vnos obeh polilizinov z oligonukleotidom, označenim s Cy5 ali brez njega, v celice HEK in celično linijo monocitov MonoMac6. Pri tem smo uporabili mikroskopske tehnike, pretočno citometrijo in merjenje aktivacije Tollu podobnega receptorja 9 (TLR9) prirojene imunosti. Kolokalizacijo polilizinov z oligonukleotidi in receptorjem TLR9 smo spremljali z mikroskopom. Pri tem smo celične organele barvali s fluorescenčnimi barvili ali s fuzijskimi proteini, označenimi s fluorescirajočimi proteini. Potrdili smo kolokalizacijo polilizinov, oligonukleotida in TLR9 v endosomih in lizosomih.

Aktivacijo TLR9 z oligonukleotidi smo preverjali s celicami HEK, ki smo jim vnesli plazmide, z zapisi za TLR9 in reporterske proteine. Pokazali smo, da dodatek poli-D-lizina ligandu oligonukleotidu močno zniža aktivacijo TLR9, medtem ko ima poli-L-lizin le slabši inhibitorski učinek na aktivacijo TLR9.

Hitrost vstopanja oligonukleotidov v celice HEK in monocite smo spremljali s pretočno citometrijo. Celicam HEK in monocitom smo dodali označena proteina poli-L- in poli-D-lizin brez oligonukleotidov ali z označenimi oligonukleotidi in v časovnih intervalih merili količino označenih kemikalij v celicah. Pokazali smo, da polilizina v prisotnosti oligonukleotida vstopata hitreje v monocite kot v celice HEK. Pokazali smo tudi, da oba proteina izboljšata vnos oligonukleotidov v celico.

Dodatek pozitivno nabitih proteinov izboljša učinkovitost vstopanja enoverižne DNK v celico. Ugotovili smo tudi, da poli-L- in poli-D-lizin vsaj deloma zaščitita oligonukleotida pred delovanjem deoksiribonukleaz v endosomih, vendar zavirata vezavo oligonukleotida na TLR9, s čimer zmanjšata odziv celice.

Dobrodošli v svetu toksinov

Tom Turk

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Katedra za biokemijo je matična katedra, katere člani sodelujejo kot nosilci ali soizvajalci številnih biokemijskih in sorodnih predmetov v okviru prvostopenjskih in drugostopenjskih programov študija biologije, mikrobiologije in biotehnologije na BF, pa tudi na nekaterih drugih programih, ki jih izvajata PF in FKKT. V našem laboratoriju so diplomirali, magistrirali in doktorirali številni do-in podiplomski študentje oziroma mladi raziskovalci. Raziskovalno delo katedre za biokemijo Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti UL je že od vsega začetka usmerjeno v preučevanje toksinov in ostalih biološko aktivnih snovi, pri čemer so nas večinoma najbolj zanimali toksini iz morskih organizmov, v zadnjih letih pa smo se začeli ozirati tudi po drugih virih kot so glive in bakterije. Laboratorij je specializiran in opremljen predvsem za izolacijo in določanje lastnosti proteinov ter za proučevanje njihove interakcije z naravnimi in umetnimi lipidnimi membranami. Biološko aktivne spojine večinoma izoliramo iz morskih nevretenčarjev, pa tudi iz nekaterih uporabnih gliv. Ekvinatoksin II je dolgoletni paradni konj naših raziskav. Je eden od številnih toksinov aktinoporinske družine proteinov iz morskih vetrnic. To so zelo močni toksini z vrsto farmakoloških učinkov. V zadnjih letih poskušamo razumeti interakcijo ekvinatoksina z membranami na molekularnem nivoju. Predvsem nas zanima topologija membransko vezanega toksina, kateri deli toksina sodelujejo pri vezavi in oligomerizaciji in kateri tvorijo membransko poro. Podobne raziskave opravljamo tudi z ostreolizini, pripadniki družine aegerolizinov, ki jih najdemo predvsem v glivah. V zadnjem času preučujemo tudi delovanje nekaterih sintetičnih snovi narajenih na osnovi izvirne naravne spojine iz morske spužve. Preučujemo njihovo delovanje na rakaste celice zlasti na celice nekaterih oblik pljučnega raka, ki izražajo acetilholinske nikotinske receptorje. Ti imajo pomembno vlogo v preprečitvi apoptoze rakastih celic in posledično njihove proliferacije. V okviru katedre za biokemijo deluje tudi infrastrukturni center UL za površinsko plazmonsko resonanco (ang. Surface Plasmon Resonance, SPR), ki je namenjen osnovnim raziskavam interakcije bioloških makromolekul in razvoju analitskih metod za potrebe farmacije, živilske industrije, biotehnologije in varstva okolja. S pomočjo SPR merimo interakcije bioloških makromolekul, katerih relativna molekulska masa je večja od 180. Še zlasti je ta metoda uporabna za ugotavljanje interakcij med biološkimi makromolekulami ali celo med večjimi delci.

Protičnost topila ima velik vpliv na hitrost reakcije antioksidantov s prostimi radikali

Tjaša Prevc

Katedra za biokemijo in kemijo živil, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentor doktoranda Blaž Cigić

Somentor doktoranda: Nataša Šegatin

Hitrost reakcije med prostimi radikali in antioksidanti je odvisna od kemijskega okolja, v katerem reakcija poteka. Največji vpliv ima protičnost topila, ki narekuje mehanizem reakcije. V aprotičnih topilih hidroksilne skupine antioksidantov ostanejo neionizirane, zato med prostim radikalom in –OH skupino antioksidanta poteka prenos vodikovega atoma (*angl. hydrogen atom transfer* - HAT). V protičnih topilih kot so alkoholi ali vodne raztopine so hidroksilne skupine delno ionizirane in v prisotnosti prostega radikala poteče prenos elektrona (*angl. electron transfer* – ET), ki je v primerjavi s HAT mehanizmom bistveno hitrejši.

Reakcije med prostimi radikali, ki absorbirajo v vidnem delu spektra, in antioksidanti se uporabljajo za določevanje antioksidativnega potenciala (AOP), ki je merilo za vsebnost/učinkovitost antioksidantov v določenem matriksu. Na primeru rastlinskih olj smo pokazali, da s povečanjem protičnosti topila povečamo hitrost reakcije tudi za dva velikostna razreda in posledično določimo večji AOP predvsem v oljih kot so oljčno, sezamovo in bučno, ki poleg vitamina E vsebujejo tudi druge antioksidante.

V modelnih lipidnih sistemih in rastlinskih oljih smo testirali, ali dodatek nepolarnih baz (heksilamin, triheksilamin) vpliva na potek peroksidacije maščobnih kislin. Ugotovili smo, da tako primarni kot terciarni amin že v milimolarnih koncentracijah drastično upočasnita tvorbo hidroperoksidov in oksidacijo α in γ -tokoferola (vitamin E). Amini so imeli večji učinek na olja in modelne sisteme, ki so vsebovali γ -tokoferol. Predvidevamo, da je zmanjšana hitrost peroksidacije povezana z večjo reaktivnostjo tokoferolov, saj smo v prisotnosti aminov določili večje konstante reakcijske hitrosti z radikali.

Vpliv antioksidantov na spremembe celic povrhnjice kože po obsevanju z UV svetlobo

Matevž Štular, Pia Cerkovnik, Eva Natalija Novak Jevtić
Gimnazija Poljane

Mentorici: Nataša Koprivnikar (Gimnazija Poljane) in Katarina Pegan (Institut Jožef Stefan, Ljubljana)
Srebrno priznanje na državnem tekmovanju mladih znanstvenikov 2014, kategorija Druga področja - srednje šole

Znano je, da UV-svetloba poškoduje celice naše povrhnjice. Posledice so opekline različnih stopenj, lahko pa povzročijo tudi nastanek kožnega raka. Večini krem dodajajo antioksidante, saj naj bi le-ti pripomogli k zaščiti pred UV-svetlobo. Antioksidanti so snovi, ki preprečujejo oksidacijo substrata. Namen raziskovalne naloge je bilo ugotoviti, kako UV-svetloba vpliva na keratinocite in kako antioksidanti vplivajo na celice po obsevanju. Za doseg tega cilja smo uporabili celično kulturo HaCaT celic naše povrhnjice. Celice smo tretirali z vitaminom C in E, resveratrolom in N-acetil-L-cisteinom pred in po obsevanju. Pri negativni kontroli celic nismo ne obsevali, niti jim nismo dodali antioksidantov. Pri pozitivni kontroli smo celice tretirali z antioksidanti samo pred obsevanjem. Dokazali smo, da UV svetloba povzroči apoptozo celic. Po 24 urah bistvene razlike med poskusom in pozitivno kontrolo nismo opazili, vsekakor pa je bila razlika vidna med negativno kontrolo in celicami, ki so bile obsevane. Iz dobljenih rezultatov ne moremo sklepati, da antioksidanti pripomorejo k zaščiti celic naše povrhnjice. Zatorej smo bili hipotezo primorani ovreči.

Nekroptoza – nova oblika celične smrti

Nežka Kavčič^{1,2}, Katarina Pegan¹, Peter Vandenabeele³, Vito Turk^{1,2} and Boris Turk^{1,4}

¹Oddelek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo, Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

²Mednarodna podiplomska šola Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

³Oddelek za biomedicinsko molekularno biologijo, Univerza v Ghentu, Tehnološki park, Ghent, Belgija

⁴Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov, Ljubljana, Slovenija

nezka.kavcic@ijs.si

V večceličnih organizmih je potrebno ohranjanje ravnovesja med nastajanjem novih celic in celično smrtjo. Porušenje tega ravnovesja pomeni hudo bolezensko stanje, ki je lahko tudi neozdravljivo. Poznamo različne oblike celične smrti, ki se med seboj ločijo na podlagi morfoloških, biokemijskih, imunoloških značilnosti ali posledic na delovanje organizma. Med njimi sta najbolj raziskani apoptoza in nekroza. Apoptoza ni naključen, temveč je strogo reguliran proces celičnega samouničenja (samomora) in igra pomembno vlogo pri razvoju organizma, odstranjevanju poškodovanih ali okuženih celic, regulaciji in delovanju imunskega sistema. Zapis zanjo nosi celica v genih. Okužba z različnimi patogeni, izpostavitve strupom, ekstremnim temperaturam, reaktivnim kisikovim spojinam ali spontane rakaste mutacije pa lahko sprožijo nekrozo – celični umor. V osnovi naj bi bila nekroza nekontroliran proces, pri katerem pride do nabrekanja celic in posledičnega popuščanja celičnih membran ter razlitja celične vsebine, kar sproži imunski odziv in s tem boleče vnetje. V zadnjem času so bile opisane tudi druge oblike celične smrti. V okviru našega projekta smo se tako osredotočili na nekroptozo, ki je definirana kot programirana nekrotična celična smrt, pri kateri imajo ključno vlogo RIP 1 in RIP 3 kinaze. Povezujejo jo z razvojem nekaterih bolezni, kot so rak, avtoimunske in nevrodegenerativne bolezni ter razvojne motnje. Zato je raziskovanje posameznih molekularnih komponent in njihove vloge v nekroptozni ključno za razvoj novih zdravil.

Razvoj metode za analizo aktivnosti oksidaz L-aminokislin v gelu in njena uporaba pri analizi vzorcev gob

Gašper Žun
Gimnazija Kranj

Mentorica: Jerica Sabotič (Institut Jožef Stefan, Ljubljana)

Zlato priznanje na državnem tekmovanju mladih znanstvenikov 2014, kategorija Biologija - srednje šole

Oksidaze L-aminokislin so encimi, ki pretvarjajo L-aminokislino v α -ketokislino, amonijak in vodikov peroksid. Nahajajo se v rastlinah, žuželkah, kačjem strupu in glivah, kjer imajo funkcijo obrambe organizma, vključene pa so tudi v metabolizmu aminokislin.

Prisotnost oksidaz L-aminokislin lahko zaznamo posredno, saj hrenova peroksidaza pri svoji katalitični aktivnosti na vodikovem peroksidu z o-fenilendiaminom povzroči nastanek barvnega produkta, glede na intenziteto obarvanja pa lahko primerjamo tudi aktivnosti teh encimov v različnih vzorcih. V svoji raziskavi sem razvil in optimiral metodo za detekcijo L-aminokislin v gelu in jo uporabil pri analizi več gobjih vzorcev. Pri tem sem primerjal aktivnosti oksidaz L-aminokislin v gobah na različnih substratih in določil njihove molekulske mase.

Ugotavljal sem tudi fungicidni in protibakterijski učinek gobjih ekstraktov in ugotovil, da je učinek posledica predvsem encimov, saj predhodno toplotno obdelani vodni izvlečki niso inhibirali rasti mikroorganizmov.

Oksidaze L-aminokislin so uporabne v medicini in biotehnologiji ter v različnih panogah industrije. Uporabljajo se že kot biosenzorji za zaznavanje L-aminokislin v prehrabnih izdelkih, za beljenje v tekstilni in papirni industriji ter v zobnih pastah. Potencialne biomedicinske aplikacije pa vključujejo antibiotične in protivirusne učinke ter zdravljenje rakavih obolenj. V nalogi sem pokazal, da gobe predstavljajo nepoznan, a bogat vir oksidaz L-aminokislin z različnimi lastnostmi, ki se lahko uporabijo na omenjenih področjih.

Ključne besede: oksidaze L-aminokislin, glive, L-aminokislina, hrenova peroksidaza, rastna krivulja

Genetika in farmakogenomika kompleksnih bolezni

Uroš Potočnik

Center za humano genetiko in farmakogenomiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru

Uros.potocnik@um.si

Je mar res »vse že zapisano v naših genih« kot trdijo komercialni ponudniki genetskega testiranja in v isti sapi ponujajo osebno genetsko analizo s katero lahko izveste kakšni so vaši talenti, atletske predispozicije za športno kariero, inteligenčne zmožnosti in značaj, kako se bo vaš metabolizem odzival na določeno hrano, kako prenašate alkohol, za katerimi boleznimi boste zboleli in kako se odzivate na zdravila? V resnici drži, da so nekatere človeške lastnosti (fenotipi) in bolezni izključno rezultat delovanja genov, najpogosteje celo enega samega gena, in se zelo jasno dedujejo v družini od staršev na potomce v skladu z Mendlovimi zakoni dedovanja (dominantno, recesivno), zato jih imenujemo Mendlove oziroma monogenske bolezni oziroma lastnosti. Genetsko testiranje za monogenske bolezni je že več desetletij nepogrešljivo v klinični praksi pri postavitvi diagnoze, napovedi poteka bolezni in učinkovitem zdravljenju. Zgodnje odkritje mutacije v genih popravljalnega mehanizma tako lahko celo prepreči bolezen in rešuje življenje, saj lahko npr. nosilec mutacije za dedni črevesni rak (sindrom HNPCC) pravočasno odstranujemo benigne novotvorbe še preden se le te preobrazijo v raka. Trenutno poznanih različnih monogenih človeških bolezni je že več kot 5000 vendar so na srečo redke, saj skupno prizadenejo samo nekaj več kot 2% prebivalstva. Odkritje človeškega genoma leta 2001 je omogočilo, da smo ugotovili gen za večino monogenih bolezni in danes lahko z najnovejšo tehnologijo sekvenciranja naslednje generacije (NGS) izvedemo testiranje za skoraj vse monogenske bolezni v enem eksperimentu, saj tehnologija NGS omogoča, da v enem samem eksperimentu analiziramo celoten človeški dedni zapis. Vendar pa večina človeških bolezni in uvodoma navedenih lastnosti spada med kompleksne fenotipe, ki so posledica delovanja več genov (poligeni) in dejavnikov okolja. Študije primerjave enojajčnih in dvojajčnih dvojčkov nam dokazujejo, da ima pri kompleksnih fenotipih dedni dejavnik vpliv v 40%-90%. Glede na majhne prispevke posameznih dednih in okoljskih dejavnikov in njihovo medsebojno prepletenost se zdi iskanje ključnih genov za kompleksne fenotipe kot iskanje igle v senu? V resnici je šele tehnologija mikromrež (biočipov) omogočila asociacijsko analizo v celotnem genomu, s pomočjo katere lahko sočasno primerjamo pogostost alelov DNA polimorfizmov posameznega nukleotida (SNP) v velikem številu bolnikov (primerov) in kontrolni skupini zdravih posameznikov. V naših raziskavah poskušamo pojasniti dedni dejavnik za različne kompleksne bolezni in odziv na zdravila. Bolniki z enako diagnozo se zelo različno odzivajo na zdravila, pri nekaterih zdravilo deluje, pri drugih ne, pri nekaterih pa se zaradi zdravila pojavijo še dodatni zapleti in cilj farmakogenetskih študij je izbira zdravila in doze prilagojene za vsakega posameznika glede na njegov genski zapis. Naša skupina je pred kratkim sodelovala v mednarodnem znanstvenem konzorciju, kjer smo v raziskavi uporabili ImmunoChip za genotipizacijo več kot 200 000 različnih SNP pri več kot 70 000 bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB) in kontrolni skupini zdravih posameznikov in izmed cca 23 000 človeških genov izluščili 163 takšnih, ki dokazano sodelujejo pri nastanku KVČB. Z bioinformatično *in silico* funkcijsko analizo teh genov in molekularno bioloških poti in mrež smo prišli do zanimive ugotovitve, da je velik del genov, povezanih s KVČB, istih, kot jih naše celice in naše telo uporabljajo za odziv na bakterije, predvsem patogene, kot je npr. družina t.i. mikobakterij. Tako bi lahko špekulirali,

da so se v evoluciji človeškega genoma v našem genetskem zapisu določeni geni razvili ob stiku oziroma okužbi z mikroorganizmi in če tega stika ne bi bilo, ne bi bilo napak v genih, ki so povezane s tveganjem za KVČB. Vendar sta narava in evolucija zadeve tako uredili kot so in naša naloga je, da pojasnimo vzroke nastanka bolezni in odkrijemo molekularne tarče za učinkovito zdravljenje.

V sklopu predavanja bodo uvodoma predstavljene tudi možnosti raziskovanje in študija biomolekularnih znanosti na Univerzi v Mariboru.

Luknjanje celic – preučevanje delovanja perforina

Omar Naneh¹, Davor Škofič-Maurer¹, Alenka Buh¹, Franci Merzel¹, Robert J. C. Gilbert², Gregor Anderluh^{1,3}

¹Kemijski inštitut, Ljubljana, Slovenija

²The Division of Structural Biology, Univerza v Oxfordu, Velika Britanija

³Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija

Več kot tretjina celotnega človeškega genoma vsebuje zapise za proteine, ki se vežejo v ali na membrane. V vsakem primeru pa je o večini zelo malo znanega, saj jih je zaradi njihove hidrofobne narave izjemno težko pripraviti v čisti obliki in v visokih koncentracijah. Ker pa igrajo edinstveno vlogo v celični biologiji, je poznavanje njihovih značilnosti izjemno pomembno. Zato obstaja ogromna potreba po razvoju metod za preučevanje njihovih karakteristik tudi, ko imamo na voljo le malo proteina.

Perforin (PFN) je citolitični protein, ki igra pomembno vlogo v imunskem sistemu človeka, saj je udeležen pri uničevanju z virusi okuženih ali tumorskih celic. Po strukturi in funkciji je soroden nekaterim toksinom, ki jih mnoge bakterije sproščajo ob invaziji v telo gostitelja. Ko celice ubijalke sprostijo PFN v bližino tarče, se veže na njihove membrane, oligomerizira in tvori luknje v membrani - pore. Pri tem poruši integriteto membrane, kar pa vodi v smrt celice. Mehanizem vezave na membrano in tvorba pore še nista znana, prav tako pa ni v celoti jasna njegova odvisnost delovanja od pH in kalcija.

Zaradi potreb po razvoju zdravljenja hudih motenj imunskega sistema, do katerih pride v primeru mutacij zapisov za PFN, smo preučevali začetne korake interakcije tega proteina z membranami in ioni. Razvili smo sistem za produkcijo rekombinantne različice PFN v insektnih celicah s pomočjo bakulovirusov. Preučili smo njegove interakcije z ioni, ter ugotovili, da nikelj močno inhibira hemolitično aktivnost PFN. Z računalniškim modeliranjem smo ugotovili, da je PFN ob prvem stiku z membrano močno nagnjen glede na ravnino membrane, kar smo potrdili tudi s krio-elektronsko mikroskopijo in rekonstitucijo posameznih delcev na modelnih membranah - liposomih. Prav tako smo razvili sistem preučevanja PFN in podobnih membransko vezavnih proteinov z nanodiski, cilindričnimi membranskimi kompleksi, s katerimi lahko z elektronsko mikroskopijo in mikrotermoforezo opazujemo prve interakcije PFN s tarčno celico.

Raziskava prinaša število novih načinov preučevanja proteinov, ki se vežejo na membrane, predvsem pa je pomembna za poznavanje karakteristik PFN, za imunski sistem nezamenljivega proteina.

Glikolitični encim gama enolaza omogoča preživetje rakavih celic v stresnih pogojih

Tjaša Vižin, Anja Pišlar, Ib Jarle Christensen, Hans Jørgen Nielsen, Pika Meško Brguljan, Janko Kos:

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Gama enolaza (poznana tudi kot nevronska specifična enolaza) se že dolgo uporablja kot tumorski kazalec pri tumorjih nevrogenega in neuroendokrinega izvora, kot so drobnocelični pljučni rak in nevroblastom. Njena vloga pri raku še ni raziskana, je pa kot glikolitični encim najverjetneje udeležena pri pospešeni aerobni glikolizi, ki omogoča pospešeno proliferacijo rakavih celic. Po drugi strani pa lahko gama enolaza deluje kot faktor preživetja, ki rakavim celicam omogoča preživetje v stresnih pogojih, kot so stradanje, hipoksija ter radio- in kemoterapija. Natančen mehanizem delovanja gama enolaze pri preživetju rakavih celic še ni poznan, so pa pri nevronskih celicah dokazali, da lahko gama enolaza aktivira celične signalne poti, ki so pomembne za preživetje. Ta učinek izkazuje samo gama enolaza z intaktnim C-koncem, cisteinska proteaza katepsin X pa odcepi dve aminokislini na C-končnem delu in tako prepreči njeno delovanje.

V klinični praksi se kot tumorski kazalec uporablja celokupna gama enolaza, torej tako aktivna, kot cepljena oblika. Predvidevamo, da lahko vrednosti necepljene oblike gama enolaze, to je oblike, ki omogoča povečano preživetje rakavih celic, dodatno prispevajo k oceni stanja bolnikov in napovedi poteka bolezni.

Na različnih rakavih celičnih linijah smo preverili, kako se spreminja izražanje aktivne in celokupne gama enolaze, če so celice izpostavljene različnim stresnim pogojem. Ugotovili smo, da se izražanje aktivne gama enolaze pri stresnih pogojih bistveno bolj poveča od izražanja celokupne gama enolaze. Inhibicija ali utišanje izražanja katepsina X povzroči dodatno povečanje izražanja aktivne gama enolaze in posledično preživetje celic pri stresnih pogojih.

Naši rezultati kažejo, da ima gama enolaza, poleg glikolitične aktivnosti, pomembno vlogo kot faktor preživetja rakavih celic. Katepsin X, ki uravnava delovanje aktivne gama enolaze, pa bi lahko predstavljal orodje za upočasnitev malignega procesa.

Pogostost gena *iss* pri komenzalnih sevih bakterije *Escherichia coli*

Ester Premate
Gimnazija Bežigrad

Mentorici: Polona Gros Remec (Gimnazija Bežigrad) in Marjanca Starčič Erjavec (Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani)

Srebrno priznanje na državnem tekmovanju mladih znanstvenikov 2014, kategorija Biologija - srednje šole

Bakterija *Escherichia coli* danes velja za enega najbolj raziskanih prokariotskih organizmov. Živi v debelem črevesju toplokrvnih živali in ljudi kot del normalne mikrobiote. Večina sevov je komenzalnih, kar pomeni, da organizem živi z njimi v sožitju, in načeloma ne povzročajo črevesnih ali zunajčrevesnih okužb. Patogenost sevov je odvisna od prisotnosti z virulenco povezanih genov- eden od teh genov je tudi gen za povišano serumsko odpornost (*increased serum survival gene*) ali gen *iss*. Produkt gena *iss* bakterijski celici olajšuje patogenezo in ji zagotavlja več možnosti za preživetje ob stiku z gostiteljevim imunskim sistemom.

V raziskovalni nalogi je bilo uporabljenih 90 izolatov *E. coli*, izoliranih iz blata zdravih ljudi, obeh spolov in različnih starosti, ki šest mesecev pred odvzemom vzorca niso prejeli nobenih protimikrobnih zdravil. Pogostnost gena *iss* med slovenskimi komenzalnimi sevi *E. coli* še nikoli ni bila raziskana, zato je bil to cilj raziskovalne naloge.

Seve sem najprej nacepila iz trajnikov hranjenih pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ na trdna gojišča in jih nato naslednji dan precepila v tekoča gojišča. Iz prekonočne bakterijske kulture sem pripravila supernatante celic (lizate) in uspešnost priprave lizata preverila z reakcijo ERIC-PCR in agarozno gelsko elektroforezo. Na uspešno pripravljenih lizatih sem ponovila PCR za gen *iss*, z rezultati le-tega pa po agarozni gelski elektroforezi določila pogostnost gena *iss*.

Pozitivnih za gen *iss* je bilo 8 od skupno 90 sevov, torej je pogostnost gena *iss* znašala 9%. Po končanem praktičnem delu sem opravila tudi statistično analizo z namenom ugotavljanja značilnih statističnih povezav z izbranimi lastnostmi sevov te zbirke. Ugotovila sem, da prisotnost gena *iss* v bakterijski celici ni povezana z odpornostjo proti antibiotikom ampicilinu in tetraciklinu, obstajala pa je povezava s 6 drugimi geni, za katere je znano, da se nahajajo na enakem tipu plazmidov kot gen *iss*.

Vloga malih RNA (miRNA) pri odgovoru rastlin krompirja (*Solanum tuberosum* L.) na okužbo s krompirjevim virusom Y

Maja Križnik, Matevž Rupar, Špela Baebler, Kristina Gruden
Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

Krompir je ena izmed ekonomsko najbolj donosnih poljščin, ki ga napadajo številni škodljivci in mnoge bakterije, glive in virusi. Med virusnimi okužbami je gospodarsko najbolj pomembna okužba s krompirjevim virusom Y (PVY). Preučevanje kompleksne interakcije med krompirjem in PVY je predmet intenzivnih raziskav, saj je ključno pri iskanju rešitev za zaščito rastlin in vzgojo odpornih sort, ki prispevajo k večjemu pridelku.

Znano je, da imajo pri odgovoru na okužbo z virusi pomembno vlogo hormoni, predvsem salicilna kislina, ki povzroči kopičenje inhibitorjev virusnega pomnoževanja in zavira razširjanje virusa po rastlini. V zadnjem času so ugotovili, da imajo pomembno vlogo pri tem odgovoru tudi male RNA (miRNA), vendar njihova vloga pri interakciji krompir - PVY, še ni bila raziskana, zato smo želeli preučiti ali okužba z virusom vpliva na izražanje le-teh. Na podlagi poznavanja nukleotidnih zaporedij miRNA in razvoja metode verižne reakcije s polimerazo v realnem času je v današnjem času mogoča tudi analiza izražanja miRNA. Pri raziskovalnem delu smo uporabili dva genotipa krompirja Désirée in transformante NahG-Désirée, ki niso sposobne akumulirati salicilne kisline. Izražanje miRNA se je po okužbi z virusom spremenilo in situacija je bila drugačna pri Désirée kot pri NahG-Désirée. S tem smo potrdili, da je regulacija na nivoju miRNA močno povezana tudi s hormonsko regulacijo.

K boljšemu razumevanju odgovora krompirja na okužbo s PVY prispeva tudi poznavanje širjenja in pomnoževanja virusa v rastlini. Pri raziskovalnem delu smo preučevali širjenje in pomnoževanje PVY iz skupine N pri dveh genotipih krompirja. Opazovali smo pojav bolezenskih znamenj, uporabili metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času in spremljali širjenje virusa z dodanim fluorescenčnim reporterjem (GFP). Potrdili smo, da ima salicilna kislina pomembno vlogo tudi pri širjenju in pomnoževanju manj agresivnega izolata virusa PVY. Pri NahG rastlinah smo namreč opazili močnejša bolezenska znamenja in hitrejše širjenje ter pomnoževanje virusa.

Nano-protitelesa in iskanje označevalcev matičnih celic raka

Radovan Komel

Medicinski center za molekularno biologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Nastanek in razvoj raka je zelo zapleten in dolgotrajen proces, ki se odvija preko številnih stopenj in zajema vpletenost notranjih dejavnikov organizma kot tudi zunanjih, okoljskih dejavnikov. Vedno bolj se uveljavlja spoznanje, da so za začetek bolezni in za njeno trdoživost odgovorne tako imenovane matične celice raka, ki v organizmu ostajajo tudi po odstranitvi tumorja, se samoobnavljajo in so odporne na zdravila proti raku (kemoterapija) kot tudi na obsevanja (radioterapija), kar je tudi razlog, da se bolezen ponovi po navidezno uspešnem zdravljenju. Za natančno diagnostiko, spremljanje poteka bolezni in njenega zdravljenja kot tudi za načrtovanje novih oblik zdravljenja je izredno pomembno prepoznati razlike med normalnimi celicami in celicami raka. Iščemo tako imenovane biološke označevalce raka, ki so največkrat proteinske molekule, navzoče v notranjosti rakaste celice (proteini citoplazme, celičnega jedra) ali na njeni površini (membranski celični proteini). V ta namen se v našem laboratoriju, na Medicinskem centru za molekularno biologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, poslužujemo protiteles, ki naj bi specifično prepoznavala kritične proteine na površini celic, ki so pri raku v primerjavi z normalnimi celicami preiskovanega tkiva navzoči v prevelikih količinah ali pa so spremenjeni zaradi mutacij. Specifična protitelesa pridobivamo tako, da s celicami raka oz. izvlečki njihovih proteinov imuniziramo poskusno žival, iz limfocitov njene krvi nato pridobimo sporočilno RNA (mRNA), ki nosi zapis za protitelesa, ki ga je izzval imunski odgovor živali, in v nadaljevanju s postopki molekulske biologije izdelamo knjižnico rekombinantnih protiteles, ki so odraz imunskega odgovora proti tujim, v žival vnešenim proteinom. S temi protitelesi nato v vzorcih tkiv raka (tumorjih) oz. izvlečkih njihovih proteinov (proteom) z imunoafinitetno vezavo iščemo specifične proteine, ki naj bi bili označevalci raka. Pri našem delu uporabljamo tako imenovana nano-protitelesa, ki jih pridobimo z imunizacijo kamel ali lam. Omenjene živali imajo namreč dvojen, vzporeden imunskih odziv: poleg običajnih protiteles, ki so sestavljena iz dveh težkih in dveh lahkih verig, v imunskem odgovoru proizvajajo tudi težkoverižna protitelesa, sestavljena samo iz dveh težkih verig. Iz njih s postopki genske tehnologije lahko pridobimo hipervariabilne domene, ki jih imenujemo »nano-protitelesa«, saj so zelo majhne (2,5 nm v premeru, 5 nm v dolžini). Odlikuje jih izredna specifičnost do antigenov (v našem primeru proteinom raka) in velike zmožnost vezave antigena, kot tudi »robustnost« - odpornost proti ekstremnim razmeram (pH, visoka temperatura). Zato so tudi zelo primerna za eksperimentalne potrebe, pa seveda tudi za izdelavo novi diagnostičnih orodij in terapevtskih postopkov. Na primeru glioblastoma, usodnega možganskega tumorja, bomo prikazali postopek iskanja specifičnih biooznačevalcev raka kot tudi poskuse terapevtskega ciljanja teh proteinov z nano-protitelesi.

Presnovne bolezni in skeletna mišica

Sergej Pirkmajer, Tomaž Marš, Zoran Grubič:

Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Uvod

Za sodobno družbo je značilen izrazit porast presnovnih bolezni, kot sta debelost in sladkorna bolezen. V Sloveniji ima na primer preveliko telesno maso kar 60 % odraslih, število sladkornih bolnikov pa je ocenjeno na 140.000. K povečevanju pogostosti presnovnih bolezni poleg neustrezne prehrane pomembno prispeva tudi pomanjkanje gibanja in z njim povezane motnje v delovanju skeletne mišice.

Skeletna mišica kot presnovni in endokrini organ

Skeletna mišica zavzema 40 % telesne mase in je največji organ v človeškem telesu. Temeljna lastnost skeletne mišice je krčenje, kar omogoča vse vrste gibanja vključno z dihanjem in vzdrževanjem telesne drže. Skeletna mišica pa je tudi zelo pomemben presnovni in endokrini organ, ki vpliva na presnovno homeostazo celotnega telesa. Ker je skeletna mišica zelo prilagodljiva, se hitro odziva na zmanjšanje ali povečanje telesne aktivnosti. Pomanjkanje gibanja se tako pokaže z upadom mišične mase in okrnjeno presnovno funkcijo, kar prispeva k nastanku različnih presnovnih motenj. Nasprotno pa redno gibanje vodi v strukturne in funkcijske prilagoditve, ki izboljšujejo delovanje skeletne mišice. Takšne prilagoditve ugodno vplivajo tudi na presnovne procese v drugih organih. Dodatno k temu prispeva tudi endokrino delovanje skeletne mišice. Med gibanjem se namreč iz mišice v kri sproščajo obveščevalne molekule, ki delujejo kot hormoni in usmerjajo presnovne procese v različnih organih. Čeprav so mnogi molekularni vidiki še neraziskani, lahko povzamemo, da z gibanjem spodbujene spremembe v skeletni mišici pomembne za ohranjanje presnovnega zdravja.

Pomen skeletne mišice v sodobni biomedicini

Da je za ohranjanje zdravja potrebno gibanje, je že pred 2400 leti opozarjal znameniti starogrški zdravnik Hipokrat. Kljub velikemu znanstvenemu napredku pa še vedno ni povsem jasno, zakaj in kako gibanje vpliva na zdravje. Iskanje odgovora na to vprašanje ni zgolj akademskega pomena. Razkrivanje molekularnih mehanizmov, prek katerih gibanje krepi zdravje, bi namreč lahko omogočilo razvoj novih oblik zdravljenja presnovnih bolezni. Raziskovanje delovanja skeletne mišice je zato eno od prioritarnih področij sodobne biomedicine. Na predavanju bomo predstavili raziskave na skeletni mišici, s katerimi se že vrsto let ukvarjamo na Patofiziološkem inštitutu Medicinske fakultete.

Presnova in ravnovesje holesterola pri miših s pogojno izbitim genom *Cyp51* v jetrih

Gregor Lorbek¹, Žiga Urlep¹, Martina Perše², Jera Jeruc³, Peter Juvan¹, Rok Keber⁴, Simon Horvat^{4,5} in Damjana Rozman¹

¹ Center za funkcijsko genomiko in biočipe, Inštitut za biokemijo

² Medicinski eksperimentalni center, Inštitut za patologijo

³ Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

⁴ Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

⁵ Kemijski inštitut, Ljubljana

Holesterol je nujno potreben za normalno delovanje vseh sesalskih celic. Poleg tega, da predstavlja enega ključnih gradnikov celičnih membran, je udeležen tudi v drugih, za organizem zelo pomembnih procesih kot npr. pri sintezi žolčnih kislin in steroidnih hormonov. Koncentracije holesterola morajo biti v telesu natančno uravnane, saj na eni strani zvišane koncentracije lahko vodijo v srčno žilna obolenja, na drugi strani pa pomanjkanje holesterola kot posledica mutacij v genih za njegovo sintezo povzroči različne zelo hude sindrome pri ljudeh. V sklopu naših raziskav smo želeli pojasniti vlogo jeter, glavnega organa ravnovesja in presnove holesterola, pri teh obolenjih, pa tudi širše. V ta namen smo s pomočjo genskih tehnologij v mišji genom vnesli dve posebni t. i. *loxP* nukleotidni zaporedji, s katerima smo iz vsake strani označili enega izmed genov iz sinteze holesterola, *Cyp51*. Podobno smo mišim vstavili tudi bakterijski gen za encim Cre rekombinazo, ki ta *loxP* zaporedja prepozna (samo v jetrih) in izreže celotno nukleotidno zaporedje vmes (torej gen *Cyp51*). Tako smo pridobili živalski model, pri katerem smo lahko raziskovali posledice prekinjene sinteze holesterola v jetrih v živem organizmu. Ugotovili smo, da takšne miši počasneje rastejo in imajo povečana jetra v primerjavi s kontrolnimi mišmi, ki imajo funkcionalen gen *Cyp51* v jetrih. Mikroskopski pregled jetrnih rezin je nadalje pokazal, da pri miših z izbitim *Cyp51* pride do poskusa obnovitve jeter s t. i. »jetrnimi ovalni celicami« in posledično fibroze. S tehnologijo DNA mikromrež smo ugotovili tudi, da se na ravni izražanja vseh genov v jetrih samice na izbitje odzivajo bistveno drugače od samcev. Z gensko tehnologijo tkivno-specifičnega izbitja gena *Cyp51* smo tako dobili vpogled v funkcionalno vlogo holesterola in njegovo sinteze v jetrih in živalski model za raziskovanje molekularnih vzrokov različnih jetrnih obolenj pri človeku.

Primerjava komponent strupov modrasa in navadnega gada za izbiro ustrezne imunoterapije

Mojca Grižnik, Julija Herman in Nika Kaplja
Gimnazija Tolmin

Mentorja: Magdalena Kunc (Gimnazija Tolmin) in Igor Križaj (Institut Jožef Stefan, Ljubljana)
Zlato priznanje na državnem tekmovanju mladih znanstvenikov 2014, kategorija Kemija ali kemijska tehnologija - srednje šole

V okviru raziskovalne naloge smo primerjale komponente strupov modrasa in navadnega gada za izbiro ustrezne imunoterapije. Za imunološko navzkrižnost smo testirale antiserum, ki se uporablja za obe zastrupitvi, je pa originalno usmerjen proti surovemu modrasovemu strupu. Z enodimenzionalno elektroforezo smo primerjali fibrinogenolizno aktivnost strupov, z dvodimenzionalno elektroforezo pa smo detektirali njune glavne toksične in netoksične komponente. S pomočjo direktne in indirektno stimulacije na mišji hemidiafragmi smo ugotavljali nevro in miotoksične učinke strupov, izvedli pa smo tudi masno spektrofotometrijo in s pomočjo dobljenih absorbanca izračunali koncentracije proteinov v obeh strupih. Rezultati so pokazali, da je vsebnost proteinov v obeh strupih okoli 80%, glavne toksične komponente pa so v obeh primerih predvsem metaloproteaze, ki imajo hemoragično delovanje. Pri strupu modrasa smo uspeli potrditi tudi nevrotoksično učinkovanje, strup navadnega gada pa nas je presenetil z na novo odkrito močno miotoksično aktivnostjo, ki jo sedaj nadaljnje preučuje IJS. Protistrup je pri strupu navadnega gada učinkovit za zdravljenje hemoragičnih simptomov zastrupitve, se pa poraja vprašanje ustreznosti pri zdravljenju preostalih simptomov, ki jih povzročajo komponente, drugačne od tistih v modrasovemu strupu.

Fosfolipaze, lipidne kapljice in preživetje celic raka dojke

Petra Malavašič, Anja Pucer, Vesna Brglez, Igor Križaj, Jože Pungerčar in Toni Petan
Odsek za molekularne in biomedicinske znanosti, Institut Jožef Stefan, Ljubljana.

Rakave celice v primerjavi z zdravimi hitreje prevzemajo hranilne snovi iz krvnega obtoka in jih bolj učinkovito presnavljajo. To jim omogoča hitrejšo rast in delitev, obenem pa postanejo odpornejše na pomanjkanje hrane in različne stresne situacije, kar bistveno olajša njihovo razširjanje po telesu. Razumevanje mehanizmov, ki omogočajo rakavim celicam tako učinkovito presnovo bi pospešilo razvoj novih zdravil, ki bi lahko zavrele njihovo rast. Sekretorne fosfolipaze A2 (sPLA2) so encimi, ki se izločajo iz različnih celic in preko razgradnje celičnih membran sodelujejo pri številnih procesih v telesu, njihova vloga pri raku pa še ni pojasnjena. Ugotovili smo, da se encimi sPLA2 vežejo na celice raka dojke in razgrajujejo njihove membrane, pri čemer se sproščajo maščobne kisline, ki jih rakave celice prevzamejo in skladiščijo v svoji notranjosti v obliki maščobnih t.i. lipidnih kapljic. Uskladiščene maščobne kisline se po potrebi sproščajo iz kapljic in se nato razgrajujejo v mitohondrijih, pri čemer nastaja energija, nujna za preživetje celic tudi tekom zelo dolgega stradanja. Pri tem smo ugotovili, da farmakološka učinkovina etomoksir, ki zavira razgradnjo maščobnih kislin v celicah in je potencialno zdravilo za diabetes in srčne bolezni, popolnoma prepreči tudi vse učinke sPLA2 na celice raka dojke. Pokazali smo tudi, da sPLA2 pri delovanju na celice v pogojih pomanjkanja hranil aktivira z AMP aktivirano protein kinazo (AMPK), enega od ključnih senzorjev energijskega stresa v celici, ki pospeši presnovne poti, ključne za preživetje celic.

Naši rezultati torej kažejo, da delovanje sPLA2 na membrane celic raka dojke omogoča nastanek hitro dostopnih energetskih zalog v obliki lipidnih kapljic, ki jih celice po potrebi uporabijo bodisi za rast, ko imajo dovolj hranil, ali za preživetje, tekom večdnevnega pomanjkanja hranil. Pomembna je ugotovitev, da zaviralci razgradnje maščobnih kislin preprečijo izkoriščanje lipidnih kapljic za rast in preživetje rakavih celic, kar kaže na možnost uporabe teh spojin pri zdravljenju raka.

Virus induced gene silencing (VIGS) – ali kako potrdimo sodelovanje genov pri odgovoru rastline na biotski stres.

Alexandra Bogožalec, David Dobnik, Živa Ramšak, Kristina Gruden;
Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

Po ocenah iz leta 2010 poznamo med 300.000 in 315.000 rastlinskih vrst. Med njimi so za nas izrednega pomena predvsem poljščine, ki kljub različnim kulinaričnim posebnostim, širom sveta ostajajo konstantne. Tako je na četrtem mestu takoj za koruzo, pšenico in rižem kot ena najpomembnejših poljščin uvrščen krompir. Iz tega vidika je ključno, da poznamo čim več genov vključenih v obrambo krompirja tako proti biotskim kot proti abiotiskim dejavnikom.

S pomočjo tehnik, ki nam jih omogoča molekularna biologija do danes še vedno nimamo popolnega genoma krompirja, saj poznamo več kot 4000 različnih kultivarjev, z različnimi stopnjami izražanja genov ali pa celo z različnimi geni. To nam po eni strani otežuje delo, po drugi strani pa nam daje odlično priložnost, da s križanjem različnih kultivarjev pridobimo nove, proti škodljivcem in vremenskim razmeram bolj odporne rastline, seveda samo v kolikor poznamo gene, ki sodelujejo v odgovoru rastline na stres. V našem laboratoriju tako poskušamo sestaviti kompleksno sliko povezovanja različnih celičnih komponent po napadu škodljivca in tako dobiti poglobljen pregled imunskega odziva rastline. Eni izmed ključnih akterjev v tem procesu so tudi transkripcijski faktorji družine NAC, ki so vključeni v signalizacijo jasmonske kisline in etilena ter salicilne kisline. Namen našega dela je utišati izražanje reprezentativnih genov družine NAC z metodo VIGS (*Virus induced gene silencing*, slo. utišanje genov s pomočjo virusnih delcev) in s tem potrditi njihov vpliv na boj proti patogenom. V metodo VIGS so vključene, molekularno biološke, bioinformatične, celično biološke in mikrobiološke tehnike vse od PCR, inokulacije rastlin z virusnim pripravkom do fluorescenčne mikroskopije.

Na podlagi podatkov iz literature smo se osredotočili na 44 genov družine NAC v krompirju, za katere se je v predhodnih raziskavah izkazalo, da so vključeni v odgovor na biotski stres. S pomočjo bioinformatičnih analiz ter s pomočjo podatkov mikromrež pripravljenih na našem inštitutu pa smo izbor zožili na 2 gena; StNAC024 in StNAC072. Naš projekt je trenutno še v fazi raziskav, ne glede na to ali bodo rezultati raziskave pozitivni ali negativni pa bomo z njimi pridobili dodaten vpogled v funkcijo transkripcijskih faktorjev NAC in s tem v imunski odgovor rastline.

Sistematska povezava med biokemijo, genetiko in molekularno biologijo kot del znanosti o življenju

Špela Stangler Herodež

Laboratorij za medicinsko genetiko, Univerzitetni klinični center Maribor

Življenje je pojav, ki se izraža s sposobnostjo presnavljanja, rasti in razmnoževanja. Vsak si zasluži živeti zdravo življenje. V današnjem času je to, zaradi stresa in prekomerne obremenjenosti z delom, zelo težka naloga. Neravnovesje in pomanjkanje harmonije med telesom in umom pa pogosto vodi v bolezen.

Raziskave s področja znanosti o življenju imajo predvsem pomen za razumevanje procesov v organizmih, za razumevanje bolezni, za diagnostiko, terapijo, identifikacijo,... Osnova vseh je biokemija, veda o sestavi in procesih v živih bitjih. K hitremu razvoju biokemije so v 20. stoletju pripomogle specifične biokemijske tehnike, ki so omogočile odkritje in podrobno analizo številnih molekul in metaboličnih poti v celici. Odkritja biokemije se dandanes uporabljajo na številnih področjih od genetike do molekularne biologije in od poljedelstva do medicine.

Kot raziskovalka na področju molekularne genetike se pri vsakodnevnem delu pogosto srečujem s vprašanjem: „Kakšen pomen ima določen gen za normalno delovanje organizma in kaj se zgodi, če gre kaj narobe?“ Odgovor najpogosteje najdem s pomočjo sistematske povezave med biokemijo, genetiko in molekularno biologijo. Biokemija proučuje kemijske substance življenjskih procesov živih organizmov. Genetika pa je področje, ki proučuje dedovanje, lastnosti genov in DNA. Medtem ko je molekularna biologija področje proučevanja biomolekul. Kljub temu da so vsa tri področja zelo natančno določena in sistematizirana, nikoli ni bila postavljena popolnoma jasna meja med temi področji, vsebino in tehnikami. Opažam, da se predvsem tehnike, značilne za raziskave na področju biokemije, povezujejo s tehnikami in idejami iz genetike in molekularne biologije.

Dober raziskovalec mora pri svojem delu velikokrat zapustiti meje poznanega in si nenehno pridobivati izkušnje in znanja. Pri tem si je najlažje pomagati s pomočjo sistematske povezave med različnimi znanstvenimi vedami. Na področju znanosti o življenju je še kako dobrodošla sistematska povezava med biokemijo, genetiko in molekularno biologijo.

Analiza izražanja eritropoetskega receptorja

Tine Prolič Kalinšek, Gašper Razinger, Nataša Debeljak
Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

Eritropoetski receptor (EpoR) je eden izmed prognostičnih faktorjev pri raku. Aktivacija receptorja sproži signalne poti, ki so udeležene v procesih rasti, proliferacije in zaščite celic pred apoptozo. V klinični onkologiji se rekombinantni humani eritropoetin (rHuEPO) uporablja za zdravljenje anemij, ki se razvijejo kot posledica kemo- in radioterapije ter infiltracije tumorskih celic v kostni mozeg. Od leta 2008 je uporaba rHuEPO v onkologiji omejena, saj so raziskave ugotovile, da je visoka raven izražanja EpoR povezana s slabšim odzivom na kemo- in hormonsko terapijo.

Z namenom razjasnitve mehanizmov delovanja EpoR pri raku, je Nina Trošt v okviru doktorske naloge z metodo stabilnega kloniranja pripravila dve modelni celični liniji raka dojke T47D in MCF7 s povečanim izražanjem EpoR (T47D^{EpoR+} in MCF7^{EpoR+}). Namen najinega dela je bil raziskovati uspešnost vnosa gena (kloniranja) in analizirati nivo izražanja EpoR v več klonih omenjenih modelnih celičnih linij T47D^{EpoR+} in MCF7^{EpoR+}. Normalne in spremenjene celične linije (T47D, T47D^{EpoR+}, MCF7 in MCF7^{EpoR+}) sva gojila po protokolih, ki sva jih dobila na internetni strani www.atcc.org. Da sva lahko delala v celičnem laboratorij z gensko spremenjenimi organizmi (GSO), sva se morala udeležiti izobraževanja o ravnanju z GSO. Celični laboratorij deluje na principu sterilnosti, tako da sva se naučila tudi dela v sterilnih pogojih. Tekom najinega dela sva spoznala tudi nepredvidljivost gojenja celic, saj nekateri kloni celične linije T47D po odmrznitvi zaradi neznanega razloga niso hoteli rasti. Te klone nisva vključila v najino nalogo. Normalne celične linije in klone sva razrasla do ustrezne konfluentnosti (95%) in lizirala z namenom izolacije proteinov. Koncentracijo proteinov v lizatih sva določila s pomočjo obarvanja vseh proteinov in meritve absorbance. Z metodo analize proteinov po westernu in uporabe specifičnih protiteles proti EpoR sva preverila prisotnost, količino in velikost proteina EpoR. Povečano izražanje EpoR sva potrdila s primerjavo količine proteina med normalno in spremenjeno celično linijo (primerjava T47D in T47D^{EpoR+} ter MCF7 in MCF7^{EpoR+}).

Omrežje uravnavanja transkripcije signalizacijskih komponent v interakciji med krompirjem in krompirjevim virusom Y

Tjaša Lukan, Anna Coll, Ana Lazar, Špela Baebler in Kristina Gruden
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

tjasa.lukan@nib.si

Krompirjev virus YNTN (PVYNTN), ki ga uvrščamo med krompirjeve viruse Y (PVY), povzroča nekroze na površini krompirjevih gomoljev. Bolezen imenujemo obročkasta nekroza gomoljev krompirja, zaradi katere so gomolji neuporabni za prodajo in tako zmanjšuje kakovost in količino pridelka. Letni pridelok krompirja znaša 365 milijonov ton, kar ga uvršča med prve štiri najpomembnejše poljščine v prehrani ljudi, takoj za koruzo, rižem in pšenico. Zaradi pomanjkanja obdelovalnih površin in rasti svetovnega prebivalstva bo potrebno povečati donose na obstoječih kmetijskih površinah.

Rastlinski hormoni so ključne signalne molekule, ki uravnavajo rast, razvoj, razmnoževanje in obrambo rastlin. Trije najpomembnejši hormoni, ki sodelujejo v rastlinskem imunskem odgovoru in predstavljajo ogrodje obrambnega signalizacijskega omrežja, so salicilna kislina (SA), jasmonska kislina (JA) in etilen (ET). Vloga SA, JA in ET kot ključnih primarnih signalov pri lokalnem in sistemskem odzivu je dobro poznana, medtem ko je mehanizem delovanja teh molekul slabše poznan. Namen dela je nadgraditi razumevanje vloge SA, JA in ET v rastlinskem imunskem odgovoru s poudarkom na analizi promotorjev izbranih genov, ki sodelujejo v obrambni signalizaciji.

Z namenom razumeti transkripcijsko omrežje signalizacijskih komponent v krompirju po okužbi s PVY smo analizirali promotorje nekaterih genov. Izbrani geni so ACC oksidaza (ACO), ki uravnava sintezo etilena, in transkripcijski faktor ERF iz etilenske signalne poti, zadnji produkt signalizacijske poti jasmonske kisline PCPI in transkripcijski faktor MYC2, ki uravnava izražanje PCPI, iz signalizacijske poti salicilne kisline pa sta bila izbrana protein PR1 in transkripcijski faktor TGA.

Promotorska zaporedja, ki smo jih pomnožili iz različnih sort krompirja, smo po sekvenciranju primerjali z znanimi zaporedji modelnega organizma in analizirali z orodjema TRANSFAC in PlantCARE. Rezultati so pokazali razlike v zaporedjih promotorjev različnih sort krompirja, poleg tega pa tudi razlike v zaporedjih promotorjev znotraj enega kultivarja za posamezen gen. Z uporabo TRANSFAC in PlantCARE smo določili mesta vezave transkripcijskih faktorjev in ugotovili razlike v sposobnosti promotorjev za vezavo transkripcijskih faktorjev znotraj enega kultivarja in med različnimi kultivarji.

Autophagins in the parasite *Trypanosoma cruzi*

Jelena Rajković¹, Gregor Kosec¹, Marcin Poreba², Marcin Drag², Dejan Caglič¹, Vito Turk¹ and Boris Turk¹

¹ Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, Jožef Stefan Institute, 1000 Ljubljana, Slovenia

² Wrocław University of Technology, Division of Medical and Microbiology, Faculty of Chemistry, Wybrzeże Wyspińskiego, Wrocław, Poland

Autophagy is an evolutionary conserved pathway present in all eukaryotes and is defined as lysosome- and/or vacuole-dependent mechanism of degradation of intracellular constituents. It is a highly regulated process, which involves autophagy-related (Atg) proteins.

Recent studies have shown a variety of physiological roles of autophagy in intracellular clearance, development, antigen representation, and elimination of invading pathogens. Dysfunction of autophagic pathway is tightly associated with a number of human diseases, including cancer, myopathies and neurodegeneration. During autophagy cysteine proteinase Atg4 cleaves off the C-terminus of the Atg8 protein, exposing a glycine residue, which is subsequently lipidated and inserted into the phagophore membrane. Lipidated Atg8 protein, together with other Atg proteins, enables sequestration of the cargo into an organelle called autophagosome. Finally, autophagosome fuses with a lysosome into an autolysosome, where cargo is degraded and recycled back to the cytosol.

Autophagy plays a crucial role in survival of unicellular eukaryotes. It has mainly been studied in *S. cerevisiae* but it was also observed in many other species, e.g. trichomonads, kinetoplastid parasites and amoebes, where autophagy is correlated with organism differentiation, which enables the successful colonization of the host. The parasite *Trypanosoma cruzi* causes Chagas disease, a chronic debilitating condition prevalent predominantly in Latin America. It contains a fully functional autophagic system, which is essential for differentiation of the parasite. The importance of the differentiation for efficient infection of the host was also confirmed. Therefore, inhibition of autophagy in *T. cruzi* represents an opportunity to prevent human infection and/or pathogenesis of Chagas disease.

Opredelitev zgradbe in delovanja mutanta listeriolizina O

Saša Rezelj

Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo, Kemijski inštitut, Ljubljana

Mentor: Gregor Anderluh

Listeriolizin O (LLO) je najbolj pomemben virulenčni dejavnik bakterije *Listeria monocytogenes*. Uvrščamo ga v družino proteinov od holesterola odvisnih citolizinov (*ang. cholesterol dependent cytolysins*), ki v membranah tarčnih celic tvorijo transmembranske pore. Bakteriji omogoča pobeg iz fagolizosoma in razširjanje preko drugih celic.

V Laboratoriju za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo smo pripravili čisto obliko mutanta listeriolizina O in divjega tipa. Z naprednimi molekularno biološkimi, biokemijskimi in biofizikalnimi metodami smo preučevali in primerjali delovanje, tvorbo por in pH odvisno delovanje mutanta listeriolizina O in divjega tipa. Z merjenjem cirkularnega dikroizma, triptofanskega spektra, diferenčne dinamične fluorimetrije, dinamičnega sipanja svetlobe, hemolitične aktivnosti, preučevanjem agregacije proteinov, analizo gelske kromatografije, testom vezave proteinov na eritrocite in multilamelarne vezikle, analizo vezave in aktivacije proteinov na membrani s površinsko plazmonsko resonanco, spremljanjem permeabilizacije veziklov celične velikosti pod konfokalnim mikroskopom in kristalizacijo, smo prišli do zanimivih odkritij. Rezultati naštetih metod, ki jih bomo predstavili, namreč kažejo na zelo specifično delovanje mutanta listeriolizina O v primerjavi z divjim tipom. Delovanje mutanta namreč lahko z nadzorovanjem pogojev uravnavamo.

Vsa nova odkritja delovanja tega mutanta so več kot le karakterizacija proteina, saj bi ga bilo, zaradi njegovih posebnih lastnosti in možnosti nadziranja, možno aplicirati na področju medicine, farmacije in v številnih industrijskih procesih.

Vloga glikobiologije in lektinov v celični biologiji ter sladko spoznavanje z gobami

Simon Žurga¹, Janko Kos¹ in Jerica Sabotič²

¹ Odsek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan, Ljubljana

² Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana

Dolga leta je bila osrednja paradigma celične biologije, da je za obstoj in razmnoževanje celic potreben linearen tok informacije od DNA preko RNA do proteinov, ki naj bi bili odgovorni za večino bioloških funkcij. Danes vemo, da so za popolno delovanje celice oziroma organizma pomembni tudi lipidi in sladkorji (ogljikovi hidrati), čeprav ti niso neposredni produkti dednega zapisa. Glikobiologija se ukvarja s slednjimi, torej z ogljikovimi hidrati, natančneje z njihovo biosintezo, strukturo in vlogo, poleg tega pa tudi s proteini lektini, ki specifično in reverzibilno vežejo ogljikove hidrate. Za razliko od ostalih makromolekul, kot so DNA, RNA ali proteini, ki so v osnovi enoverižne nerazvejane strukture, tvorijo ogljikovi hidrati kompleksne razvejane strukture. Vse to jim omogoča osnovna struktura monosaharida s številnimi hidroksilnimi funkcionalnimi skupinami. Glikom ali sklop vseh samostojnih in konjugiranih (z lipidi in proteini) ogljikohidratnih struktur je tako neprimerno večji od proteoma. Pri proteinih je pripetje ogljikovega hidrata najpogostejša modifikacija, ki vpliva na njihovo stabilnost, metabolizem, strukturo in aktivnost. Konjugati se pretežno nahajajo na celični površini, kjer tvorijo gost sloj na površini celice imenovan sladkorni plašč, ali v zunajceličnem matriksu, kjer so udeleženi pri interakcijah celice z ostalimi celicami, tkivi, molekulami ter tujimi organizmi.

Proteini, ki so sposobni ob vezavi prevesti strukturo kompleksnih ogljikovih hidratov v biološki odgovor, so lektini. Vezava lektina na ogljikove hidrate je reverzibilna, kar pomeni, da jih lektini pri tem ne modificirajo. Lektine najdemo v najrazličnejših strukturnih oblikah v živem svetu, kjer sodelujejo pri raznovrstnih celičnih procesih. Človeški lektini imajo pomembno vlogo pri rakavih obolenjih, kjer so ogljikohidratne strukture značilno spremenjene, zato je spremenjen tudi biološki odziv povzročen z vezavo lektinov na te strukture. Nadalje so ogljikovi hidrati in lektini odgovorni za vstop virusov, bakterij ali parazitov v človeško telo in s tem povezanimi težavami, ki jih ti organizmi lahko povzročijo – gripa, HIV, sepsa, gangrena, glistavost in podobno. Pri našem delu spoznavamo in proučujemo lektine iz gob, ki so drugačni od lektinov iz drugih organizmov.

Gobji lektini so zelo obstojni in raznoliki proteini ter imajo lahko toksične ali netoksične učinke na različne organizme, kar lahko s pridom izkoriščamo pri uporabi teh lektinov v zdravstvene in diagnostične namene, za ciljno dostavo zdravil ter za raziskovanje osnovnih molekularnih mehanizmov povezanih z informacijo skrito v strukturi ogljikovih hidratov.

Cisteinski katepsini: od biologije do medicine

Boris Turk

Oddelek za biokemijo ter molekularno in strukturno biologijo, Institut Jožef Stefan, Ljubljana
CoE CIPKEBIP, Ljubljana

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

Prejemnik Lapanjetove nagrade za leto 2014

Proteaze so dolgo časa veljale kot encimi ki pretežno nespecifično razgrajujejo proteine. Vendar se je ta pogled v zadnjem času bistveno spremenil in tako proteaze danes veljajo za izredno pomembne signalne molekule, ki so vključene v številne življenjsko pomembne procese, kot homeostaza, imunski odziv, DNA replikacija, celični cikel, razmnoževanje, diferenciacija in migracija celic, morfogeneza in preoblikovanje tkiv, celjenje ran, angiogeneza in apoptoza. Pomembno mesto med njimi imajo tudi cisteinski katepsini, skupina proteaz, ki se običajno nahaja v kislilnih veziklih (endosomi, lizosomi) v notranjosti celice, kjer ima ključno vlogo pri intracelularni razgradnji proteinov, avtofagiji in procesiranju antigenov pri pridobljenem imunskem odzivu. Pri številnih boleznih, predvsem tistih povezanih z vnetji, pa se izražanje katepsinov močno poveča, pri čemer pride do njihovega intenzivnega izločanja v izvencelični prostor. Ti katepsini potem delujejo destruktivno na okolico, pri čemer je najbolj znana njihova vloga pri razgradnji proteinov izvenceličnega matriksa. Prav ključna vloga katepsina K pri razgradnji kolagena je pripeljala do razvoja zdravil za osteoporozo, ki so v zaključnih fazah kliničnih testiranj. Kljub številnim raziskavam in ugotovljenim vzročnim povezavam z boleznimi kot so rak, ateroskleroza in artritis, pa so signalne poti, ki jih sprožijo katepsini v glavnem še zelo slabo poznane. V okviru predavanja bodo predstavljeni rezultati zadnjih raziskav iskanja fizioloških substratov katepsinov ter potencial katepsinov pri neinvazivnem diagnostičnem snemanju pri boleznih ter ciljnemu dostavi zdravil.

Trenutek, ko bakterije zaznajo poškodbo DNA

Matej Butala

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Prejemnik Lapanjetovega priznanja za leto 2014

Ključno za preživetje bakterij, ki se soočijo s stresnimi razmerami okolja je, da ohranijo funkcionalno in strukturno integriteto genomske DNA. Na poškodbe DNA se bakterije odzovejo s prepisom genov, katerih produkti omogočijo popravilo. Ta odziv (t.i. odziv SOS) nadzirata protein LexA, represor prepisa genov SOS, in protein RecA, induktor odziva. Protein RecA zazna in se veže na poškodovane odseke DNA ter tako aktiviran interagira z LexA, sproži njegovo samo inaktivacijo. Slednje vodi v popravilo poškodovane DNA, a tudi nastanek odpornosti proti antibiotikom, horizontalen prenos genov ter pri mnogih patogenih tudi sintezo močnih toksinov (npr. kolera, šiga). Z inhibicijo interakcije RecA-LexA bi zmanjšali hitrost prilagoditve bakterij na nekatere klinično uporabljene antibiotike in oslabili virulenco patogenov. Z EPR in točkovno mutagenezo smo dokazali konformacijske spremembe v LexA in opisali obliko represorja vezanega na DNA. S SPR smo pokazali, da represor vezan na DNA ne interagira z RecA. Z uporabo mutageneze in prečnega povezovanja proteinov LexA in RecA sklopljenega z MS smo izdelali natančen in validiran model kompleksa LexA-RecA, ki lahko služi za izdelavo inhibitorjev odziva. Poleg lastnosti ključnih interakcij med molekulami sistema SOS, LexA-DNA in LexA-RecA, smo opisali tudi molekularni mehanizem odziva SOS s katerim bakterije uravnavajo sintezo bakteriocinov, kolicinov. Sinteza slednjih je skrbno uravnavana saj vodi v propad producentske celice.

Urnvananje aktivnosti katepsina K izven aktivnega mesta

Marko Novinec

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, Večna pot 113, 1000 Ljubljana

e-pošta: marko.novinec@fkkt.uni-lj.si

Prejemnik Lapanjetovega priznanja za leto 2014

Urnvananje encimske aktivnosti preko alosteričnih mehanizmov, t.j. vezave regulatornih molekul na mesta, ki so oddaljena od aktivnega mesta, je pomemben mehanizem v naravi, uveljavlja pa se tudi kot obetaven pristop k zdravljenju različnih bolezni. Pri proteolitičnih encimih iz družine papainu podobnih cisteinskih proteaz je taka oblika regulacije dolgo ostala neraziskana. Cisteinski katepsini, kot to družino imenujemo pri živalih, so najbolj znani kot lizosomske proteaze in so optimalno aktivni v kislem okolju, najdemo pa jih lahko tudi v drugih celičnih razdelkih, npr. v jedru, ter izven celic. Najbolje raziskan način urnvananja aktivnosti teh encimov je vezava inhibitorjev neposredno v aktivno mesto. Mi smo v svojih raziskavah okarakterizirali prve alosterične regulatorje teh encimov, naša dosedanji rezultati pa kažejo, da so v tej družini razviti kompleksni alosterični mehanizmi, ki omogočajo natančno urnvananje njihovega delovanja.

Kot modelni encim smo izbrali katepsin K, ki je zaradi svoje sposobnosti razgrajevanja kolagenov ključna proteaza v presnovi kosti in v zadnjih letih velja za eno izmed obetavnejših tarč za zdravljenje osteoporoze. Kot prvi primer naravnih alosteričnih regulatorjev smo s kombinacijo lastnih eksperimentalnih podatkov in prej znanih dejstev okarakterizirali nekatere glikozaminoglikane, negativno nabite polimere, ki so pogosta komponenta zunajceličnega prostora in delujejo tako, da povišajo aktivnost katepsina K. Ugotovili smo tudi, da lahko znan zunajcelični šaperon klasterin veže katepsin K tako, da ostane aktivno mesto encima prosto in s tem poveča njegovo sicer nizko stabilnost pri nevtralnem pH zunajceličnega okolja brez neposrednega vpliva na encimsko aktivnost.

V poglavitnem delu naših raziskav smo identificirali prve majhne molekule, ki urnvajo aktivnost katepsina K preko vezave izven aktivnega mesta. V ta namen smo uporabili kombinacijo računalniških metod, s katerimi smo najprej napovedali lokacije potencialnih alosteričnih mest na molekuli, nato pa na ta mesta umestili več knjižnic kemijskih spojin. Odkrili smo okoli petnajst spojin, ki vplivajo na aktivnost katepsina K, od katerih smo jih do sedaj okarakterizirali devet. Najobetavnejšo spojino NSC13345 smo okarakterizirali tudi s strukturnega vidika in ugotovili, da se dejansko veže na računalniško napovedano alosterično mesto. Ta spojina ima edinstven profil aktivnosti in kaže dober potencial za razvoj zdravil na njeni osnovi.