

BIOmolekularec.si

Dan biomolekularnih znanosti



Zbornik povzetkov

Ljubljana, 27. september 2018

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

577(082)
60(082)

DAN biomolekularnih znanosti (2018 ; Ljubljana)

Zbornik povzetkov / BIOMolekularec.si [tudi] Dan biomolekularnih znanosti, Ljubljana, 27. september 2018 ; [organizator Slovensko biokemijsko društvo ; uredniki Bojan Doljak ... et al.]. - Ljubljana : Slovensko biokemijsko društvo, 2018

ISBN 978-961-93879-7-9

1. Doljak, Bojan 2. Slovensko biokemijsko društvo
296414976

**DAN BIOMOLEKULARNIH ZNANOSTI
BIOMolekularec 2018**

Organizator:

Slovensko biokemijsko društvo

Kraj prireditve:

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Uredniki:

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

Računalniško oblikovanje:

Bojan Doljak

Založil:

Slovensko biokemijsko društvo

Tisk:

Ulčakar d.o.o.

Naklada:

200 izvodov

Programski in organizacijski odbor:

Bojan Doljak (predsednik)

Aljoša Bavec

Blaž Cigić

Ajda Taler-Verčič

Miha Pavšič

Ljubljana, 2018

Program srečanja

8:15-8:30 Otvoritev: prof. dr. Janko KOS, predsednik Slovenskega biokemijskega društva

Sekcija 1

Vodja sekcije: Aljoša Bavec

- 8:30-8:45 Alojz IHAN, Medicinska fakulteta UL
CEPIVA V RAZVOJU – PRILOŽNOSTI IN IZZIVI
- 8:45-8:55 Kristina LEVPUŠČEK, Medicinska fakulteta UL
GENETSKA VARIABILNOST MEHANIZMOV POPRAVLJANJA DNA IN TVEGANJE ZA NASTANEK MALIGNEGA MEZOTELIOMA
- 8:55-9:05 Vid JAN, Medicinska fakulteta UL
PREUČEVANJE MOLEKULARNIH MEHANIZMOV DELOVANJA ČLOVEŠKE SKELETNE MIŠICE V CELIČNI KULTURI
- 9:05-9:15 Maša SMAJILA, I. gimnazija v Celju
UPORABA IN KARAKTERIZACIJA ERITROPOETINA V IN VITRO/IN VIVO SISTEMIH
- 9:15-9:25 Patrik PEČAVAR NEŽMAH, BIC Ljubljana – Gimnazija in veterinarska šola
PRIPRAVA VODOTOPNE FLUORESCENČNE UČINKOVINE ZA OZNAČEVANJE NORMALNIH IN RAKAVIH CELIC UROTELIJA SEČNEGA MEHURJA IN VITRO
- 9:25-9:35 Pogovor z Janom ZMAZKOM, študentom 1. letnika Medicinske fakultete UL
- 9:35-9:55 *ODMOR*

Sekcija 2

Vodja sekcije: Ajda Taler-Verčič

- 9:55-10:10 Miha BUTINAR, Institut "Jožef Stefan"
NEINVAZIVNO IN VIVO BIOLUMINISCENČNO, FLUORESCENČNO IN X-RAY CT SLIKANJE LABORATORIJSKIH ŽIVALI V RAZISKOVALNE NAMENE
- 10:10-10:20 Lucija LUSKAR, Nacionalni inštitut za biologijo
CRISPR Cas9 PRI KROMPIRJU
- 10:20-10:30 Špela TOMAŽ, Nacionalni inštitut za biologijo
PRIDOBIVANJE PROTEINOV KROMPIRJA IN KROMPIRJEVEGA VIRUSA Y V BAKTERIJI *ESCHERICHIA COLI* TER NJHOVA KRISTALIZACIJA
- 10:30-10:40 Evgenija BURGER, Lucija MARZEL DJURANOVIČ, Luka PETRAVIČ, Gimnazija Novo mesto
OPTIMIZACIJA IN UPORABNOST METODE ZA IDENTIFIKACIJO CIANOBAKTERIJ V OKOLJSKIH VZORCIH NA OSNOVI DNA

- 10:40-10:50 Gregor KRŽMANC, Tadej STRAH, *Gimnazija Vič*
VPLIV MUTACIJ POVEZANIH Z BOLEZNIJO PREZGODNJEGA STARANJA NA STRUKTURO IN STABILNOST PRIZADETE DNA
- 10:50-11:00 Pogovor z Ano PETELIN, docentko s Fakultete za vede o zdravju, Univerze na Primorskem
- 11:00-11:20 *ODMOR*

Sekcija 3

Vodja sekcije: *Miha Pavšič*

- 11:20-11:35 Peter PODBEVŠEK, *Kemijski inštitut*
STRUKTURNE ŠTUDIJE NENAVADNIH STRUKTUR DNA
- 11:35-11:45 Maida JUSOVIĆ, *Institut "Jožef Stefan"*
LIPIDNE KAPLJICE IN AVTOFAGIJA ŠČITIJO RAKAVE CELICE PRED STRESOM
- 11:45-11:55 Aleksandra USENIK, *Institut "Jožef Stefan"*
STRUKTURA PROTEINOV CELIČNE STENE BAKTERIJE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*
- 11:55-12:05 Maša PREDIN, *II. gimnazija Maribor*
VPLIV MIKROVALOV NA ZVIJANJE β -PEPTIDOV
- 12:05-12:15 Lan VUKOLIĆ, *Gimnazija Vič*
POSLEDICE DELOVANJA BRIOPORINA IN HIDRALIZINA 2 NA CELICE
- 12:15-12:25 Pogovor z Aljažem GABROM, doktorskim študentom s Katedre za biokemijo, Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo UL.
- 12:25-13:25 *ODMOR ZA KOSILO - prigrizek organiziran v preddverju predavalnice*

Sekcija 4

Vodja sekcije: *Blaž Cigić*

- 13:25-13:40 Polona JAMNIK, *Biotehniška fakulteta UL*
KVASOVKA KOT MODELNI ORGANIZEM ZA ŠTUDIJ DELOVANJA ANTIOKSIDANTOV V CELICAH
- 13:40-13:50 Florijan CAJZEK, *Biotehniška fakulteta UL*
PRIPRAVA FRAKCIJ JEČMENA S POVEČANO VSEBNOSTJO BIOAKTIVNIH SPOJIN
- 13:50-14:00 Ana KRIŠELJ, *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo UL*
VPLIV RAZLIČNIH ANTIOKSIDANTOV NA Z MENADIONOM SPROŽENE SIGNALNE POTI NA CELIČNI LINIJI imMEF

- 14:00-14:10 Domen LAH, Bor LOGAR DRAŽUMERIČ, *II. gimnazija Maribor*
SINTEZA KANABINOIDOV V POSAMEZNIH FAZAH RASTI INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*CANNABIS SATIVA* L.) IN NJIHOVI PROTIMIKROBNI TER ANTIOKSIDATIVNI UČINKI
- 14:10-14:20 Julija KOLETNIK, *II. gimnazija Maribor*
ARTEMISININ: PROCESI EKSTRAKCIJE, ANTIOKSIDACIJSKA UČINKOVITOST IN VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN
- 14:20-14:30 Pogovor z Nino LAH iz velikega farmacevtskega podjetja
- 14:30-14:50 *ODMOR*

Sekcija 5

Vodja sekcije: Bojan Doljak

- 14:50-15:05 Gregor ANDERLUH, *Kemijski inštitut*
NARAVNI UNIČEVALCI RASTLINSKIH CELIC
- 15:05-15:15 Barbara BREZNIK, *Nacionalni inštitut za biologijo*
3D CELIČNE KULTURE IN ZARODKI RIB CEBRIC KOT MODELI ZA RAZISKAVE MOŽGANSKIH TUMORJEV
- 15:15-15:25 Tina Vida PLAVEC, *Fakulteta za farmacijo UL*
MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE KOT ZDRAVILO
- 15:25-15:35 Ana BABNIK, Greta JUNGER, *Gimnazija Vič*
VPLIV STEROIDOGENEGA DEJAVNIKA 1 NA IZRAŽANJE GONADOTROPINOV V HIPOFIZI MIŠI
- 15:35-15:45 Larsen CUNDRIČ, Matic RAJNAR, Taja SKUBE, *Gimnazija Novo mesto*
MATIČNI MLEČEK IN TRANS-10-HIDROKSI-2-DECENOJSKA KISLINA
- 15:45-15:55 Pogovor z Emanuelo SENJOR, doktorsko študentko z Instituta "Jožef Stefan" in eno izmed zmagovalk Regijskega Biocamp-a 2018
- 15:55-16:30 *ODMOR*
- od 16:30 **SKUPŠČINA SLOVENSKEGA BIOKEMIJSKEGA DRUŠTVA, PODELITEV LAPANJETOVIH NAGRAD IN PREDAVANJA NAGRAJENCEV**
Lapanjetova nagrada: prof. dr. Gregor ANDERLUH
Lapanjetovo priznanje: dr. Jelka POHAR in dr. Matej VIZOVIŠEK
Lapanjetova plaketa: prof. dr. Marko GOLIČNIK in doc. dr. Aleš BERLEC

Kazalo povzetkov

Povzetki predavanj

<i>Alojz Ihan</i> CEPIVA V RAZVOJU – PRILOŽNOSTI IN IZZIVI	13
<i>Kristina Levpušček, Alenka Franko, Vita Dolžan</i> GENETSKA VARIABILNOST MEHANIZMOV POPRAVLJANJA DNA IN TVEGANJE ZA NASTANEK MALIGNEGA MEZOTELIOMA.....	14
<i>Vid Jan, Katarina Miš, Matej Podbregar, Tomaž Marš, Alexander V. Chibalin, Sergej Pirkmajer</i> PREUČEVANJE MOLEKULARNIH MEHANIZMOV DELOVANJA ČLOVEŠKE SKELETNE MIŠICE V CELIČNI KULTURI.....	15
<i>Maša Smajila, Mojca Alif, Iztok Prislan</i> UPORABA IN KARAKTERIZACIJA ERITROPOETINA V <i>IN VITRO</i> / <i>IN VIVO</i> SISTEMIH	16
<i>Patrik Pečavar Nežmah, Mateja Erdani Kreft, Marko Jeran</i> PRIPRAVA VODOTOPNE FLUORESCENČNE UČINKOVINE ZA OZNAČEVANJE NORMALNIH IN RAKAVIH CELIC UROTELIJA SEČNEGA MEHURJA <i>IN VITRO</i>	17
<i>Miha Butinar, Janja Završnik, Lovro Kramer, Georgy Mikhaylov, Olga Vasiljeva, Boris Turk</i> NEINVAZIVNO <i>IN VIVO</i> BIOLUMINISCENČNO, FLUORESCENČNO IN X-RAY CT SLIKANJE LABORATORIJSKIH ŽIVALI V RAZISKOVALNE NAMENE.....	18
<i>Lucija Luskar, Barbara Dušak, Tjaša Lukan, Kristina Gruden</i> CRISPR Cas9 PRI KROMPIRJU.....	19
<i>Špela Tomaž, Ajda Taler-Verčič, Aleksandra Usenik, Anna Coll, Kristina Gruden, Dušan Turk,</i> PRIDOBIVANJE PROTEINOV KROMPIRJA IN KROMPIRJEVEGA VIRUSA Y V BAKTERIJI <i>ESCHERICHIA COLI</i> TER NJIHOVA KRISTALIZACIJA.....	20
<i>Evgenija Burger, Lucija Marzel Djuranovič, Luka Petravič, Tanja Gačnik, Mojca Juteršek, Marko Dolinar</i> OPTIMIZACIJA IN UPORABNOST METODE ZA IDENTIFIKACIJO CIANOBAKTERIJ V OKOLJSKIH VZORCIH NA OSNOVI DNA.....	21
<i>Gregor Kržmanc, Tadej Strah, Alenka Mozer, Uroš Javornik, Janez Plavec</i> VPLIV MUTACIJ POVEZANIH Z BOLEZNIJO PREZGODNJEGA STARANJA NA STRUKTURO IN STABILNOST PRIZADETE DNA.....	22
<i>Peter Podbevšek</i> STRUKTURNE ŠTUDIJE NENAVADNIH STRUKTUR DNA	23
<i>Maida Jusovič, Ema Guštin, Eva Jarc, Toni Petan</i> LIPIDNE KAPLJICE IN AVTOFAGIJA ŠČITIJO RAKAVE CELICE PRED STRESOM	24
<i>Aleksandra Usenik, Nataša Lindič, Dušan Turk</i> STRUKTURA PROTEINOV CELIČNE STENE BAKTERIJE <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i>	25
<i>Maša Predin, Zdenka Keuc, Urban Bren</i> VPLIV MIKROVALOV NA ZVIJANJE β -PEPTIDOV	26

<i>Lan Vukolić, Sonja Artač, Maja Gerden, Marjetka Podobnik, Maja Čemažar</i> POSLEDICE DELOVANJA BRIOPORINA IN HIDRALIZINA 2 NA CELICE.....	27
<i>Polona Jamnik</i> KVASOVKA KOT MODELNI ORGANIZEM ZA ŠTUDIJ DELOVANJA ANTIOKSIDANTOV V CELICAH	28
<i>Florijan Cajzek, Blaž Cigić</i> PRIPRAVA FRAKCIJ JEČMENA S POVEČANO VSEBNOSTJO BIOAKTIVNIH SPOJIN.....	29
<i>Ana Krišelj, Nežka Kavčič, Katarina Pegan in Boris Turk,</i> VPLIV RAZLIČNIH ANTIOKSIDANTOV NA Z MENADIONOM SPROŽENE SIGNALNE POTI NA CELIČNI LINIJI imMEF	30
<i>Domen Lah, Bor Logar Dražumerič, Katja Holnthaner Zorec, Tanja Bagar</i> SINTEZA KANABINOIDOV V POSAMEZNIH FAZAH RASTI INDUSTRIJSKE KONOPLJE (<i>CANNABIS SATIVA</i> L.) IN NJIHOVI PROTIMIKROBNI TER ANTIOKSIDATIVNI UČINKI.....	31
<i>Julija Koletnik, Zdenka Keuc, Darija Cör, Maša Knez Hrnčič</i> ARTEMISININ: PROCESI EKSTRAKCIJE, ANTIOKSIDACIJSKA UČINKOVITOST IN VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN.....	32
<i>Gregor Anderluh</i> NARAVNI UNIČEVALCI RASTLINSKIH CELIC.....	33
<i>Barbara Breznik, Miloš Vittori, Tamara Lah Turnšek</i> 3D CELIČNE KULTURE IN ZARODKI RIB CEBRIC KOT MODELI ZA RAZISKAVE MOŽGANSKIH TUMORJEV	34
<i>Tina Vida Plavec, Aleš Berlec</i> MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE KOT ZDRAVILO	35
<i>Ana Babnik, Greta Junger, Alenka Mozer, Neža Grgurevič</i> VPLIV STEROIDOGENEGA DEJAVNIKA 1 NA IZRAŽANJE GONADOTROPINOV V HIPOFIZI MIŠI.....	36
<i>Larsen Cundrič, Matic Rajnar, Taja Skube, Janja Pust</i> MATIČNI MLEČEK IN TRANS-10-HIDROKSI-2-DECENOJSKA KISLINA.....	37

Ostali povzetki

<i>Klemen Dolinar, Tina Požun, Alexander V. Chibalin, Sergej Pirkmajer</i> POZITIVNA IN NEGATIVNA REGULACIJA AMPK V SKELETNI MIŠICI.....	41
<i>Rok Herman, Vita Dolžan, Mojca Jensterle Sever</i> VPLIV GENETSKE VARIABILNOSTI V SIGNALNIH POTEH OKSIDATIVNEGA STRESA NA METABOLIČNE ZNAČILNOSTI BOLNIC S SINDROMOM POLICISTIČNIH OVARIJEV IN NA NJIHOV ODGOVOR NA ZDRAVLJENJE	42
<i>Karin Hrovatin, Tanja Kunej, Vita Dolžan</i> NEKODIRAJOČE RNA KOT OZNAČEVALCI RAZVOJA IN POTEKA SHIZOFRENIJE	43
<i>Valentina Levak</i> RAZVOJ BIOSENZORJA IMUNSKEGA ODZIVA V KROMPIRJU	44

<i>Nives Škorja, Sergej Pirkmajer</i> VPLIV DIKLOOROACETATA NA AKTIVNOST PIRUVAT-DEHIDROGENAZE-KINAZE V RAKASTIH IN SKELETNOMIŠIČNIH CELICAH	45
<i>Sara Tekavec</i> VLOGA LIPOPROTEINOV IN SIGNALNE POTI ERK PRI ZAŠČITI KARDIOMIOCIT PRED STRESOM ER.....	46
<i>Tadej Ulčnik, Helena Gradišar</i> SESTAVLJANJE ZAPOREDJA ZA PROTEINSKI NANOTRIKOTNIK Z UPORABO METODE GOLDEN GATE ...	47
<i>Anja Vidović, Katarina Miš, Sergej Pirkmajer</i> VPLIV SULFASALAZINA NA URAVNAVANJE PRESNOVE GLUKOZE V SKELETNI MIŠICI.....	48
<i>Maja Zupanc, Urška Matkovič, Tomaž Marš, Sergej Pirkmajer</i> URAVNAVANJE PRESNOVNE IN ENDOKRINE FUNKCIJE SKELETNE MIŠICE	49
<i>Ana Gabrovšek, Nika Tašler, Tjaša Klemen, Marko Jeran</i> DELOVANJE MODELNIH UČINKOVIN DRUŽINE BENZOSULTAMOV NA KVASOVKE <i>SACCHAROMYCES</i> <i>CEREVISIAE</i>	50
<i>Miha Pompe, Alenka Mozer, Rok Pestotnik</i> IZBOLJŠAVA PET SKENERJA Z ZMOŽNOSTJO MERITVE ČASA PRELETA	51
<i>Nina Pust, Nada Udovč-Kneževič, Marjetka Podobnik, Tomaž Švigelj</i> IZRAŽANJE REKOMBINANTNEGA PROTEINA IZ DRUŽINE AKTINOPORINOV	52
<i>Bernard Veršnjak, Samo Košir, Alma Kapun Dolinar, Marko Jeran</i> KARAKTERIZACIJA KOORDINACIJSKIH PRODUKTOV REAKCIJ BAKRA(II) IN NIKLJA(II) Z AMONIJAKOM TER ASPIRINOM KOT LIGANDOMA.....	53

Lapanjetovi nagrajenci za leto 2018

<i>Gregor Anderluh</i> POMEN RAZISKAV PROTEINSKIH NANOPOR	57
<i>Jelka Pohar, Duško Lainšček, Karolina Ivičak-Kocjan, Miša-Mojca Cajnko, Ana Kunšek, Ryutaro Fukui, Chikako Yamamoto, Kensuke Miyake, Roman Jerala, Mojca Benčina</i> TLR9 IN NJEGOVI LIGANDI	58
<i>Matej Vizovišek</i> CISTEINSKI KATEPSINI: OD PROFILIRANJA SPECIFIČNOSTI IN IDENTIFIKACIJE SUBSTRATOV DO RAZVOJA SELEKTIVNIH SUBSTRATNIH SOND IN SISTEMOV ZA DOSTAVO ZDRAVIL	59

POVZETKI PREDAVANJ

Cepiva v razvoju – priložnosti in izziviAlojz Ihan*Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani*

Danes je več kot 300 novih cepiv v različnih fazah kliničnega preizkušanja (faza 1, 2 in 3). Med temi je večina cepiv proti okužbam (137), rakastim boleznim (101), alergijam (15) in nevrološkim boleznim (10), med preostalim cepivi prevladujejo cepiva proti avtoimunskim obolenjem. Med cepivi v razvoju veliko javno pozornost vzbujajo cepiva proti drogam (kokain, nikotin, fentanil, heroin, oksikodon), katerih namen je nevtralizacija učinkovin, ki jih uživajo odvisniki. Ob tehnoloških izzivih tovrstnih cepiv so v ospredju tudi etični. Javno pozornost pa vzbuja tudi razvoj novih cepiv, ki so namenjena nosečnicam za zaščito njihovih otrok pred nalezljivimi boleznimi v prvih mesecih življenja.

Genetska variabilnost mehanizmov popravljanja DNA in tveganje za nastanek malignega mezotelioma

Kristina Levpušček¹, Alenka Franko², Vita Dolžan³

¹ Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

² Klinični inštitut za medicino dela, prometa in športa, Univerzitetni klinični center Ljubljana

³ Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

mentorici: Alenka Franko in Vita Dolžan

Izhodišče: Maligni mezoteliom je agresiven tumor seroznih površin, povezan z izpostavljenostjo azbestu. V Sloveniji je incidenca 25 do 35 bolnikov na leto. Domneva se, da na tveganje za nastanek malignega mezotelioma med drugim vpliva tudi genetska variabilnost proteinov, ki so udeleženi pri popravljanju DNA. Takšna proteina sta ERCC1 in XRCC1. Funkcionalni polimorfizmi genov, ki kodirajo navedena proteina, lahko vplivajo na učinkovitost popravljalnih mehanizmov DNA in s tem na tveganje za nastanek omenjenega tumorja.

Namen: Namen raziskave je bil preučiti vpliv polimorfizmov *ERCC1* rs11615 in rs3212986 ter *XRCC1* rs1799782 in rs25487 na tveganje za nastanek malignega mezotelioma.

Preiskovanci in metode: Izvedli smo raziskavo primerov s kontrolami. Vključenih je bilo 237 bolnikov z malignim mezoteliom, ki so bili obravnavani na Onkološkem inštitutu v Ljubljani med novembrom 2001 in oktobrom 2016 ter 193 kontrol, ki so bili nekdanji delavci tovarne azbest-cementnih izdelkov Salonit Anhovo v Sloveniji in obravnavani pri Interdisciplinarni skupini strokovnjakov za verifikacijo poklicnih bolezni zaradi izpostavljenosti azbestu na Kliničnem inštitutu za medicino dela, prometa in športa v Ljubljani med januarjem 1999 in decembrom 2003 ter niso zboleli za nobeno poklicno boleznijo, povezano z izpostavljenostjo azbestu. Za določanje polimorfizmov *ERCC1* in *XRCC1* smo uporabili metode, ki temeljijo na reakciji PCR v realnem času. Z metodo univariatne logistične regresije smo analizirali povezavo med malignim mezoteliomom in navedenimi polimorfizmi.

Rezultati: Na tveganje za nastanek malignega mezotelioma je statistično značilno vplival le polimorfizem *ERCC1* rs3212986 (RO = 0,61; 95 % IZ = 0,41–0,91; p = 0,014). Nosilci polimorfne alela *ERCC1* T so imeli zmanjšano verjetnost za nastanek malignega mezotelioma. Ostali preučevani polimorfizmi niso imeli statistično značilnega vpliva na tveganje za pojav tumorja.

Zaključek: Ugotovitev naše raziskave je, da so imeli nosilci polimorfizma *ERCC1* rs3212986 zmanjšano tveganje za razvoj malignega mezotelioma. Vzročne povezave med drugimi polimorfizmi in omenjenim tumorjem nismo dokazali.

Preučevanje molekularnih mehanizmov delovanja človeške skeletne mišice v celični kulturi

Vid Jan¹, Katarina Miš¹, Matej Podbregar^{1,2}, Tomaž Marš¹, Alexander V. Chibalin³, Sergej Pirkmajer¹

¹ *Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani*

² *Splošna bolnišnica Celje*

³ *Oddelek za molekularno medicino in kirurgijo, Karolinska institutet, Stockholm, Švedska*

mentor: Sergej Pirkmajer

Za pravilno delovanje skeletnih mišic je nujno potrebno oživčenje. Mišice oživčujejo motorični nevroni (živčne celice), ki prek živčno-mišičnega stika vzdražijo mišična vlakna in sprožijo njihovo krčenje. Motnje v delovanju motoričnih nevronov vodijo v usahllost mišic in mišično šibkost.

Za preučevanje molekularnih mehanizmov v človeški skeletni mišici je iz etičnih razlogov na voljo le malo poskusnih modelov. Eden najbolj pogosto uporabljenih modelov so neoživčene mišične celice, ki jih gojimo v laboratoriju. Pomembna omejitev takšnih celic je, da niso povsem zrele in se kot take ne morejo krčiti. Čeprav je mišične celice v kulturi mogoče vzdražiti z električnim tokom, pa nam tak model ne omogoča proučevanja vpliva oživčenja na molekularne mehanizme razvoja in delovanja mišice. V našem laboratoriju zato uporabljamo kokulturo človeških mišičnih celic in eksplantov podganje embrionalne hrbtenjače. Iz eksplantov poženejo izrastki motoričnih nevronov, ki nato z mišičnimi celicami tvorijo živčno-mišične stike. Po njihovi vzpostavitvi mišične celice dozoriijo in se pričnejo spontano krčiti.

S stališča preučevanja molekularnih mehanizmov je ena izmed prednosti našega modela, ki vključuje človeške mišične celice in podganje živčne celice, da lahko s pomočjo metod, ki ločujejo med biološkimi molekulami človeškega in podganjega izvora, ločeno analiziramo izražanje genov v živčni ali mišični komponenti kokulture. Z omenjenim modelom in specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, ki zaznajo samo človeško mRNA, smo s pomočjo verižne reakcije s polimerazo preučili vpliv oživčenja na izražanje podenot Na,K-črpalke oz. Na,K-ATPaze (NKA) v mišičnih celicah.

NKA igra temeljno vlogo pri ohranjanju porazdelitve ionov Na⁺ in K⁺ med zunajceličnim in znotrajceličnim prostorom, ki omogoča krčljivost mišičnih celic. NKA je α/β dimer, ki ga v mišici sestavljajo različne oblike podenote α (α_{1-3}) in β (β_{1-3}). Ugotovili smo, da oživčenje selektivno vpliva na izražanje teh podenot v mišičnih celicah. Odvisnost izražanja podenot NKA od oživčenja bi lahko igrala pomembno vlogo pri razvoju mišične šibkosti zaradi motenj v delovanju motoričnih nevronov.

Uporaba in karakterizacija eritropoetina v *in vitro*/*in vivo* sistemih

Maša Smajila¹, Mojca Alif¹, Iztok Prislan²

¹ I. gimnazija v Celju

² Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

mentorja: Mojca Alif in Iztok Prislan

Eritropoetin je glikoproteinski hormon, ki deluje kot hematopoetski rastni faktor, in sicer vpliva na proliferacijo in diferenciacijo eritroblastov. Endogeni eritropoetin se tvori predvsem v ledvicah (90%), sledijo jetra. Uporablja se kot zdravilna učinkovina in kot doping sredstvo v športu.

Zaradi njegove vsestranske uporabe smo želeli preučiti vpliv pH in temperature na njegovo stabilnost. Zaradi uporabe eritropoetina kot zdravilne učinkovine smo želeli ugotoviti, ali ga lahko ujamemo v liposome, možne prenašalce učinkovin v telesu. Zanimalo nas je tudi, ali ima kakšen vpliv na živost modelnih organizmov, kot so kvasovke.

Predvidevali smo, da bo eritropoetin najstabilnejši v nevtralnem pH, sledila bosta kisel pH in nato bazičen pH (na osnovi strukture eritropoetina). Pričakovali smo, da se bo del eritropoetina ujel v liposome ter da bo vplival na živost kvasovk.

Za pridobivanje podatkov smo uporabili sledeče raziskovalne metode: spektrofotometrija, CD-spektroskopija (spektropolarimetrija) in diferenčno dinamično kalorimetrijo.

Naši rezultati so pokazali, da je eritropoetin najstabilnejši v nevtralnem pH (pH = 7,06), sledi kisel pH (pH = 4,00), najmanj stabilen pa je pri bazičnem pH (pH = 11,07). Pri segrevanju se njegova nativna konformacija poruši, kot je značilno za proteinske strukture. Denaturacija je do 85° C delno reverzibilna. Največja stopnja reverzibilnosti je bila dosežena pri nevtralnem pH, sledi pH = 4,00, najmanjša stopnja reverzibilnosti pa je bila dosežena pri pH = 11,07 (skladno s stabilnostjo eritropoetina pri različnih pH vrednostih). Izsledki so pokazali, da je zajetje v liposome težka naloga, ki nam ni najbolje uspela. Ugotovili pa smo, da je prišlo do interakcije med liposomi in eritropoetinom v supernantantu. Na živost kvasovk eritropoetin nima znatnega vpliva.

Priprava vodotopne fluorescenčne učinkovine za označevanje normalnih in rakavih celic urotelija sečnega mehurja *in vitro*

Patrik Pečavar Nežmah¹, Mateja Erdani Kreft², Marko Jeran³

¹ Gimnazija in veterinarska šola, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana

² Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

³ Kemijski inštitut

mentorja: Mateja Erdani Kreft in Marko Jeran

Rak sečnega mehurja je deveto najpogostejše rakavo obolenje na svetu, katerega incidenca naj bi se v Sloveniji do leta 2020 povečala za 45 % pri moških in za 105 % pri ženskah. Zato so nujne nove metode zgodnjega odkrivanja raka sečnega mehurja. Primerno orodje predstavljajo fluorescenčna barvila, ki oddajajo hladno svetlobo in jih lahko uporabljamo za označevanje celic v tumorjih. Raziskovalno delo je bilo usmerjeno v raziskavo razlikovanja med zdravimi in rakavimi urotelijskimi celicami sečnega mehurja. Pripravili smo vodotopni fluorescenčni derivat fluoresceina, natrijev disulfonat (SUF), ki je organska spojina in oddaja intenzivno fluorescenco. Testirali smo njegov vpliv na preživetje normalnih in rakavih urotelijskih celic ter s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa poskušali ločiti med normalnimi in rakavimi urotelijskimi celicami sečnega mehurja. Želeli smo preveriti, ali je SUF mogoče uporabljati v diagnostiki rakavih celic in potencialni tarčni terapiji rakavih celic, kot alternativa težje dostopnih in cenovno manj ugodnih fluorescenčnih barvil, ki so trenutno v uporabi, ter s tem povečati dostopnost tovrstnih raziskav. Rezultati raziskave so pokazali, da učinkovina SUF ne kaže toksičnega učinka na urotelijske celice sečnega mehurja ter po načinu obarvanja ločuje med zdravimi in rakavimi celicami. Spojina SUF se je po testiranjih izkazala za učinkovito fluorescenčno sondo, njen skelet med drugim dopušča tudi vezavna mesta s pomočjo sodobnih sinteznih strategij. Na strukturni skelet učinkovine bi lahko vezali še dodatne aktivne funkcionalne skupine ali uvedli protirakave učinkovine.

Neinvazivno *in vivo* bioluminiscenčno, fluorescenčno in X-ray CT slikanje laboratorijskih živali v raziskovalne namene

Miha Butinar

¹ *Institut "Jožef Stefan"*

Neinvazivno *in vivo* slikanje laboratorijskih živali že vrsto let raziskovalcem omogoča raziskovanje različnih bolezni kot so rak, vnetja, neuro-degenerativne in kardiovaskularne bolezni, ki so hkrati tudi najpogostejši razlog za smrtnost pri ljudeh v svetu. Najpogosteje se uporablja 2D/3D bioluminiscenčno in fluorescenčno slikanje miši in podgan. Bioluminiscenčno slikanje se uporablja predvsem v raziskavah raka, kjer rakave celice izražajo luciferazo in s pomočjo substrata D-luciferina le te detektiramo kot signal v obliki fotonov svetlobe. Prednost tehnologije je v tem, da je signal v obliki fotonov svetlobe hkrati tudi proporcionalen s številom celic v organizmu, kar omogoča detekcijo in kvantifikacijo rasti tumorja. Zaradi izjemno močnih signalov je možna detekcija do 10 rakavih celic v organizmu, kar posledično omogoča zgodnje spremljanje razvoja raka in vpliva terapij. Fluorescenčno slikanje pa se lahko uporablja tako v raziskavah raka, vnetij, neuro-degenerativnih bolezni ter dostavnih sistemov za zdravila in diagnostiko, terapij, prob za različne encime in procese v celicah ter biodistribucije nanodelcev. Računalniško vodeni tomograf »CT« pa je način slikanja, ki temelji na rentgenskih žarkih in ni potrebno imeti fluorescenčnih ali bioluminiscenčnih signalov za pridobivanje podrobnih slik organizma. Uporablja se predvsem za podrobno anatomsko analizo kosti, kardiovaskularnega sistema in drugih patoloških sprememb pri miših in podganah. Hkrati tudi omogoča ko-registracijo podatkov z bioluminiscenčnimi in fluorescenčnimi slikami. S pomočjo različnih kontrastnih sredstev lahko naredimo podrobno 3D rekonstrukcijo organizma in posledično dobimo celovit vpogled v razvoj različnih bolezni.

CRISPR Cas9 pri krompirju

Lucija Luskar, Barbara Dušak, Tjaša Lukan, Kristina Gruden

Nacionalni inštitut za biologijo

mentorici: Tjaša Lukan in Kristina Gruden

Tarčno utišanje izražanja ali mutageneza nam omogoča študij funkcije posameznega gena. Krompir (*Solanum tuberosum*) je tetraploid, kar otežuje multialelno mutagenezo. Metoda CRISPR Cas9 je ena od novejših metod za genski inženiring, ki omogoča specifično urejanje genoma, tudi v primeru poliploidnih organizmov.

V raziskavi smo optimizirali metodo za izbijanje genov CRISPR Cas9 pri krompirju. Izbili smo gen *StRbohD1*, za katerega so bile posledice utišanja izražanja že določene pri prejšnjih poskusih na Nacionalnem inštitutu za biologijo. *StRbohD1* nosi zapis za oksidazo NADPH, ki je vključena v odziv krompirja na krompirjev virus Y (PVY, angl. potato virus Y). Utišanje izražanja tega gena z uporabo kratkih lasničnih RNA pri krompirju sorte Rywal povzroči zmanjšano odpornost transgenih rastlin na PVY. Virus se po okužbi teh rastlin lahko razširi v zgornje neokužene liste, pri čemer pride do nastanka nekrotičnih lezij.

Načrtovano vodilno RNA (gRNA, angl. guide RNA), ki je homologna delu zaporedja gena *StRbohD1*, smo vnesli v plazmid pRGEB31, ki med drugim vsebuje tudi zapis za encim Cas9. S konstruktom smo transformirali krompir sorte Rywal. Prvi poganjki so se pojavili po sedmih tednih. Iz poganjkov smo vzgojili 70 linij. 36 naključno izbranih linij smo okužili z virusom PVY N605-GFP in spremljali pojav simptomov. Pet linij je razvilo lezije v zgornjih neinokuliranih listih. Prisotnost virusne RNA smo potrdili tudi s qPCR. Pri dveh linijah smo spremljali število lezij na okuženih listih v daljšem časovnem obdobju. Ena od linij je izstopala po visokem številu lezij na okuženih listih, ki je primerljivo oziroma večje od števila lezij na okuženih listih krompirja genotipa NahG-Rywal, občutljivega na okužbo s PVY. S sekvenciranjem tarčnega zaporedja gena *StRbohD1* testiranih linij poskušamo ugotoviti, do kakšnih sprememb v genu je prišlo. Optimizacija te metode bo omogočila hitrejše preučevanje in boljše poznavanje genov v krompirju, ki je ena izmed najpomembnejših prehranskih poljščin današnjega časa.

**Pridobivanje proteinov krompirja in krompirjevega virusa Y
v bakteriji *Escherichia coli* ter njihova kristalizacija**

Špela Tomaž^{1,2}, Ajda Taler-Verčič^{2,3}, Aleksandra Usenik², Anna Coll¹, Kristina Gruden¹, Dušan Turk^{2,3}

¹ Nacionalni inštitut za biologijo

² Institut "Jožef Stefan"

³ Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov, Ljubljana

mentorji: Ajda Taler-Verčič, Aleksandra Usenik, Anna Coll, Kristina Gruden in Dušan Turk

Krompirjev virus Y (PVY) spada med najpomembnejše patogene gojenih rastlin krompirja (*Solanum tuberosum*). Ob okužbi krompirja s PVY se rastlina odzove z delovanjem različnih proteinov, ki sodelujejo pri oblikovanju imunskega odziva. Preučevanje njihovih medsebojnih interakcij ter strukturnih lastnosti je ključno za razumevanje procesov poteka okužbe. Z uporabo računalniških orodij smo zbrali znane interakcije med izbranimi proteini PVY in proteini imunskega odziva krompirja. Proteine smo poskusili pridobiti z izražanjem njihovih genskih zapisov v bakteriji *Escherichia coli*. Uspeli smo izraziti 13 izmed 38-ih zapisov za izbrane proteine. Izmed teh smo izbrali krompirjev protein TGA2.1, ki smo ga pridobili v večjih količinah. Protein TGA2.1 smo biokemijsko okarakterizirali z določitvijo njegovega oligomernega stanja, topnosti v različnih pufrih in določanjem aminokislinskega zaporedja N-konca proteina. Pridobljeni protein TGA2.1 smo kristalizirali za namen določitve njegove tridimenzionalne strukture z rentgensko kristalografijo.

Optimizacija in uporabnost metode za identifikacijo cianobakterij v okoljskih vzorcih na osnovi DNA

Evgenija Burger¹, Lucija Marzel Djuranovič¹, Luka Petravič¹, Tanja Gačnik¹,
Mojca Juteršek², Marko Dolinar²

¹ Gimnazija Novo mesto

² Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

mentorji: Tanja Gačnik, Mojca Juteršek in Marko Dolinar

Cvetenje cianobakterij je pogosto povezano z izločanjem toksinov, zato je pomembno, da pravočasno identificiramo morebitne strupene vrste cianobakterij. Cilja našega raziskovanja sta bila priprava hitrega, zdravju neškodljivega in učinkovitega protokola za izolacijo DNA iz okoljskih vzorcev oziroma cianobakterijskih celic ter postavitev smernic za identifikacijo posameznih cianobakterijskih vrst na osnovi analize DNA. Optimizirali smo protokol za hrambo okoljskih vzorcev, izolacijo DNA in pomnoževanje regij rRNA 16 S in ITS-1 na kromosomu. Večjo natančnost kot z določitvijo velikosti pomnoženih regij smo pri določanju heterogenosti cianobakterijskih vzorcev dosegli z restrikcijsko analizo PCR-produktov in določitvijo nukleotidnega zaporedja. Iz nabora dostopnih encimov smo kot najbolj uporabne restrikcijske nukleaze identificirali *EcoRI*, *NcoI*, *EcoRV*, *KpnI* in *BclI*. Pri določanju nukleotidnih zaporedij smo ugotovili, da so začetni oligonukleotidi, namenjeni za pomnoževanje genomskih regij pri cianobakterijah, pomnožili tudi nekatera kloroplastna zaporedja evkariontskih alg. Pripravili smo zgledne primere restrikcijske analize pomnoženih genomskih regij za identifikacijo dveh cianobakterij. Za vzorec z Blejskega jezera smo ugotovili, da je bilo nukleotidno zaporedje regije ITS-1 identično kot pri sevu *Planktothrix rubescens* NIVA_CYA18 in še nekaterih drugih. To kaže na minimalne razlike v sicer šibko ohranjeni genomski regiji ITS med različnimi izolati oziroma na svetovno razširjenost med seboj zelo podobnih sevov vrste *P. rubescens*.

Vpliv mutacij povezanih z boleznijo prezgodnjega staranja na strukturo in stabilnost prizadete DNA

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

¹ Gimnazija Vič

² Kemijski inštitut

mentorji: Alenka Mozer, Uroš Javornik in Janez Plavec

Dve mutaciji gena SLC24A25 povzročata Fontainov sindrom, eno od oblik boleznijo prezgodnjega staranja. Gen nosi zapis za protein S_{Ca}MC-1, ki sodeluje pri prenosu ATP skozi mitohondrijsko membrano. (AJHG, 101, 844, 2017) Pojav preučevanih mutacij povzroči izgubo funkcije proteina, ki je pogubna za življenje prizadetih oseb. Obolele osebe umrejo v prvih mesecih življenja. Mutacije v genomskem zapisu se lahko odrazijo v spremenjenem zaporedju proteinov, pričakujemo pa tudi spremembe stabilnosti in strukturnih lastnosti DNA. Spremembe v lastnostih genomske DNA lahko vplivajo na izražanje genov in na ostale ključne procese, povezane z DNA. Stabilnost dvojne vijačnice lahko vpliva na prepisovanje in podvajanje DNA ter na interakcijo med DNA in proteini, saj ti v nekaterih primerih prepoznajo nukleotide v nekanoničnih konformacijah. Določena zaporedja DNA lahko tvorijo tudi od B-DNA različne strukture, ki lahko ovirajo prepisovanje ali podvajanje DNA, predstavljajo mesto pogostih mutacij, ali pa predstavljajo prepoznavno mesto za vezavo različnih proteinov.

Preučili smo vpliv mutacije na DNA. Z UV spektroskopijo smo določali meritev temperature prehoda DNA iz zvitega v razvito stanje in pokazali, da se ob pojavu mutacij stabilnost DNA zmanjša; zniža se temperatura prehoda. S pomočjo CD in NMR spektroskopije smo pokazali, da lokalne strukturne lastnosti ostanejo podobne. Spremljali smo temperaturno odvisnost CD spektrov, iz katerih lahko vidimo, da vsa preučena zaporedja tvorijo B-DNA dvojno vijačnico. Iz NMR spektrov pa je razvidno, da pride pri razvijanju DNA najprej do odprtja baznih parov na robu zaporedja, medtem ko ostajajo bazni pari v jedru zaporedja stabilni do višjih temperatur.

Tako razumevanje termodinamskih in strukturnih lastnosti DNA-oligonukleotidov nam omogoča razumevanje povezave med dogajanjem v genomu in razvojem bolezenskih stanj.

Strukturne študije nenavadnih struktur DNA

Peter Podbevšek

Kemijski inštitut

Nukleinske kisline privzamejo več topologij, vključno z več-verižnimi vijačnicami, zato da lahko opravljajo različne biološke funkcije od prenosa genetske informacije do katalize in regulacije. Strukture različne od kanonične B-DNA so visoko zastopane v genomu in jih pogosto povezujemo s osnovnimi biološkimi procesi kot so regulacija genov, kromosomske preureditve in stabilizacija genoma. G-kvadrupeks je štiri-verižna sekundarna struktura, ki jo tvorijo z gvanini bogate nukleinske kisline. Osnovni gradnik G-kvadrupeksa je G-kvartet, v katerem so štirje gvaninski ostanki povezani z osmimi vodikovimi vezmi v Hoogsteenovi geometriji v koplanarni strukturni element. G-kvadrupeksi se tvorijo z nalaganjem dveh ali več G-kvartetov.

NMR spektroskopija je zelo primerna metoda za študij 3D strukture nukleinskih kislin, ker daje obenem vpogled v strukturo in dinamične lastnosti DNA in RNA molekul. Strukturne podatke dobimo z analizo NMR spektrov, ki temeljijo na korelacijah med jedi preko vezi ali preko prostora. Določitev strukture zahteva uporabo računalniške simulacije kjer je začetna struktura podvržena energijskemu potencialu, ki je odvisen od skladnosti strukture s skupino empirično ali eksperimentalno dobljenih spremenljivk.

Trenutno se ukvarjamo z vplivom reaktivnih oksidativnih spojin na strukturo G-kvadrupeksov. Zanimajo nas predvsem telomerne DNA strukture, ki ščitijo konce kromosomov pred erozijo. Človeški telomeri so tandemske z gvaninom bogate ponovitve dolge od 6 do 15 kb, kjer lahko pride do tvorbe velikega števila G-kvadrupeksnih struktur. Strukturne spremembe zaradi oksidativnega stresa bi posledično lahko vplivale na razporeditev G-kvadrupeksov v dolgi telomerni DNA, spremenile način vezave proteinov in v končni fazi vodile do predčasnega krajšanja telomerov.

Lipidne kapljice in avtofagija ščitijo rakave celice pred stresom

Maida Jusović^{1,2}, Ema Guštin¹, Eva Jarc^{1,2}, Toni Petan¹

¹ *Institut "Jožef Stefan"*

² *Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana*

mentor: Toni Petan

Neustrezna ožiljenost in hitra proliferacija rakavih celic vodi do pomanjkanja kisika in hranil. Rakave celice izpostavljene stresu kažejo okvarjeno sposobnost sinteze lastnih maščobnih kislin, ki jih poskušajo nadomestiti z povečanim vnosom zunajceličnih lipidov ali z recikliranjem lastnih znotrajceličnih lipidov. Celice shranjujejo maščobne kisline v obliki lipidnih kapljic, na novo priznanih organelov, ki se kopičijo v rakavih celicah izpostavljenim stresu. Naše dosedanje študije so pokazale, da lipidne kapljice ščitijo celice raka dojke pred s stradanjem inducirano celično smrtjo, vendar ključni mehanizmi še niso znani. Nedavne študije kažejo tudi, da je mehanizem recikliranja celičnih gradnikov imenovan avtofagija, ki se aktivira med stresom povzročenim s pomanjkanjem hranil, vključen v uravnavanje kopičenja lipidnih kapljic. Ugotovili so namreč, da razgradnja membranskih organelov z avtofagijo zagotavlja maščobne kisline za nastanek lipidnih kapljic in preživetje celic, obenem pa lipofagija, selektivna oblika avtofagije, lahko sodeluje tudi pri razgradnji lipidnih kapljic. Glavni cilj te študije je določiti povezavo med lipidnimi kapljicami in avtofagijo v celicah raka dojke in odkriti ključne molekularne poti, ki bi lahko postale tarče za zaviranje rasti in invazivnosti tumorjev. S farmakološkimi in genetskimi pristopi spreminjamo potek avtofagije, da bi določili njen pomen pri nastanku lipidnih kapljic in preživetju celic raka dojke tekom stradanja. Z različnimi pristopi tudi zaviramo ali pospešujemo nastanek in razgradnjo lipidnih kapljic v rakavih celicah, da bi določili njihovo vlogo pri preživetju celic in tumorski rasti. Poleg tega pa trenutno potekajo lipidomske in proteomske analize za ugotavljanje sprememb v lipidni sestavi kapljic in za identifikacijo z lipidnimi kapljicami povezanih proteinov, ki sodelujejo pri odzivu na stres in pri aktivaciji lipofagije. Rezultati naše raziskave bodo prispevali k odkritju ključnih procesov za preživetje celic tekom stresa in ponudili nove možnosti za ciljanje najbolj odpornih in agresivnih vrst raka dojke.

Struktura proteinov celične stene bakterije *Clostridium difficile*

Aleksandra Usenik, Nataša Lindič, Dušan Turk

Institut "Jožef Stefan"

mentor: Dušan Turk

Bakterija *Clostridium difficile* sodi med najpogostejše povzročitelje bolnišničnih okužb na svetu. Do okužbe s to bakterijo pride običajno po zdravljenju z antibiotiki, ki porušijo normalno črevesno floro, kar predstavlja ugodne razmere za njeno naselitev črevesa. Okužba z bakterijo *C. difficile* lahko poteka kot lažja driska, lahko pa pride do vnetja črevesne sluznice in tvorbe psevdomembran na črevesni sluznici. Če bolezen ni pravočasno zdravljena, lahko pride do predrtja črevesa in posledično do smrti bolnika. V zadnjih dvajsetih letih sta se v mnogih državah po svetu povečali tako število okužb kot tudi število zapletenih potekov bolezni. Čeprav je okužba z bakterijo *C. difficile* še vedno najpogostejša pri ljudeh starejših od 65 let po zdravljenju z antibiotiki v zdravstvenih ustanovah, narašča tudi število mlajših bolnikov in bolnikov brez predhodne bolnišnične obravnave in zdravljenja z antibiotiki, kot so npr. nosečnice in majhni otroci.

Bolezenske znake povzročajo samo sevi, ki proizvajajo toksine oziroma strupene snovi. Glavna toksina bakterije *C. difficile* sta toksina A in B, ki uničujeta celice črevesne sluznice, dražita živčne celice, ki oživčujejo črevo in povzročata močen vnetni odziv. Preden pride do proizvodnje in delovanja obeh toksinov, kar se zgodi v drugi fazi okužbe z bakterijo *C. difficile*, mora v prvi fazi okužbe priti do naselitve črevesne sluznice z bakterijo. Pri tem igrajo pomembno vlogo molekule celične stene, med njimi še posebej proteini površinske plasti bakterije *C. difficile*. V skupini za Strukturno biologijo Instituta "Jožef Stefan" smo z metodo rentgenske kristalografije določili strukturo dveh proteinov (Cwp6 in Cwp8) površinske plasti bakterije *C. difficile* in tako razkrili strukturo evolucijsko ohranjenega dela, ki je odgovoren za vezavo številnih proteinov v celično steno bakterije *C. difficile* kot tudi številnih drugih po Gramu pozitivnih bakterij.

Vpliv mikrovalov na zvijanje β -peptidov

Maša Predin¹, Zdenka Keuc¹, Urban Bren²

¹ *II. gimnazija Maribor*

² *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru*

mentorja: Zdenka Keuc in Urban Bren

Ko zboli vsak deseti nad 65. letom starosti za Alzheimerjevo boleznijo, se je smiselno vprašati, ali je porast nevrodegenerativnih bolezni v moderni dobi res zgolj odraz staranja prebivalstva. Namen te raziskovalne naloge je bil ugotoviti, ali vplivajo mikrovalovi na zvijanje β -peptidov. S simulacijami molekularne dinamike v polju sil GROMOS smo primerjali vpliv klasičnega in mikrovalovnega segrevanja na zvijanje β -peptida. Ugotovili smo, da so se pri mikrovalovnem segrevanju zaradi oteženega vzpostavljanja vodikovih vezi med β -peptidom in molekulami vode okrepile elektrostatske interakcije znotraj β -peptida. Struktura β -peptida je bila pri mikrovalovnem segrevanju bolj kompaktna in obstojna kot pri klasičnem. Pri mikrovalovnem segrevanju na 700 K sta se pojavili dve napačno zviti strukturi β -peptida z obliko lasnice. Zaradi spodbujanja napačnega zvijanja β -peptida smo mikrovalovno sevanje prepoznali kot dejavnik tveganja pri razvoju nevrodegenerativnih bolezni.

Posledice delovanja brioporina in hidralizina 2 na celice

Lan Vukolić¹, Sonja Artač¹, Maja Gerden¹, Marjetka Podobnik², Maja Čemažar³

¹ Gimnazija Vič

² Kemijski inštitut

³ Onkološki inštitut Ljubljana

mentorice: Sonja Artač, Maja Gerden, Marjetka Podobnik in Maja Čemažar

Porotvorni proteini (PFP) se nahajajo v vseh kraljestvih življenja in imajo zelo različne biološke vloge. Delujejo tako, da tvorijo pore v membranah tarčnih celic. Zato večina deluje kot toksini, v določenih primerih pa služijo v namene napada, obrambe, ali pa kot pomemben del imunskega sistema ter razvoja organizmov.

Raziskovalni problem naloge je preučevanje možnosti uporabe PFPjev, brioporina in hidralizina 2 pri zdravljenju raka.

Naše delo je razdeljeno na dva dela. V prvem delu smo raziskali lastnosti dveh PFPjev, brioporina in hidralizina 2 ter izolacijo por brioporina. V drugem delu pa poskušamo rezultate bazične raziskave uporabiti pri razvijanju novih pristopov za zdravljenje nekaterih vrst rakov.

Brioporin smo uspešno izolirali in očistili, inkubirali smo ga na lipidnih veziklih in dokazali, da pod določenimi pogoji na membrani oligomerizira v pore. Preverjali smo temperaturno stabilnost in hitrost hemolize obeh proteinov in ugotovili da je temperatura faznega prehoda pri obeh proteinih približno 55 °C, hitrost hemolize pa je pri obeh proteinih višja v okolju z nižjim pH.

Zgodnji poskusi testiranja delovanja porotvornih proteinov na melanomske tumorske celične linije B16F10 in SK-MEL 28, kažejo da oba proteina tvorita pore v celičnih membranah. Hidralizin 2 tvori več por na večjem številu celic kot brioporin. S testom viabilnosti celic, smo ugotovili tudi, da so celice humanega melanoma (SK-MEL 28) bolj občutljive na brioporin, kot celice mišjega melanoma (B16F10). Iz krivulj preživetja celic po izpostavitvi PFPjem, smo določili tudi koncentracije obeh proteinov, ki minimalno zmanjšajo preživetje celic (<20%) za nadaljnje delo na obeh celičnih linijah.

Rezultati so spodbudni, saj kažejo na potencialno uporabo obeh proteinov. S proteinoma bi povečali prepustnost membran tumorskih celic, kar bi omogočalo večjo dostavo drugih zdravil v celice. Oba proteina bi bila v človeškem tkivu temperaturno stabilna in ker je medceličnina rakavih tkiv bolj kisla od zdravih tkiv, bi bila formacija por v membrani tumorskih celic verjetno tudi bolj učinkovita kot v normalnih celicah.

Kvasovka kot modelni organizem za študij delovanja antioksidantov v celicah

Polona Jamnik

*Katedra za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta
Univerze v Ljubljani*

Modelni organizmi se uporabljajo za preučevanje in razumevanje bioloških procesov. Lahko jih enostavno vzdržujemo in gojimo v laboratorijskih pogojih. Zanje je značilna ohranjenost določenih genov oz. poti s človekom. Mednje sodi tudi kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*, ki se uporablja kot modelni organizem za študij osnovnih celičnih procesov, stresnih odgovorov in metabolnih poti človeka. Kvasovka je eden najenostavnejših evkariontskih organizmov, zanjo je značilno enostavno in poceni gojenje, hitra rast, enostavna pa je tudi za genske manipulacije. V prispevku bo predstavljeno, kako nam enostavni enocelični evkariontski organizem pomaga pri pojasnevanju antioksidativnega delovanja propolisa kot vira antioksidativnih učinkovin na celični in proteomski ravni. Številne učinkovine in rastlinski ekstrakti so bili že potrjeni glede antioksidativnega potenciala na osnovi *in vitro* raziskav. To pa ne odraža nujno tudi njihovega antioksidativnega delovanja v celicah, zato ga je potrebno preučiti, kjer pa nam pomagajo modelni organizmi.

Priprava frakcij ječmena s povečano vsebnostjo bioaktivnih spojin

Florijan Cajzek, Blaž Cigić

Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

mentor: Blaž Cigić

V sodobnem svetu se uživa velika količina industrijsko predelane hrane, kar lahko vodi do pomanjkljivega vnosa prehranskih vlaknin. Zato postajajo živila, ki so bogata s prehranskimi vlakninami, vse bolj popularna. Med živila z veliko vsebnostjo prehranskih vlaknin spada tudi ječmen, ki predstavlja posebej bogat vir žitnih β -glukanov. Žitni β -glukani so linearni glukozni polimeri, povezani preko β -1,4 in β -1,3 glikozidnih povezav in predstavljajo večji del vodotopnih vlaknin v ječmenu. Zaradi svojih fizikalno-kemijskih lastnosti v prebavnem traktu tvorijo viskozno raztopino, kar vpliva na zniževanje serumskega holesterola in manjši glikemični odziv po obroku. Poleg tega so odlični prebiotki za bakterije v debelem črevesju. Pozitivne učinke na zniževanje holesterola v krvi in s tem povezane zdravstvene trditve, sta za žitne β -glukane iz ovsa in ječmena odobrili tudi FDA in EFSA.

V okviru pričujoče raziskave smo pripravili mlevske frakcije ječmena. V vsaki frakciji smo določili topne in netopne prehranske vlaknine, β -glukane in vodotopne antioksidante. Analizirali smo tudi vsebnost škroba, lipidov, proteinov in mineralov. Razlika v elastičnosti in čvrstosti med tkivi v zunanjih delih zrna in škrobom bogatim endospermom v notranjosti, je rezultirala v tvorbi različno velikih delcev pri mletju. Ugotovili smo, da s separiranjem po velikosti lahko pridobimo frakcije z velikimi razlikami v vsebnosti β -glukanov, antioksidantov in makrohranil.

Pokazali smo, da tudi z relativno enostavnimi postopki lahko pripravimo moke z veliko dodano vrednostjo.

Vpliv različnih antioksidantov na z menadionom sprožene signalne poti na celični liniji imMEF

Ana Krišelj¹, Nežka Kavčič^{2,3}, Katarina Pegan³ in Boris Turk^{1,2,4}

¹ *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani*

² *Oddelek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo, Institut "Jožef Stefan"*

³ *Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana*

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

mentor: Boris Turk

Reaktivne kisikove spojine (ROS) so prosti radikali, ki vsebujejo kisikove ione ali perokside in v celicah nastajajo neprestano kot stranski produkti celičnega metabolizma. Tekom evolucije so se v celicah razvili obrambni mehanizmi, ki omejujejo nastanek nevarnih prostih radikalov ali pa popravljajo že nastale poškodbe. V kolikor se poruši ravnovesje med oksidanti in antioksidanti, lahko ROS povzročijo oksidativni stres. V živih organizmih se posledično lahko razvijejo patološka stanja kot so nekatere avtoimunske in nevrodegenerativne bolezni, ROS pa imajo pomembno vlogo tudi pri infarktu in aterosklerozi.

Tekom magistrske naloge smo najprej na celični liniji immortaliziranih mišjih embrionalnih fibroblastov (imMEF) preučevali vpliv menadiona, ki v celicah sproži nastanek mitohondrijskih in citosolnih ROS, nadalje pa smo primerjali vpliv dveh antioksidantov z različnim delovanjem (NAC in MnTBAP) na omejevanje celičnega stresa. V naslednjem koraku nas je zanimalo, kako z MD sprožen oksidativni stres vpliva na celično smrt. Ugotovili smo, da MD v izbranem celičnem modelu ne sproži nobene od klasičnih oblik regulirane celične smrti, kot sta apoptoza in nekroptoza. Na podlagi naših dosedanjih rezultatov lahko sklepamo, da MD sproži ferroptozo, ki je nova oblika celične smrti.

Sinteza kanabinoidov v posameznih fazah rasti industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) in njihovi protimikrobni ter antioksidativni učinki

Domen Lah¹, Bor Logar Dražumerič¹, Katja Holnthaner Zorec¹, Tanja Bagar²

¹ II. gimnazija Maribor

² ICANNA – mednarodni inštitut za Kanabinoide

mentorici: Katja Holnthaner Zorec in Tanja Bagar

Konoplja se že od prazgodovine uporablja za različne namene, tudi medicinske. Namen naše naloge je bil ugotoviti, ali imajo petroletrni ekstrakt, olje iz semen in komercialni pripravki iz industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) protimikrobne učinke na vrste *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* in *Candida parapsilosis*, kar smo preverili z metodo difuzije na trdnem gojišču z diski. Z DPPH metodo smo preizkusili antioksidativne učinke različnih čajev iz konoplje, ekstrakta in komercialnih pripravkov. Zanimal nas je tudi profil kanabinoidov pri različnih stopnjah razvoja industrijske konoplje, zato smo ekstrakte različno starih rastlin, ki smo jih vzgojili sami, analizirali s tekočinsko kromatografijo (HPLC). Rezultati so pokazali protimikrobni učinek ekstrakta na vse testne mikroorganizme in antioksidativni učinek vseh preizkušenih preparatov. Metoda HPLC pa je razkrila spreminjanje koncentracij različnih kanabinoidov med rastjo konoplje. Vse to je spodbuda za nadaljnje raziskave v tej smeri.

Artemisinin: procesi ekstrakcije, antioksidacijska učinkovitost in vsebnost skupnih fenolnih spojin

Julija Koletnik¹, Zdenka Keuc¹, Darija Cör², Maša Knez Hrnčič²

¹ *II. gimnazija Maribor*

² *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru*

mentorice: Zdenka Keuc, Darija Cör in Maša Knez Hrnčič

V nalogi ugotavljamo, s katero metodo ekstrakcije (ekstrakcija z uporabo superkričnega CO₂, ekstrakcija po Soxhletu) in pod katerimi pogoji (polarnost topila) je izkoristek fenolnih spojin z največjo antioksidacijsko učinkovitostjo v ekstraktu *Artemisia annua* L. največji. Primerjava izkoristkov ekstrakcij kaže, da je najoptimalnejša ekstrakcija po Soxhletu z uporabo metanola, katere izkoristek je za 5.36 % višji od izkoristka ekstrakta, pridobljenega z ekstrakcijo CO₂ pod tlakom 200 barov in pri temperaturi 50°C. Največ snovi z antioksidacijskim učinkom smo ekstrahirali z ekstrakcijo po Soxhletu z metanolom. Tej sledi ekstrakt, pridobljen s SFC pri tlaku 300 barov in 35°C, najmanj snovi z antioksidacijsko učinkovitostjo pa je bilo v ekstraktu, kjer smo kot topilo uporabili petroleter. Koncentracija skupnih fenolnih spojin, izraženih v mg EGK/L, pokaže, da so ekstrakti, pridobljeni s SFC-metodo, precej bogatejši kot ekstrakti, pridobljeni z ekstrakcijo po Soxhletu.

Naravni uničevalci rastlinskih celic

Gregor Anderluh

Odsek za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo, Kemijski inštitut

V preteklem letu smo objavili prispevek v prestižni znanstveni reviji *Science* o proteinih NLP (angl. Necrosis- and ethylene-inducing peptide 1-like proteins), ki jih v okolje sproščajo številni fitopatogeni mikroorganizmi in povzročajo nekrozo rastlinskih celic dvokaličnic. Najbolj znani teh rastlinskih škodljivcev so oomicete rodu *Phytophthora* in *Pythium* ali glive rodu *Botrytis*, ki povzročajo številne bolezni na gospodarsko pomembnih rastlinah, kos so kakavovec, soja, koruza, vinska trta, itd. Analiza tridimenzionalne zgradbe proteina NLP iz patogene oomicete *Pythium aphanidermatum* je pokazala podobnost citolitičnim aktinoporinom, ki po specifični prepoznavi sfingomielina v membranah tarčnih celic tvorijo transmembransko poro. Proteini NLP prav tako porušijo integriteto veziklov, pripravljenih iz membran rastlin dvokaličnic, zaradi česar je predviden podoben način delovanja teh taksonomsko nesorodnih proteinskih družin. Pri raziskavi smo kot tarčno molekulo proteinov NLP v membranah rastlinskih celic v naši skupini uspeli identificirati glikozilinozitol fosforilceramide (GIPC) serije A. Z uporabo X-žarkovne kristalografije smo pridobili tudi vpogled v interakcijo proteina NLP s sladkornim delom tarčnega sfingolipida na atomski ravni. Vezava sladkorja povzroči številne konformacijske spremembe, ki omogočajo učinkovito namestitev celotnega sladkornega dela molekule GIPC. Rezultati te raziskave nam bodo v prihodnosti služili kot osnova za racionalno načrtovanje učinkovin, usmerjenih proti tem naravnim uničevalcem rastlinskih celic.

3D celične kulture in zarodki rib cebric kot modeli za raziskave možganskih tumorjev

Barbara Breznik¹, Miloš Vittori², Tamara Lah Turnšek¹

¹ Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Nacionalni inštitut za biologijo

² Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

mentor: Miloš Vittori

Rak je eden od najpogostejših vzrokov smrti v razvitem svetu. Preučevanje mehanizmov napredovanja raka in iskanje novih terapevtskih tarč v predkliničnih modelih je nujno za razvoj učinkovitega zdravljenja te smrtonosne bolezni. Na Nacionalnem inštitutu za biologijo se ukvarjamo s preučevanjem najpogostejšega in najagresivnejšega možganskega tumorja, glioblastoma. Mikrookolje glioblastoma je poleg malignih rakavih celic sestavljeno iz ne-rakavih stromalnih celic, kot so endotelijske celice, fibroblasti, celice imunskega sistema in mezenhimske matične celice. Te stromalne celice med rastjo glioblastoma migrirajo v tumor, kjer lahko preko interakcij s celicami glioblastoma povzročijo pospešen razvoj glioblastoma. Za preučevanje interakcij med celicami ter z namenom iskanja novih terapevtskih tarč v našem laboratoriju uporabljamo različne celične modele *in vitro* ter zarodke rib cebric (*Danio rerio*), v katere injiciramo rakave celice glioblastoma ter opazujemo njihovo rast in širjenje v možganih zarodkov. Zarodki rib cebric so primerni modeli za spremljanje malignih celičnih procesov, saj še nimajo razvitega imunskega sistema, poleg tega pa zaradi prozornosti omogočajo vizualizacijo celic z mikroskopijo v realnem času. Z uporabo 3D celičnega modela tumorske invazije smo ugotovili, da lahko mezenhimske matične celice pospešijo ali zavrejo migracijo ter invazijo celic glioblastoma, odvisno od podvrste celic glioblastoma. Celice glioblastoma so namreč zelo heterogene, saj znotraj tumorja najdemo maligne celice z različnimi fenotipskimi lastnostmi. Na primer, nekatere celice glioblastoma hitreje rastejo in pospešeno invadirajo v okoliški matriks kot druge. Podobne rezultate smo pridobili, ko smo celice glioblastoma skupaj z mezenhimijskimi matičnimi celicami implantirali v možgane rib cebric. Rast tumorja ter njegovo invazijo v možganih smo lahko zelo dobro vizualizirali ter kvantificirali. Menimo, da so 3D večcelični modeli in zarodki rib cebric zelo dobri modeli za preučevanje glioblastoma v predklinični fazi.

Mlečnokislinske bakterije kot zdravilo

Tina Vida Plavec¹, Aleš Berlec²

¹ Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani

² Odsek za biotehnologijo, Institut "Jožef Stefan"

mentor: Aleš Berlec

Mlečnokislinske bakterije so raznolika skupina bakterij, katerih glavni produkt presnove sladkorjev je mlečna kislina, kar izkoriščamo v živilski industriji. Uporabljamo jih za konzerviranje hrane in proizvodnjo fermentiranih živil, kot so mlečni izdelki (sir, kefir in jogurt) in zelenjava (kislo zelje, kisle kumare). Spadajo med probiotične bakterije, kar pomeni, da koristno vplivajo na zdravje, pomagajo pa predvsem pri lažšanju težav s prebavo.

Med najpomembnejše mlečnokislinske bakterije spada *Lactococcus lactis*. Zaradi dolgotrajne uporabe v prehrani jo Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) priznava kot varno, kar lahko izkoristimo za njeno uporabo v terapevtske namene. Bakterije lahko biotehnološko spremenimo, kar pomeni, da jim z vnosom različnih genov omogočimo pridobitev določenih lastnosti. Tako spremenjene bakterije lahko uporabimo kot gostiteljski sistem ter vektor za izražanje in dostavo različnih rekombinantnih proteinov.

Predstavitev rekombinantnih proteinov na površinah tako spremenjenih bakterij omogoča njihovo izpostavitve okolju in ustrezen stik z gostiteljem. Če na površino priprimo dejavnik, ki deluje kot vezalec za vnetne molekule, je tako bakterijo mogoče uporabiti tudi za zdravljenje bolezni. Bakterije z rekombinantnimi proteini na površini bi zaužili in tako lahko uporabili namesto zdravil za bolezni, ki jih trenutno apliciramo v obliki injekcij, in ki so za pacienta neprijetna.

Proteine, ki jih želimo izraziti, bakterija pripne na svojo površino. Obstajajo različni načini pripetja proteina na površino, odvisno od t. i. sidra, preko katerega je protein pripet na bakterijsko površino. Sidra se lahko med seboj razlikujejo poleg načina pripetja na površino tudi po dolžini in izvoru. V okviru raziskovalnega dela smo analizirali sidra, ki se na bakterijsko površino vežejo kovalentno ali nekovalentno, izhajajo pa iz bakterijskih ali iz bakteriofagnih površinskih molekul. Tako smo ovrednotili večji nabor možnih sider za vezavo proteinov na bakterijsko površino. Na bakterijski površini bi na ta način lahko hkrati predstavili več proteinov. S sočasno predstavitvijo več rekombinantnih proteinov na bakterijski površini, vezanih preko različnih sider, bomo lahko vplivali na različne vnetne signalne poti v človeškem telesu.

Vpliv steroidogenega dejavnika 1 na izražanje gonadotropinov v hipofizi mišiAna Babnik¹, Greta Junger¹, Alenka Mozer¹, Neža Grgurevič²¹ Gimnazija Vič² Center za genomiko živali, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani

mentorici: Alenka Mozer in Neža Grgurevič

Steroidogeni dejavnik 1 (SF-1) je prepisovalni dejavnik, ki uravnava mnoge pomembne gene. Mutacije gena *SF-1* pogosto vodijo v probleme z neplodnostjo, čeravno funkcionalna vloga SF-1 pri neplodnih pacientih in še nekaterih drugih boleznih ni popolnoma pojasnjena.

Rezultati raziskav kažejo, da je SF-1 pomemben pri izražanju gonadotropinov kot sta folikel stimulirajoči hormon (FSH) in luteinizirajoči hormon (LH), saj miši z izbitim genom *sf-1* (SF-1KO) teh hormonov v hipofizi nimajo izraženih. V prejšnjih raziskavah so predvidevali, da hipofize miši SF-1KO niso sposobne izražanja FSH in LH brez stimulacije s hipotalamičnim gonadotropin sproščujočim hormonom. Ker so v prejšnjih raziskavah uporabili le novorojene in predpubertetne miši, smo želeli preveriti to hipotezo na odraslih, 5 mesečnih, SF-1KO miših ter jih primerjali s hipofizami miši z normalno delujočim *sf-1* genom (WT).

Statistična analiza obarvanih hipofiz z metodo imunohistokemije je pokazala, da je izraženost FSH in LH pri miših SF-1 KO sicer bistveno manjša kot pri WT, vendar nedvoumno prisotna. Naša raziskava zato dokazuje, da je pri miših SF-1KO izražanje gonadotropinov ohranjeno tudi brez stimulacije z GnRH.

Preliminarno smo analizirali tudi hipofize mlajših odraslih živali SF-1KO, ki so prav tako kazale prisotnost FSH in LH. V nadaljevanju bomo uporabili hipofize miši, predhodno tretirane z različnimi spolnimi hormoni, ter preverili ali je tudi pri miših SF-1 KO ohranjeno spolno različno uravnavanje gonadotropinov. Dobljeni rezultati bi lahko veliko prispevali k razumevanju izražanja gonadotropinov, kar bi lahko v nadaljevanju koristilo pri prepoznavanju in diagnosticiranju neplodnosti in drugih motenj, povezanih z njima. Naša raziskava je zaenkrat prva, ki je dokazala prisotnost FSH in LH v hipofizah odraslih miši brez gena *sf-1* brez predhodne stimulacije s hormoni, ki bi lahko vplivali na sintezo teh dveh hormonov.

Matični mleček in trans-10-hidroksi-2-decenojska kislina

Larsen Cundrič, Matic Rajnar, Taja Skube, Janja Pust

Gimnazija Novo mesto

mentorica: Janja Pust

V zadnjem času matični mleček pridobiva na vse večji veljavi, saj se ljudje ponovno zatekajo k naravnim in dobro preverjenim učinkovinam. Matični mleček ima tako v domači medicini vedno bolj pomembno vlogo.

Matični mleček ali gelee royale je tako imenovana super hrana, ki ne učinkuje dobro le na čebeljo vrsto, ampak ima izjemno dobre učinke tudi na človeka. Zaradi vsebnosti trans-10-hidroksi-2-decenojske kisline, imenovane tudi 10-HDA, je to eno izmed najbolj čudežnih zdravil, ki jih narava premore. Prav njena najpomembnejša substanca, 10-HDA, je še premalo raziskana in zaradi tega smo se odločili za nadaljnjo, bolj poglobljeno raziskavo le te, iz katere je nato nastala naša raziskovalna naloga.

Pred samim analiziranjem vsebnosti 10-HDA v posameznih vzorcih smo morali še validirati metodo za določanje 10-HDA, saj ta še ni bila povsem potrjena. Dokazati smo morali, da je metoda selektivna, ponovljiva, linearna in točna. S potrjeno metodo smo analizirala različne vzorce matičnih mlečkov in določali njihovo stabilnost pri izpostavitvi različnim zunanjim pogojem. V vseh vzorcih smo določiti vsebnost 10-HDA za posamezen vzorec. Z analizov vsebnosti 10-HDA z metodo visokotlačne tekočinske kromatografije (HPLC) smo primerjali domače in komercialen matični mleček ter izdelek, ki vsebuje matični mleček. Tako smo naše vzorce matičnih mlečkov razvrstili po kakovosti glede na vsebnost 10-HDA. S tem smo ugotovili stanje kakovosti matičnega mlečka na slovenskem trgu. Ugotovili smo, da ni vseeno, kakšen je matični mleček in od katerega pridelovalca ga uživamo, saj so razlike med temi več kot očitne, sami pa kakovosti z enostavnimi testiranjmi ne moremo preveriti. Preverjali smo vpliv zunanjih pogojev na obstojnost 10-HDA in preučili, na kakšen način je najbolje shranjevati matični mleček, da ostane čim dlje svež in z visoko vsebnostjo 10-HDA. Ugotovili smo, da so raztopine standarda stabilne vsaj tri tedne, če so hranjene v hladilniku. 10-HDA je obstojnejša na sobni temperaturi, če je zaščitena pred svetlobo ter da je sestavina matičnega mlečka, 10-HDA, občutljiva na visoke temperature.

OSTALI POVZETKI

Pozitivna in negativna regulacija AMPK v skeletni mišici

Klemen Dolinar¹, Tina Požun^{1,2}, Alexander V. Chibalin³, Sergej Pirkmajer¹

¹ *Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani*

² *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani*

³ *Karolinska Institutet, Stockholm, Švedska*

mentor: Sergej Pirkmajer

Z AMP aktivirana protein kinaza (AMPK) je pomembna celična kinaza, ki med drugim uravnava celični metabolizem in skrbi za celično energetsko homeostazo. Njeno delovanje regulirajo različni fiziološki dražljaji, na primer energetski stres in hormoni, poznamo pa tudi več farmakoloških učinkovin, ki lahko vplivajo na njeno aktivnost. Na različnih živalskih modelih za sladkorno bolezen in inzulinsko rezistenco je bilo pokazano, da farmakološka aktivacija AMPK izboljša homeostazo glukoze v krvi, zato je AMPK zanimiva tarča za razvoj novih oblik zdravljenja sladkorne bolezni. V naši skupini preučujemo delovanje AMPK v skeletnih mišicah, ki so glavno mesto za od inzulina odvisen privzem glukoze in pomembno mesto inzulinske rezistence pri sladkorni bolezni, z namenom, da bi odkrili nove tarče oziroma učinkovine za zdravljenje sladkorne bolezni.

AMPK se lahko aktivira na dva načina, in sicer alosterično in/ali s post-translacijskimi spremembami, med katerimi je najbolj raziskana fosforilacija. Najpomembnejše fosforilacijsko mesto je Thr172, katerega fosforilacija močno aktivira AMPK. Obstajajo pa tudi mesta, katerih fosforilacija inhibira fosforilacijo Thr172 in s tem aktivacijo AMPK. Eno od teh mest je Ser485, ki pa je v primerjavi s Thr172 še relativno slabo raziskano. Eden od naših ciljev je boljša opredelitev regulacije in funkcije tega mesta v AMPK skeletne mišice.

Naše raziskave izvajamo na dveh celičnih modelih skeletne mišice, in sicer na podganji skeletnomišični celični liniji L6 in na človeških primarnih skeletnomišičnih celicah. Fosforilacijo AMPK analiziramo z odtisom western, aktivnost AMPK pa ocenimo na podlagi fosforilacije ACC, ki je neposredna tarča AMPK. Analiziramo lahko tudi aktivnost metabolnih poti, na katere deluje AMPK, na primer privzem glukoze v celice.

Z našimi raziskavami želimo razširiti znanje o delovanju AMPK v skeletni mišici, kar bi omogočilo odkrivanje novih tarč in razvoj novih učinkovin za boj proti sladkorni bolezni.

Vpliv genetske variabilnosti v signalnih poteh oksidativnega stresa na metabolične značilnosti bolnic s sindromom policističnih ovarijev in na njihov odgovor na zdravljenje

Rok Herman, Vita Dolžan, Mojca Jensterle Sever

Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

mentorici: Vita Dolžan in Mojca Jensterle Sever

Izhodišče. Sindrom policističnih ovarijev (PCOS) je najpogostejša endokrina motnja pri ženskah v rodni dobi. Že dolgo je predmet raziskav vpletenost kroničnega vnetja in oksidativnega stresa (OS) v patogenezo PCOS. Prav tako se poraja vprašanje, koliko sta OS in vnetje vzročno povezana. Poznavanje molekularno-genetskega ozadja v poteh, povezanih z OS in vnetjem, bi lahko pripomoglo k boljšemu razumevanju patogeneze PCOS, identifikaciji novih genetskih označevalcev tveganja za PCOS in odgovora na zdravljenje ter s tem k izbiri najbolj učinkovitega pristopa zdravljenja za posamezno bolnico.

Hipoteze. Polimorfizmi v antioksidativnih (*SOD2* rs4880, *CAT* rs1001179, *GPX1* rs1050450, *PON1* rs854560 in rs662) in prosvetnih poteh (*NLRP3* rs35829419, *CARD8* rs2043211, *TNF α* rs1800629, *IL1B* rs1143623 in rs16944, *IL6* rs1800795) vplivajo na: 1. tveganje za razvoj PCOS; 2. klinične značilnosti bolnic pred prvim zdravljenjem; 3. spremembo kliničnih značilnosti bolnic po zdravljenju.

Metode. V študijo smo vključili 169 bolnic in 83 zdravih krvodajalk. V prvem delu raziskave smo primerjali frekvenco genotipov posameznega polimorfizma med bolnicami in kontrolami. V drugem delu smo določali vpliv polimorfni alelov na klinične značilnosti bolnic pred zdravljenjem. V zadnjem delu raziskave pa smo opazovali vpliv polimorfni alelov na odgovor bolnic po treh mesecih izbranega zdravljenja.

Rezultati. Polimorfizmi *SOD2* rs4880, *CARD8* rs2043211 in *IL1B* rs16944 so bili povezani s tveganjem za razvoj PCOS. Pred zdravljenjem smo statistično značilen vpliv na klinične značilnosti bolnic opazili pri *CAT* rs1001179, *SOD2* rs4880, *PON1* rs854560, *NLRP3* rs35829419, *TNF α* rs1800629, *IL1B* rs1143623, *IL1B* rs16944 in *IL6* rs1800795. Pri zdravljenju z metforminom smo statistično značilne vplive na klinične značilnosti po zdravljenju opazili pri *CAT* rs1001179, *SOD2* rs4880, *NLRP3* rs35829419 in *TNF α* rs1800629. Pri zdravljenju z liraglutidom pa smo statistično značilne vplive na klinične značilnosti po zdravljenju opazili pri *CAT* rs1001179, *PON1* rs854560, *CARD8* rs2043211, *NLRP3* rs35829419, *TNF α* rs1800629 in *IL6* rs1800795.

Zaključki. V raziskavi smo potrdili vse tri zastavljene hipoteze.

Nekodirajoče RNA kot označevalci razvoja in poteka shizofrenije

Karin Hrovatin¹, Tanja Kunej², Vita Dolžan³

¹ *Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani*

² *Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Biotehniška fakulteta Univ. v Ljubljani*

³ *Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani*

mentorici: Tanja Kunej in Vita Dolžan

Pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela in statistične analize: Sara Redenšek (Laboratorij za farmakogenetiko, Medicinska fakulteta, UL)

Opredelevitev problema: Shizofrenija je kronična duševna motnja z veliko dedno komponento. Pri povezovanju genetskih sprememb s shizofrenijo sta pomembna preučevanje metabolnih poti in genetskih interakcij. Vendar pa se večinoma preučuje le ozek nabor protein-kodirajočih genov že povezanih s shizofrenijo; genetski regulatorji, kot so nekodirajočim RNA (ncRNA), so slabše raziskani. Namen dela: 1.) Bioinformacijski izbor novih s shizofrenijo povezanih kandidatnih lokusov, ki bi lahko pomagali pri razvoju biooznačevalcev za shizofrenijo in ležijo v ncRNA, ki so povezane s serotoninsko potjo in genom *BDNF*, in sicer: 1.1.) ncRNA, ki se prekrivajo z geni serotoninske poti, povezanimi s shizofrenijo (*SP-SZG*) in *BDNF*, ter 1.2.) mikro RNA (miRNA), ki eksperimentalno potrjeno uravnavajo izražanje *SP-SZG*. 2.) Preverjanje povezave štirih izbranih polimorfizmov v kandidatnih lokusih s shizofrenijo v slovenski populaciji. Metode in rezultati: Razvili smo bioinformacijski pristop za prioritarno izbiranje kandidatnih lokusov, povezanih s shizofrenijo znotraj ncRNA v bioloških poteh. S tem pristopom smo izmed 29 ncRNA, ki so se prekrivale s *SP-SZG* in z genom *BDNF*, kot najzanesljivejše kandidate z vlogo pri shizofreniji izbrali eno miRNA in štiri protismerne RNA. Poleg tega smo pridobili 192 miRNA, ki eksperimentalno potrjeno uravnavajo izražanje *SP-SZG*, in izmed njih izbrali dve kandidatni miRNA. V ncRNA smo izbrali enajst kandidatnih različic nukleotidnega zaporedja. Štiri od teh različic smo na podlagi pogostosti v populaciji uporabili za laboratorijsko preiskavo na vzorcu 341 bolnikov s shizofrenijo in 258 zdravih kontrol. Polimorfizem rs11030101 v *BDNF* in *BDNF-AS* je bil povezan s psihosimptomatiko akutno zdravljenih bolnikov. Opazili smo še neopisano povezavo polimorfizma rs28722151 v *BDNF* in *BDNF-AS* z odzivom na zdravljenje in duševnim stanjem akutno zdravljenih bolnikov. Prvič smo povezali rs6265 v *BDNF* in *BDNF-AS* z odzivom na zdravljenje v slovenski populaciji. Zaključek: Rezultati te raziskave bodo prispevali k boljšemu razumevanju shizofrenije in pomagali pri načrtovanju raziskav v prihodnosti.

Razvoj biosenzorja imunskega odziva v krompirju

Valentina Levak

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

mentorice: Anna Coll, Tjaša Lukan, Kristina Gruden (Nacionalni inštitut za biologijo)

Kadar rastlina doživi stres, naj bo biotskega ali abiotskega izvora, v ogroženih celicah pride do imunskega odziva. Informacija o vrsti stresa se prenese med celicami s hormoni in drugimi signalnimi molekulami, ki nastajajo med celičnim imunskim odzivom.

Cilj našega dela je razvoj biosenzorskega sistema, ki bo omogočal vpogled v prostorsko-časovno dinamiko imunskega odziva v tkivu rastlin krompirja (*Solanum tuberosum*). Imunski odgovor lahko spremljamo preko aktivnosti promotorjev genov, ki so vključeni v regulatorno omrežje imunskega odgovora. Z izbiro promotorja gena iz določene signalne poti rastlinskega imunskega odgovora lahko sledimo prostorsko-časovni dinamiki aktivacije izbranih genov in s tem širjenju imunskega odgovora po tkivu skozi čas.

Najprimernejše promotorje bomo določili po prehodni transformaciji tobaka s pomočjo testa aktivnosti promotorjev z beta-glukuronidazo. Aktivnost izbranih promotorjev bomo nato spremljali v krompirju s fluorescenčno mikroskopijo po stabilni transformaciji rastlin. Zato je naše delo usmerjeno v pripravo vektorja z zapisom za dva reporterska proteina, beta-glukuronidazo in fluorescenčni protein, ki bo po sklopitvi promotorjev izbranih genov z genom za reporterska proteina omogočal spremljanje aktivnosti izbranih promotorjev. Vzporedno s pripravo vektorja smo optimizirali postopke detekcije izbranih reporterskih proteinov, da bi zagotovili zanesljivo delovanje biosenzorskega sistema. Aktivnost promotorjev smo spremljali v tobaku (*Nicotiana benthamiana*) s testom z beta-glukuronidazo. Uporabili smo inducibilna promotorja dveh proteinov, PR1b in Pti5, za katera je znano, da sodelujeta v imunskem odzivu rastlin. Izražanje proteina PR1b se sproži ob pojavu patogena in ob prisotnosti salicilne kisline, Pti5 pa je transkripcijski faktor v etilenskem odzivu. Zapis za izbrana promotorja in reporterski protein beta-glukuronidazo smo v tobak vnesli s prehodno transformacijo z agrobakterijami. Nato smo promotorja aktivirali s salicilno kislino, ki je udeležena v rastlinski imunski signalizaciji. Stopnjo izražanja reporterskega gena in s tem aktivnost promotorjev bomo določili z analizo slik obarvanega tkiva.

Nova spoznanja o nastanku in razširjanju imunskega odziva pri rastlinah nam pomagajo pri razumevanju poteka rastlinskih bolezni in rastlinskega odgovora na kombinacijo različnih stresorjev, s katerimi se sooča. To razumevanje je ključno pri pripravi novih, odpornejših rastlinskih sort.

Vpliv dikloroacetata na aktivnost piruvat-dehidrogenaze-kinaze v rakastih in skeletnomišičnih celicah

Nives Škorja, Sergej Pirkmajer

Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

mentor: Sergej Pirkmajer

Piruvat-dehidrogenaza-kinaza (PDK), ki ima štiri izooblike (PDK1-4), fosforilira in inhibira kompleks piruvat-dehidrogenaze (PDC) in s tem spodbuja anaerobno presnovo glukoze in nastajanje mlečne kisline. Povečana aktivnost PDK je povezana s številnimi bolezenskimi stanji, vključno z rakom, sladkorno boleznijo tipa 2, debelostjo in zmanjšanim pretokom krvi (ishemijo). Ker je v bolezenskih razmerah PDK čezmerno aktivna, je eden izmed ciljev zdravljenja zmanjšati njeno aktivnost z različnimi farmakološkimi inhibitorji. Dikloroacetat (DCA), najpogosteje uporabljen inhibitor PDK, ima številne koristne učinke pri zdravljenju raka in sladkorne bolezni tipa 2. Molekularni mehanizmi, prek katerega DCA modulira aktivnost PDK, pa kljub njegovi pogosti uporabi niso v celoti pojasnjeni.

V naši študiji smo preučili molekularne mehanizme, prek katerih DCA vpliva na aktivnost PDK. Kot poskusni model za preučevanje učinkov DCA pri raku smo uporabili celice raka dojke MDA-MB-231 in celice raka prostate PC-3. Ker so skeletne mišice pomembna tarča za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2, smo učinke DCA preučili tudi v skeletnomišičnih celicah. Ugotovili smo, da v teh celičnih modelih DCA močno zniža izražanje izooblike PDK1. Z uporabo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo smo izmerili raven mRNA in ugotovili, da DCA zniža transkripcijo gena *PDK1* samo v celicah raka dojke. DCA zniža tudi raven transkripcijskega dejavnika HIF-1 α (s hipoksijo inducirane faktorja-1 α). Ker HIF-1 α spodbuja transkripcijo genov za PDK, je zmanjšana transkripcija *PDK1* verjetno vsaj delno posledica upada HIF-1 α . Z utišanjem gena za HIF-1 α v celicah raka dojke in raka prostate raven PDK1 močno upade, tretiranje z DCA pa jo še dodatno zniža. To nakazuje, da DCA ne vpliva le na gensko izražanje PDK1, ampak tudi na stabilnost proteina. Inhibicija delovanja proteasoma, ki je pomemben za razgradnjo celičnih proteinov, ne prepreči zmanjšanja ravni proteina PDK1 pri tretiranju z DCA, zato sklepamo, da DCA destabilizira PDK1 neodvisno od proteasoma.

V referatu bomo predstavili učinke DCA na izooblike PDK1-4 v različnih tipih celic. Poznavanje teh molekularnih mehanizmov je pomembno za razvoj novih, klinično uporabnih, farmakoloških inhibitorjev PDK.

Vloga lipoproteinov in signalne poti ERK pri zaščiti kardiomiocit pred stresom ER

Sara Tekavec

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

Mentorica: Tadeja Režen (Center za funkcijsko genomiko in bio-čipe, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani)

Stres endoplazemskega retikuluma (ER) je povezan z velikim številom bolezni, saj ima ER ključno vlogo v številnih celičnih procesih. Namen te študije je bil proučiti učinek lipoproteinov na stres ER v kardiomiocitah v pogojih stradanja. Zaščitni učinek lipoproteinov pa naj bi potekal preko signalne poti ERK.

Poskusi so bili izvedeni na kardiomiocitah (celična linija HL-1), tretiranih z HDL ali VLDL v pogojih stradanja in / ali indukcije stresa ER. Stres ER je bil sprožen z dodatkom tunikamicina. Nivo stresa ER je bil izmerjen preko izražanja označevalca stresa ER – proteina CHOP. Aktivacijo signalne poti ERK smo analizirali preko izražanja proteina ERK 1/2 in njegove fosforilirane oblike. Vključenost te signalne poti v zaščito kardiomiocit smo preverili tudi z uporabo inhibitorja signalne poti ERK.

Indukcija stresa ER po predhodnem tretiranju z lipoproteini je potrdila zaščitno vlogo HDL in nakazala tudi na zaščitno vlogo VLDL. V prisotnosti metaboličnega stresa sta tako VLDL kot HDL uspešno zmanjšala izražanje proteina CHOP. Naši rezultati kažejo na to, da oba lipoproteina aktivirata signalno pot ERK preko fosforilacije proteina ERK 1/2. Fosforilacija doseže vrh po 5-minutni inkubaciji z lipoproteini. Ob dodatku inhibitorja pa do aktivacije, kot po pričakovanjih, ne pride. Poleg tega so naši rezultati pokazali, da je bil nivo stresa ER ob dodatku inhibitorja pri VLDL višji, kar nakazuje na vlogo signalne poti ERK pri zaščiti kardiomiocit. Po drugi strani pa inhibitor ni imel vpliva na nivo stresa ER v primeru dodatka HDL, kar pomeni, da signalna pot ERK ni bila vključena v zaščitno vlogo HDL.

Rezultati so torej pokazali, da sta oba lipoproteina, HDL in VLDL, uspešno zmanjšala nivo stresa ER v kardiomiocitah. Aktivirala sta tudi signalno pot ERK, vendar je bil njen mehanizem zaščite kardiomiocit pred stresom ER različen.

Sestavljanje zaporedja za proteinski nanotrikotnik z uporabo metode Golden gate

Tadej Ulčnik, Helena Gradišar

Kemijski inštitut

mentorica: Helena Gradišar

Načrtovanje in priprava novih bionanomaterialov predstavljata pomembno področje hitro razvijajoče se nanotehnologije. Molekularno samosestavljanje, ki je tudi glavni princip organizacije v bioloških sistemih, nam omogoča pripravo novih proteinskih nanomaterialov, ki so pametni, prilagodljivi, biokompatibilni in biološko razgradljivi. Nov tip načrtovanih proteinskih nanostruktur, ki se samosestavijo iz ene polipeptidne verige, predstavlja izjemen potencial za različne aplikacije. Polipeptidna veriga je sestavljena iz več, med seboj povezanih peptidnih modulov. Takšna modularna zgradba je zelo primerna za uporabo metode kloniranja 'Golden gate', ki omogoča ligacijo več delov oziroma modulov DNA naenkrat. Uporablja restrikcijske encime tipa II in DNA ligazo T4. Restrikcijski encimi režejo DNA izven svojih prepoznavnih mest, kar omogoča rezanje več različnih zaporedij DNA z uporabo enega encima. Na ta način se pospeši in poenostavi čas priprave konstruktov, saj poteka celoten proces v eni stopnji. Z načrtovanim vstavljanjem prepoznavnih mest za restrikcijske encime pa lahko določimo tudi željen vrstni red sestavljanja modulov.

Pripravili smo zapis za protein s trikotno strukturo, ki je sestavljen iz devetih modulov, povezanih v definiranem vrstnem redu. Trikotnik ima v vsakem oglišču zelen fluorescenčni protein, kar zajema tri module. Preostalih šest modulov sestavlja stranice trikotnika, ki so sestavljene iz ovitih vijačnic. Vsaka stranica je sestavljena kot homodimerna ovita vijačnica, dolga 15 heptad aminokislin. Za tri stranice smo uporabili nekoliko spremenjena zaporedja naravnih homodimerov tropomiozina, RHO- kinaze ter korteksilina. Struktura ovite vijačnice poskrbi za večjo strukturno stabilnost proteina, hkrati pa omogoča *in vivo* samosestavljanje proteina do ustrezne geometrijske oblike. Z načrtovanjem nukleotidnega zaporedja je bilo pripravljenih devet modulov velikosti od 300 do 700 baznih parov, z vezavnima mestoma za restrikcijsko endonukleazo tipa II BsaI. Z uporabo metode Golden gate smo vseh devet modulov izrezali in v pravilnem zaporedju ligirali v končni vektor. Optimirali smo reakcijske pogoje, pri čemer smo spreminjali količino ligaze, BsaI ter ATP. Uporabnost optimirane metode se kaže v tem, da nam je okoli 4000 baznih parov dolg zapis uspelo modularno sestaviti v eni sami reakciji.

Vpliv sulfasalazina na uravnavanje presnove glukoze v skeletni mišici

Anja Vidović^{1,2}, Katarina Miš¹, Sergej Pirkmajer¹

¹ *Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani*

² *Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani*

mentor: Sergej Pirkmajer

Sladkorna bolezen tipa 2, najbolj pogosta oblika sladkorne bolezni, je eden največjih javnozdravstvenih izzivov sodobnega časa. Pri njenem zdravljenju so skeletne mišice med najpomembnejšimi tarčnimi tkivi, saj predstavljajo glavno mesto z inzulinom spodbujenega postprandialnega privzema glukoze. Sulfasalazin je protivnetno in imunosupresivno zdravilo, ki se uporablja za zdravljenje kronične vnetne črevesne bolezni in vnetnih revmatičnih bolezni. Čeprav sulfasalazin nima indikacije povezane s presnovnimi boleznimi, raziskave nakazujejo, da bi lahko moduliral delovanje signalnih poti, ki uravnavajo presnovo v skeletni mišici.

Salicilna kislina in različni salicilati imajo poleg protivnetnih učinkov tudi ugodne učinke na delovanje inzulina in presnovo glukoze v skeletnih mišicah in drugih organih. Zaradi podobnosti strukture salicilatov in sulfasalazina sklepamo, da bi sulfasalazin ali njegov presnovek 5-aminosalicilna kislina, lahko delovala na podoben način. Po drugi strani, pa nekateri podatki nakazujejo, da bi sulfasalazin lahko zaviral delovanje inzulina. Da bi osvetlili delovanje sulfasalazina na presnovo, smo preučili njegov vpliv na inzulinsko signalno pot in signalno pot rastnega dejavnika PDGF.

Učinke sulfasalazina na znotrajcelično signalizacijo smo preučili na celični liniji podganjih (L6) mioblastov, ki je eden izmed standardnih *in vitro* modelov za preučevanje molekularnih mehanizmov v skeletni mišici. Aktivnost signalnih poti smo ovrednotili z merjenjem fosforilacije signalnih proteinov z metodo gelske elektroforeze (SDS-PAGE), prenosa western in detekcijo specifičnih proteinov z metodo ojačane kemiluminiscence. Signalni poti inzulina in PDGF se prepletata na več ravneh in sta neposredno vključeni v spodbujanje privzema glukoze v skeletnomišične celice. Spremljali smo učinke sulfasalazina na aktivnost signalne poti fosfoinozimid-3-kinaze/Akt, prek katere inzulin in PDGF spodbudita translokacijo prenašalcev GLUT4 in s tem privzem glukoze v celice. Poleg tega smo spremljali aktivacijo mitogene poti Ras/Raf/MEK/ERK, ki ima pomembno vlogo pri uravnavanju celične proliferacije, in z AMP aktivirane protein-kinaze (AMPK), ki je senzor celičnega energijskega stresa in spodbuja privzem glukoze neodvisno od inzulina.

Predstavili bomo, kako lahko raziskovanje delovanja signalnih poti, ki uravnavajo presnovo glukoze v skeletni mišici, prispeva k iskanju novih zdravil za sladkorno bolezen tipa 2.

Urnvananje presnovne in endokrine funkcije skeletne mišice

Maja Zupanc^{1,2}, Urška Matkovič¹, Tomaž Marš¹, Sergej Pirkmajer¹

¹ *Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani*

² *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani*

mentor: Sergej Pirkmajer

Skeletne mišice predstavljajo okoli 40 % telesne mase in so ključne za ohranjanje presnovnega ravnovesja v telesu. Motnje v presnovnih procesih v skeletnih mišicah vodijo v presnovne bolezni, kot je sladkorna bolezen tipa 2. Presnovo uravnava inzulini in drugi hormoni, zato bi lahko pomislili, da skeletne mišice pri tem nimajo aktivne vloge. Dejstva so prav nasprotna: skeletne mišice so endokrino tkivo z močno sekrecijsko aktivnostjo in med krčenjem v kri izločajo številne peptide in proteine, ki delujejo kot hormoni in uravnava presnovo v drugih organih, kot so jetra. Takšne peptide in proteine mišičnega izvora imenujemo miokini, med katerimi je še posebej pomemben interleukin-6 (IL-6). Poleg presnovnih učinkov imajo miokini vlogo tudi pri uravnavanju imunskih procesov. Nekoliko poenostavljeno lahko rečemo, da imajo miokini, ki se izločajo med krčenjem mišic, za zdravje ugodne presnovne in protivnetne učinke in da predstavljajo enega od molekularnih mehanizmov, ki povezujejo redno telesno aktivnost s preprečevanjem kroničnih nenalezljivih bolezni, kot je sladkorna bolezen tipa 2.

Zaradi pomena, ki ga ima IL-6 pri uravnavanju presnove in imunskih procesov nas zanimajo molekularni mehanizmi, ki nadzirajo njegovo sintezo in izločanje iz mišičnih celic. Ob imunskem odzivu na bakterijsko okužbo lipopolisaharid (LPS) v mišičnih celicah aktivira receptorje TLR4, ki nato prek transkripcijskega dejavnika NF- κ B spodbudijo izločanje IL-6. Čeprav mišične celice v kulturi niso izpostavljene LPS, zelo aktivno izločajo IL-6. V okviru naše raziskave smo preučili, ali so receptorji TLR4 v mišičnih celicah spontano aktivni, kar bi lahko razložilo, zakaj se IL-6 izloča v tako visokih koncentracijah. Da bi preverili to hipotezo, smo mišične celice izpostavili LPS in/ali inhibitorjem (lipidu IVA, CLI-095 in partenolidu), ki delujejo na različnih ravneh signalne poti TLR4/NF- κ B/IL-6. Poskuse smo izvedli na človeških in podganjih mišičnih celicah. Signalne odzive celic smo spremljali z metodo odtis western, ki smo jo uporabili za analizo fosforilacije signalnih proteinov.

Predstavila bom ugotovitve svojega diplomskega dela in ideje za nadaljnje raziskave, ki bi razširile razumevanje poti TLR4/NF- κ B/IL-6 v skeletnih mišicah.

Delovanje modelnih učinkovin družine benzosultamov na kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

Ana Gabrovšek¹, Nika Tašler¹, Tjaša Klemen¹, Marko Jeran²

¹ Gimnazija in veterinarska šola, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana

² Kemijski inštitut

mentorja: Tjaša Klemen in Marko Jeran

Saharin je organska spojina, ki se pogosto uporablja kot umetno nekalorično sladilo. Njegove soli se za trg proizvajajo že več kot 80 let. Zaradi njegove velike aplikativnosti in aplikativnosti njegovih derivatov pripravljajo raziskovalci vse več aktivnih učinkovin, s katerimi bi izkazali boljše delovanje.

V raziskovalnem delu je opisan prispevek k biološki aktivnosti novega derivata saharina, imenovanega metil 4-hidroksi-1,1-dioksi-2*H*-1,2-benzotiazin-3-karbooksilat (6Sac) na kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* in predstavljena kvalitativna primerjava študirane aktivnosti z aktivnostjo natrijevega saharinata (natrijeva sol saharina).

S štetjem celic pod mikroskopom s pomočjo metilenskega modrila in kultiviabilnosti smo določali živosti modelnega organizma. Študija je pokazala, da ciklični derivat saharina z estrsko funkcionalno skupino na modelni organizem učinkuje zaviralno. Kvalitativna primerjava aktivnosti testirane učinkovine z delovanjem vsem poznanega natrijevega saharinata je v primerljivem rangu za modelni organizem *Saccharomyces cerevisiae*.

Izboljšava PET skenerja z zmožnostjo meritve časa preleta

Miha Pompe¹, Alenka Mozer¹, Rok Pestotnik²

¹ Gimnazija Vič

² Institut "Jožef Stefan"

mentorja: Alenka Mozer in Rok Pestotnik

Pozitronsko emisijsko tomografijo (PET) uporabljamo za lociranje rakavih tkiv in diagnosticiranje Alzheimerjeve bolezni. S to raziskavo smo izboljšali delovanje PET skenerja, s čimer povečamo možnosti zgodnejše diagnoze in natančnost lociranja ciljnega tkiva. Zato lahko bolnika zdravimo bolj ciljno, s čimer mu omogočamo hitrejše okrevanje in manjši poseg v njegovo telo. Celoten proces PET slikanja je manj stresen za bolnika, saj z boljšo resolucijo zmanjšamo čas slikanja. Pred PET slikanjem bolniku vbrizgajo majhno količino radioaktivnega sevalca (kontrasta), ki se v večji meri veže na ciljno tkivo in razpade na dva gama žarka. Skener zazna njuno pozicijo v dveh točkah, med katerima poteka črta, na kateri je prišlo do anihilacije. Več takšnih dogodkov uporabimo za konstruiranje 3D razporeditve kontrasta. Z novo tehniko merjenja TOF, time-of-flight, kjer merimo časovno razliko med dvema zadetkoma, lahko z manj meritvami dosežemo boljšo resolucijo. Poleg nove metode merjenja, je k boljši ločljivosti prispevala nova tehnologija, ki je ne uporabljajo v komercialnih PET skenerjih. Izdelali smo TOF PET modul, ki vsebuje PbF₂ kristale, prevlečene s črno barvo, silicijeve fotopomnoževalke in elektroniko. Razvoj zelo hitre elektronike nam je omogočil doseči časovno ločljivost 190 ps, kar je znatna izboljšava v primerjavi z najnaprednejšimi komercialnimi PET skenerji, ki dosegajo 500 ps. Cena TOF PET modula je tudi do 70 % cenejša od najboljše komercialne alternative.

Izražanje rekombinantnega proteina iz družine aktinoporinov

Nina Pust¹, Nada Udovč-Knežević¹, Marjetka Podobnik², Tomaž Švigelj²

¹ Gimnazija in veterinarska šola, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana

² Kemijski inštitut

mentorji: Nada Udovč-Knežević, Marjetka Podobnik in Tomaž Švigelj

Potencial aktinoporinov za uporabo v biotehnologiji še ni dobro raziskan, zato smo izolirali aktinoporin Halt-6, da bi na njem lahko opravili nadaljnje raziskave. Za to je bilo potrebno na začetku v bakterije *E. coli* vstaviti plazmid za Halt-6 s toplotnim šokom, bakterije vzgojiti na selektivnem gojišču (plazmid je vseboval odpornost na kanamicin) in inducirati sintezo proteina z IPTG. Celično membrano smo razbili s pomočjo sonikatorja. Protein Halt-6 ima His-tag (6 histidinov, ki se močno vežejo na nikelj), zato smo ga izolirali z nikelj afinitetno kromatografijo. S tem smo ga ločili od proteinov, ki se na nikelj niso vezali. Ko smo ugotovili, v kateri frakciji prve kromatografije je največ proteina, smo s pomočjo TEV proteaze odrezali His-tage in protein že spet dali na kolono nikelj afinitetne kromatografije, le da se sedaj na nikelj ni vezal, torej se je spral z drugim pufrom. S tem smo ga ločili od proteinov, ki so se na nikelj močno vezali. Frakcijo z največ proteina iz druge kromatografije smo nato dali še na gelsko kromatografijo, ki je protein po velikosti ločila od drugih proteinov. Po vsaki kromatografiji smo naredili hemolizo, ki nam je pokazala v kateri frakciji je največ proteina in pa gelsko elektroforezo, ki nam je pokazala, kako čista je frakcija. Izvedli smo štiri kromatografije namesto treh saj smo na drugo kromatografijo na začetku dali frakcijo, ki ni vsebovala največ Halt-6, zato smo kromatografijo ponovili s frakcijo iz prve kromatografije, ki je imela več proteina. Izvedli smo le 3 elektroforeze, saj je po prvi kromatografiji nismo izvedli. Izolacija proteina je bila uspešna. Potrdili smo dve od treh hipotez, ene pa nismo mogli ne potrditi, ne ovreči.

Karakterizacija koordinacijskih produktov reakcij bakra(II) in niklja(II) z amonijakom ter aspirinom kot ligandoma

Bernard Veršnjak¹, Samo Košir¹, Alma Kapun Dolinar¹, Marko Jeran²

¹ Gimnazija in veterinarska šola, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana

² Kemijski inštitut

mentorja: Alma Kapun Dolinar in Marko Jeran

Koordinacijske spojine ali kompleksi so v današnjem času razširjeno področje preučevanja različnih naravoslovnih disciplin (kemija, biologija, mikrobiologija, medicina, farmacija). Že od odkritja raka in tumorjev jih uporabljamo za njihovo zdravljenje. Če želimo preučevati njihovo delovanje in aktivnost, moramo poznati njihove kemijske in fizikalne lastnosti. Projektno-raziskovalno delo opisuje primer sintez koordinacijskih spojin Cu(II) in Ni(II) z amonijakom in aspirinom, kot modelnima ligandoma. Količino vezanega liganda v Cu(II)-kompleksu z amonijakom smo preučevali s klasično titracijo ter morfološki pregled in delno karakterizacijo s SEM/EDS analizo. Vpogled v notranjost koordinacijskih spojin igra pomembno vlogo pri razvoju sinteznih transformacij in tehnik karakterizacije kompleksov s točno določeno funkcijo.

LAPANJETOVI NAGRAJENCI

za leto 2018

Lapanjetova nagrada:

prof. dr. Gregor ANDERLUH

Lapanjetovo priznanje:

dr. Jelka POHAR in dr. Matej VIZOVIŠEK

Lapanjetova plaketa:

prof. dr. Marko GOLIČNIK in doc. dr. Aleš BERLEC

Pomen raziskav proteinskih nanopor

Gregor Anderluh

Odsek za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo, Kemijski inštitut

Proteinski toksini, ki tvorijo pore v celičnih membranah so ena od največjih skupin naravnih toksinov. Še posebej so pogosti pri bakterijah, kjer delujejo kot ključni virulenčni dejavniki v začetnih korakih bakterijske infekcije. Podobni proteini so prisotni tudi v človeškem imunskem sistemu, kjer sodelujejo pri odstranjevanju neželenih celic. Raziskave proteinskih nanopor so v zadnjem času vzbudile veliko pozornosti, predvsem zaradi zelo uspešne uporabe v senzorskih tehnologijah. Pristop tretje generacije določanja zaporedja molekul DNA in RNA uporablja proteinsko poro in z njim je mogoče določati zelo dolga zaporedja. V predavanju bodo predstavljene nekatere lastnosti proteinov, ki tvorijo pore, in nakazana možna uporaba v sensoriki in na nekaterih drugih področjih.

TLR9 in njegovi ligandi

Jelka Pohar, Duško Lainšček, Karolina Ivičak-Kocjan, Miša-Mojca Cajnko, Ana Kunšek, Ryutaro Fukui, Chikako Yamamoto, Kensuke Miyake, Roman Jerala, Mojca Benčina

Immunity in health and disease, INEM Institut Necker Enfants Malades, Paris

Tollu-podoben receptor 9 (TLR9) je eden od receptorjev naravne imunosti, ki prepoznavajo različne značilne molekulske motive patogenih mikroorganizmov. TLR9 prepozna enoveržne DNA molekule z nemetiliranimi CpG motivi, ki so značilni za bakterijske in virusne DNA, redko pa jih najdemo v genomski DNA evkarionov, saj so ti motivi metilirani. Vezava ligandov na ektodomeno, ki se nahaja v notranjosti endosomov, privede do dimerizacije citosolnih domen, posledične vezave adapterskih molekul ter aktivacije MAPK kinaz in transkripcijskih faktorjev, ki privedejo do izražanja citokinov in površinskih kostimulatornih molekul na/v B celicah, makrofagih in različnih tipih dendritičnih celic.

Molekule, ki najbolje aktivirajo TLR9, so od 20-30 nukleotidov dolgi oligonukleotidi (ODNi). ODNi, ki aktivirajo človeški TLR9, se razlikujejo od tistih, ki aktivirajo mišjega. Opis minimalnih motivov nam je omogočil vpogled v molekularni mehanizem prepoznavanja TLR9 ligandov. Za aktivacijo človeškega TLR9 sta potrebna dva CpG motiva, ki sta medsebojno oddaljena 6-10 nukleotidov, od katerih je prvi takoj za 5' timidinom. Za aktivacijo mišjega receptorja je zadosten le en CpG motiv, ki je za 4 do 6 nukleotidov oddaljen od 5' konca.

ODNi, ki se uporabljajo za študij aktivacije TLR9 in kot kandidati za adjuvanse, imajo namesto fosfatne večinoma fosforotioatno hrbtenico, zaradi katere so neobčutljivi za nukleaze in tako obstojnejši. Kljub temu pa vezavno mesto preferenčno prepozna fosfodiestersko hrbtenico v CpG motivu saj je odziv na oligo, ki imajo med sicer fosforotioatno hrbtenico CpG motive povezane s fosfodiesterskimi vezmi, močnejši. Naši rezultati opisujejo funkcionalni pomen fosfodiesterskih vezi znotraj CpG motivov, kar bi bilo lahko pomembno pri načrtovanju novih imunostimulatornih TLR9 agonistov.

Opisali smo tudi pomen kratkih ODN-ov, dolgih od 2-5 nukleotidov, ki sami po sebi ne sprožijo odziva, v kombinaciji s stimulatornimi ODNi pa ojačajo aktivacijo TLR9. Tudi kratki ODNi morajo vsebovati CpG motiv, kar nakazuje in je bilo kasneje tudi pokazano, na dve vezavni mesti za CpG motive v ektodomeni receptorja. Kratki ODNi so povečali odziv na molekule, ki same po sebi sprožijo slabšo aktivacijo med drugimi tudi na genomsko DNA. Protitelesa proti DNA in aktivacija receptorjev, ki prepoznavajo nukleinske kisline, so značilni za nekatera avtoimunska obolenja, kot sta revmatoidni artritis in sistemski eritematozni lupus. Kratki razgradni produkti genomske ali mikrobne DNA bi lahko imeli vlogo pri nastanku in poteku teh bolezni.

Kratki oligonukleotidi so povečali tudi od TLR9 odvisen imunski odziv v miših. V serumu smo opazili povečanje izločanja citokinov IL-6 in IL-12 in povečanje frekvence MHCII+ CD86+ ter Gr1+ pozitivnih celic v peritonealni votlini.

Zanimanje za imunoterapijo avtoimunskih obolenj me je pripeljalo na inštitut INEM v Parizu, kjer v sklopu podoktorskega projekta s skupino raziskujemo potencial T regulatornih celic (Treg) za adoptivno imunoterapijo multiple skleroze. Na mišjem modelu eksperimentalnega avtoimunskega encefalomielitisa želimo ugotoviti, katere molekule označujejo visoko protektivne Treg celice, torej celice, ki na svoji površini izražajo T celične receptorje z visoko afiniteto do peptidov mielinskih ovojníc.

Cisteinski katepsini: Od profiliranja specifičnosti in identifikacije substratov do razvoja selektivnih substratnih sond in sistemov za dostavo zdravil

Matej Vizovišek

Institut "Jožef Stefan"

Cisteinski katepsini so pomembna skupina proteaz iz papainove družine, ki imajo številne vloge tako v fizioloških kot tudi v patoloških procesih, kjer je njihova aktivnost pogosto močno povišana (npr. rak, vnetje). Katepsini pridobivajo na veljavi v kliniki kot diagnostični markerji in kot tarče za razvoj novih inhibitorjev, za kar je bistveno poznavanje njihovih substratov in substratnih preferenc. V ta namen smo razvili proteomske pristope za profiliranje substratne specifičnosti z uporabo kemijskega označevanja¹ ali brez uporabe označevanja² in na ta način detektirali majhne a značilne razlike med katepsini K, L in S. Za sledenje aktivnosti cisteinskih katepsinov in njihovo zgodnjo detekcijo smo pripravili selektivne substrate, pri čemer smo kot izhodišče uporabili selektivne inhibitorje, ki smo jih s pomočjo reverznega pristopa pretvorili v selektivne substrate³. Te substrate smo uspešno uporabili za zgodnje odkrivanje tumorjev pri miših in pokazali, da lahko lipidacija bistveno izboljša lastnosti substratnih sond in retenzijo reporterskih skupin na tarčnem mestu³. Za razumevanje vloge cisteinskih katepsinov pri raku pa je pomembno poznavanje njihovih fizioloških substratov, še posebej v tumorskem mikrokoolju, kamor se izločajo iz makrofagov in tumorskih celic. Zato smo izvedli proteomsko identifikacijo zunajceličnih substratov katepsinov K, L in S in pokazali, da so učinkovite šedaze, ki imajo potencialno pomembne vloge v procesu razvoja in napredovanja raka⁴. Spoznanja o lokalizaciji in izražanju cisteinskih katepsinov pri raku smo uporabili tudi za razvoj dostavnega sistema z uporabo liposomov, ki imajo na površini inhibitor katepsina B, kar bistveno izboljša učinkovitost dostave kemoterapevtikov v tumorje⁵. Najnovejša dognanja o proteazah, različni proteomski pristopi ter orodja kemijske biologije odpirajo številne možnosti za razvoj novih diagnostičnih in terapevtskih aplikacij⁶.

¹ Vizovišek et al., *Proteomics*. 2015, 15(14):2479-90.

² Vidmar et al., *EMBO J.* 2017, 36(16):2455-2465.

³ Hu et al., *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014, 53(29):7669-73.

⁴ Sobotič et al., *Mol Cell Proteomics*. 2015, 14(8):2213-28.

⁵ Mikhaylov et al., *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014, 53(38):10077-81.

⁶ Vizovišek et al., *Trends Biochem Sci.* 2018, pii: S0968-0004(18)30147-6.