

BIOmolekularec.si

Dan biomolekularnih znanosti



SLOVENSKO
BIOKEMIJSKO
DRUŠTVO

Zbornik povzetkov

Ljubljana, 26. september 2024

Katalogni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani
[COBISS.SI-ID 208587267](#)
ISBN 978-961-95941-2-4 (PDF)

DAN BIOMOLEKULARNIH ZNANOSTI
BIOMolekularec 2024

Organizator:

Slovensko biokemijsko društvo

Kraj prireditve:

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana

Uredniki:

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

Računalniško oblikovanje:

Blaž Cigić, Mihaela Skrt

Založnik:

Slovensko biokemijsko društvo

Spletni naslov:

http://biomolekularec.splet.arnes.si/files/2024/09/BIOMolekularec_2024-zbornik.pdf

Programski in organizacijski odbor:

Blaž Cigić (predsednik)

Aljoša Bavec

Bojan Doljak

Miha Pavšič

Mihaela Skrt

Ajda Taler-Verčič

Ljubljana, 2024

PROGRAM SREČANJA

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

Sekcija 1

Vodja sekcije: Aljoša Bavec

-
- 8.30–8.45 Martin ŠPENDL, UL Fakulteta za računalništvo in Informatiko
Temeljni modeli v medicini
- 8.45–8.55 Živa MESARIČ, UL Medicinska fakulteta
Zakaj se encimom vedno spleča izmeriti kinetiko: Paraoksonaza 1 in njegovi substrati
- 8.55–9.05 Dan FAGANELI, UL Medicinska fakulteta
Vpliv ketamina na viabilnost podganjih astrocitov
- 9.05–9.15 Filip DUGONIK, II. gimnazija Maribor
Povezava med zaznanim stresom, depresivnostjo, anksioznostjo in koncentracijo kortizola v laseh mladostnikov
- 9.15–9.25 Kaja BEDERNJAK, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Polisaharidni kompoziti kot novi materiali za kostne implantate
- 9.25–9.45 ODMOR

Sekcija 2

Vodja sekcije: Miha Pavšič

-
- 9.45–10.00 Duško LAINŠČEK, Kemijski inštitut
Razvoj genske terapije za zdravljenje sindroma CTNNB1
- 10.00–10.10 Ana BABNIK, Kemijski inštitut
Načrtovanje sintezne vnetne poti receptorja STING z uporabo oligomerizacijskih domen
- 10.10–10.20 Iva MATIČ, UL Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
Ovrednotenje fosforilacije RNA-vezavnih proteinov v nevrosferoidih
- 10.20–10.30 Luka BONIN, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana
Antimikrobno delovanje izolatov naravnih učinkovin vrtnega ognjiča (*Calendula officinalis*) in njihov potencial pri zaviranju tvorbe biofilma bakterij *Escherichia coli*
- 10.30–10.40 Julia KRESSE, II. gimnazija Maribor
Nad biofilme bakterije *Pseudomonas aeruginosa* z njenimi naravnimi sovražniki-bakteriofagi
- 10.40–11.00 ODMOR

Sekcija 3

Vodja sekcije: Mihaela Skrt

- 11.00–11.15 Neža ČADEŽ, *UL Biotehniška fakulteta*
Kvasovke so mojstri vseh mojstrov: Z genomiko dokazali izjemno evolucijsko prilagodljivost
- 11.15–11.25 Sergej PRAČEK, *UL Biotehniška fakulteta*
Glivni lektini kot bioinsekticidi proti invazivnim žuželčjim škodljivcem: določanje molekularnega mehanizma
- 11.25–11.35 Aljaž NAGODE, *Nacionalni inštitut za biologijo*
Preučevanje tristrane interakcije med rastlino krompirja, endofitsko bakterijo *Bacillus subtilis* in endofitsko glivo *Fusarium oxysporum*
- 11.35–11.45 Vid GRUŠOVNIK, Lenart FRANKOVIČ, *Gimnazija - Šolski center Velenje*
Vključevanje alelopatije v aktualne okoljske izzive
- 11.45–11.55 Živa JUVAN, *Biotehniški center Naklo*
Protimikrobni učinki kefirja na rast bakterije *Staphylococcus epidermis*
- 11.55–12.15 ODMOR

Okrogla miza: Hrana prihodnosti?

Moderator omizja: Blaž Cigić

- 12.15–13.05 Kristina GRUDEN, *Nacionalni inštitut za biologijo*
Katja KRIŽMAN, *Tech4Meat*
Blaž LIKOZAR, *Kemijski inštitut*
Barbka JERŠEK, *UL Biotehniška fakulteta*
- 13.05–14.05 ODMOR ZA KOSILO

Sekcija 4

Vodja sekcije: Ajda Taler-Verčič

- 14.05–14.20 Tine TESOVIK, *Univerzitetni klinični center Ljubljana*
Raziskovanje človeškega genoma: od diagnostičnega orodja do novih odkritij
- 14.20–14.30 Tina LOGONDER, *UL Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo*
In Vitro karakterizacija proteinskega kompleksa FHL2- β -catenin
- 14.30–14.40 Erazem BAHČIČ, *UL Medicinska fakulteta*
Določanje novih biokemičnih označevalcev in genetskih polimorfizmov, povezanih s Fabryjevo nefropatijo
- 14.40–14.50 Neža KUNIČ, Ema Železnik, *Gimnazija Bežigrad*
Vpliv ivermektina na vid opráševalcev
- 14.50–15.00 Maks Leon ROGELJ, *Gimnazija Vič*
Določanje optimalnih pogojev za rast alg rodu *Dunaliella* iz Sečoveljskih solin
- 15.00–15.20 ODMOR

Sekcija 5

Vodja sekcije: Bojan Doljak

- 15.20–15.35 Anja PIŠLAR, UL Fakulteta za farmacijo
Vloga γ -enolaze v centralnem živčnem sistemu: več kot le glikolitični encim
- 15.35–15.45 Urban KOŠAK, UL Fakulteta za farmacijo
Razvoj nove učinkovine za lajšanje simptomov kognitivne motnje psov
- 15.45–15.55 Selena HORVAT, UL Fakulteta za farmacijo
Vloga γ -enolaze in njena regulacija s katepsinom X: od razvoja do degeneracije celic centralnega živčnega sistema
- 15.55–16.05 Neja ŠTAMPAR, Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer
Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje
- 16.05–16.15 Nejc MOŠKOTELEC, Gimnazija Kranj
Učinek zaužitja kofeina na rezultate VO2 max, izmerjene pri športnikih in nešportnikih
- 16.15–17.30 ODMOR

Skupščina Slovenskega biokemijskega društva

- od 17.30 **Podelitev Lapanjetovih nagrad**
Lapanjetova plaketa: doc. dr. Ajda TALER-VERČIČ
Lapanjetovo priznanje: dr. Duško LAINŠČEK (predavanje)
Lapanjetovo priznanje mladim: dr. Anastasija PANEVSKA (predavanje)
Lapanjetovo priznanje mladim: doc. dr. Tjaša LUKAN (predavanje)

Kazalo povzetkov

Povzetki predavanj

Martin ŠPENDL, Tomaž CURK, Blaž ZUPAN	
Temeljni modeli v medicini	10
Živa MESARIČ, Boštjan PETRIČ, Tadeja PINTAR, Aljoša BAVEC	
Zakaj se encimom vedno spleča izmeriti kinetiko: Paraoksozona 1 in njegovi substrati	11
Dan FAGANELI, Metoda LIPNIK-ŠTANGELJ	
Vpliv ketamina na viabilnost podganjih astrocitov	12
Filip DUGONIK, Jure ŠKRABAN, Boštjan VIHAR	
Povezava med zaznamim stresom, depresivnostjo, anksioznostjo in koncentracijo kortizola v laseh mladostnikov	13
Katja BEDERNJAK, Mateja GODEC, Gabrijela HORVAT	
Polisaharidni kompoziti kot novi materiali za kostne implantate	14
Duško LAINŠČEK	
Razvoj genske terapije za zdravljenje sindroma CTNNB1	15
Ana BABNIK, Elvira BORŠIČ, Iva HAFNER BRATKOVIČ	
Načrtovanje sintezne vnetne poti receptorja STING z uporabo oligomerizacijskih domen	16
Iva MATIČ, Helena MOTALN, Boris ROGELJ	
Ovrednotenje fosforilacije RNA-vezavnih proteinov v nevrosferoidih	17
Luka BONIN, Jan HAFNER KOROŠEC, Tine OBLAK, Martina ODER, Marko JERAN	
Antimikrobno delovanje izolatov naravnih učinkovin vrtnega ognjiča (<i>Calendula officinalis</i>) in njihov potencial pri zaviranju tvorbe biofilma bakterij <i>Escherichia coli</i>	18
Julia KRESE, Jure ŠKRABAN, Sandra JANEŽIČ, Urša MIKLAVČIČ	
Nad biofilme bakterije <i>Pseudomonas aeruginosa</i> z njenimi naravnimi sovražniki-bakteriofagi	19
Neža ČADEŽ	
Kvasovke so mojstri vseh mojstrov: Z genomiko dokazali izjemno evolucijsko prilagodljivost	20
Sergej PRAČEK, Primož ŽIGON, Tjaša PETERNEL, Tadeja TUMPEJ, Dušan TURK, Jaka RAZINGER, Jerica SABOTIČ	
Glivni lektini kot bioinsekticidi proti invazivnim žuželčjim škodljivcem: določanje molekularnega mehanizma	21
Aljaž NAGODE, Anže VOZELJ, Tjaša LUKAN, Kristina GRUDEN	
Preučevanje tristrane interakcije med rastlino krompirja, endofitsko bakterijo <i>Bacillus subtilis</i> in endofitsko glivo <i>Fusarium oxysporum</i>	22
Vid GRUŠOVNIK, Lenart FRANKOVIČ, Irena ŠTIMAC, Sandra POTUŠEK	
Vključevanje alelopatije v aktualne okoljske izzive	23
Živa JUVAN, Ana MARKIČ, Maj ZUPAN, Tadeja POLAJNAR	
Protimikrobni učinki kefirja na rast bakterije <i>Staphylococcus epidermis</i>	24
Tine TESOVNIK	
Raziskovanje človeškega genoma: od diagnostičnega orodja do novih odkritij	25
Tina LOGONDER, Aljaž GABER	
In Vitro karakterizacija proteinskega kompleksa FHL2-β-catenin	26
Erazem BAHČIČ, Tina LEVSTEK, Bojan VUJKOVAC, Katarina TREBUŠAK PODKRAJŠEK	
Določanje novih biokemičnih označevalcev in genetskih polimorfizmov, povezanih s Fabryjevo nefropatijo	27
Neža KUNIČ, Ema ŽELEZNIK, Gregor KRIŽ, Gregor BELUŠIČ	
Vpliv ivermektina na vid oprasevalcev	28
Maks Leon ROGELJ, Helena POTOČNIK VIČAR, Petra TAVČAR VERDEV	
Določanje optimalnih pogojev za rast alg rodu <i>Dunaliella</i> iz Sečoveljskih solin	29

Anja PIŠLAR

Vloga γ -enolaze v centralnem živčnem sistemu: več kot le glikolitični encim..... 30

Urban KOŠAK, Damijan KNEZ, Anja PIŠLAR, Janko KOS, Simon ŽAKELJ, Jurij TRONTELJ, Odon PLANINŠEK, Ilija GERMAN ILIĆ, Jure STOJAN, Marko ŽIVIN, Kinga SAŁAT, Florian NACHON, Xavier BRAZZOLOTT, Maja ZAKOŠEK PIPAN, Gregor MAJDIČ, Stanislav GOBEC

Razvoj nove učinkovine za lajšanje simptomov kognitivne motnje psov..... 31

Selena HORVAT, Anja PIŠLAR

Vloga γ -enolaze in njena regulacija s katepsinom X: od razvoja do degeneracije celic centralnega živčnega sistema 33

Neja ŠTAMPAR, Marija MEZNARIČ, Martina ŠTAMPAR

Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanici ter njihov vpliv na zdravje 34

Nejc MOŠKOTELEC, Petra KOŠIR

Učinek zaužitja kofeina na rezultate VO2 max, izmerjene pri športnikih in nešportnikih 35

Ostali povzetki

Ela BIZJAK, Gregor GUNČAR

Učinkovitost samoizrežujočega se označevalca CPD iz bakterije *Vibrio cholerae* 37

Zarja DOBERŠEK, Živa FLEGO, Marija Nika LOVŠIN

Vpliv utišanja A3B in A3A na lokalizacijo ciklina D1 v keratinocitih 38

Luka Irenej PEČAN, Aleš KUCHAR, Ema Luna KARARA GERŠAK, Alenka LEVART, Marko JERAN

Insektna biokonverzija kot rešitev za trajnostni prehranski sistem v krožnem biogospodarstvu .. 39

Martina KOGOVSĚEK, Patricija LAP, Gašper TAVČAR, Maja PONIKVAR-SVET, Marko JERAN

Izražanje proteaze CEP2 iz zelene alge *Chlamydomonas reinhardtii* v bakterijskih celicah *Escherichia coli* in njena aktivacija 40

Nina OVEN, Pamela MOUSSA, Cristina GALIANO

Mehanizem delovanja N-acetil-L- cisteina na rast bakterij in tvorbo biofilmov 41

Sara PETROVČIČ, Lana LOPERT, Katja MARINKO, Gašper TAVČAR, Mateja ERDANI KREFT, Tine TESOVNIK, Marko JERAN

Na poti k uporabi fluoriranih lipofilnih ksantenskih fluorescenčnih učinkovin za označevanje dednega materiala v medicinski diagnostiki 42

Nik PODKRAJŠEK, Nika BREZNIK, Andreja REHBERGER LIKOZAR, Miran ŠEBEŠTJEN, Tina LEVSTEK

Vpliv genetske variabilnosti in koncentracije vnetnih dejavnikov na vrednosti PCSK9 pri bolnikih z zgodnjim miokardnim infarktom 43

Vesna POTOČNIK, Neža BOTICA, Katarina ROGELJ, Ana Karin KOZJEK

Vpliv prehranjevalnih navad športnic na pojavnost sindroma REDS 44

Petja PREMRL, Petra TAVČAR VERDEV, Marko DOLINAR

Identifikacija patogenih gliv, ki povzročajo zgodnje odpadanje plodov oljke, na osnovi črtna kode DNA 45

Gaja STARC, Marko NOVINEC

Zaviranje homodimerizacije proteaze Mpro in bakterijske histidin kinaze EnvZ z malomolekulskimi inhibitorji v bakteriji *Escherichia coli* 46

Milena STOJKOVSKA DOCEVSKA, Marko NOVINEC

Identifikacija človeških citoplazemskih proteinov, ki interagirajo z dvema derivatoma pirazola .. 47

Pia TROŠT, Petra TAVČAR VERDEV, Marko DOLINAR

Optimizacija testov biološke aktivnosti encimov, zanimivih za kozmetično industrijo 48

Matevž ŽULA, Martin ŠIMON, Nicholas M. MORTON, Simon HORVAT, Tanja KUNEJ

Analiza genetske variabilnosti na mestih izrezovanja intronov pri selekcioniranih linijah miši za debelost in vitkost 49

Maša BRATKOVIČ, Zoja JESIH, Alenka MOZER, Taja ŽELEZNIK RAMUTA

Razvoj inovativnih biosenzorjev za detekcijo virusne aktivnosti z uporabo orodij sintezne biologije50

Živa KOČMAN, Anita KOTAR, Alenka MOZER

Vloga sekundarnih struktur DNK vijačnice pri zdravljenju genetskega raka 51

Lapanjetovi nagrajenci za leto 2024

Duško LAINŠČEK (*Lapanjetovo priznanje*)

Izboljšava orodij za urejanje genoma za razvoj naprednih metod genske terapije 53

Anastasija PANEVSKA (*Lapanjetovo priznanje mladim*)

Protein membrane interactions in nature and synthetic cells54

Tjaša LUKAN (*Lapanjetovo priznanje mladim*)

Nove tehnologije za preučevanje molekularnih mehanizmov, pomembnih za odpornost rastlin na stres..... 55

POVZETKI PREDAVANJ

Temeljni modeli v medicini

Martin Špendl, Tomaž Curk, Blaž Zupan

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Računalništvo in Informatiko

Postavljanje hipotez, eksperimentiranje in zbiranje podatkov o bioloških sistemih so ključni koraki raziskav v medicini. Na podlagi podatkov lahko zgradimo preproste matematične modele sistema, ki pomagajo napovedati obnašanje izven mej eksperimentov. S takim pristopom lahko na primer izmerimo aktivnost encima pri različnih koncentracijah substrata in izračunamo vrednost polovice maksimalne hitrosti reakcije z uporabo Michaelis-Mentenine enačbe.

Učenje domenskih modelov na manjšem naboru podatkov se je z dostopnostjo računske moči v zadnjih letih prelevilo v učenje temeljnih modelov na velikih zbirkah podatkov. Veliki jezikovni modeli kot so GPT 3.5 so začeli val temeljnih modelov na področju naravnega jezika, za njimi pa so sledili modeli z uporabo slik in zvočnih posnetkov. Prednost temeljnih modelov je v njihovi širini poznavanja domene in posploševanju znanja iz podatkov. Za uporabo v specifični domeni pa omogočajo dodatno učenje na tarčni zbirki podatkov, kot npr. člankih na področju biokemije ali medinskih zapisih zdravnikov.

Temeljni modeli so tudi v biologiji preseglili rezultate predhodnih modelov na področju napovedovanja strukture proteinov, izražanja genov in generiranja teksta. Na področju onkologije in zdravljenja raka so ključni podatki o izraženosti genov, saj so odraz dejanskega stanja tumorskega tkiva. Napredne tehnologije omogočajo meritev izraženosti na nivoju posameznih celic (angl., single-cell RNA-Seq). Temeljni modeli posameznih celic omogočajo virtualno predstavitev celice in opazovanje odziva le-te na perturbacije v izraženosti posameznega gena, na primer tarče zdravila. Kljub prednostim takšnih meritev, pa se v redni praksi uporabljajo meritve izraženosti genov celotnih tkiv, kar zamegli doprinos posameznih tipov celic. Naše raziskave se usmerjajo v razvoj temeljnega modela na podlagi izraženosti genov celotnih tkiv (angl., bulk RNA-Seq), s čim želimo stopiti korak bližje vsakdanji uporabi modelov v praksi.

Zakaj se encimom vedno splača izmeriti kinetiko: Paraoksonaza 1 in njegovi substrati

Živa Mesarič¹, Boštjan Petrič¹, Tadeja Pintar², Aljoša Bavec¹

¹ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko

² Univerzitetni klinični center Ljubljana

Mentorja: Aljoša Bavec, Tadeja Pintar

Paraoksonaza 1 (PON1) je encim, prisoten v človeški krvi, ki ima antioksidativno vlogo in se raziskuje v povezavi z boleznimi pri človeku. Korelacije med parametri encimske aktivnosti (K_m , V_{max} in začetna hitrost) pri treh značilnih substratih za PON1 (DHC, PA in PX) so v splošnem slabo raziskane. Ker se v raziskavah pogosto opravlja meritve samo z enim substratom, lahko pride do zavajajočih rezultatov pri primerjavi rezultatov različnih raziskav. Da bi razjasnili odnose med temi substrati, smo na 69 vzorcih seruma pacientov bariatricne kirurgije spektrofotometrično izmerili krivulje poteka reakcije po času z vsakim od treh substratov. Iz vsake krivulje smo določili začetno hitrost in (za DHC in PA) s programom iFIT kinetična parametra V_{max} in K_m . Rezultate smo s programom SPSS primerjali med sabo. Ugotovili smo, da je korelacija med hitrostima reakcij s substratoma DHC in PA močna (Pearsonov CC = 0,673, $p = 2,45 \times 10^{-10}$), hkrati pa je vsaka od njiju povsem nepovezana s hitrostjo reakcije s PX (PX in DHC: Pearsonov CC = -0,064, $p = 0,641$). Kot prvi smo primerjali izmerjene K_m z začetnimi hitrostmi vseh substratov in ugotovili, da hitrost reakcije PX dobro korelira s K_m za DHC in PA (PX in PA: Pearsonov CC = -0,645, $p = 8,09 \times 10^{-8}$), kljub temu, da med obema hitrostima reakcij ni korelacije. To pomeni, da lahko iz izmerjene kinetike enega substrata sklepamo na aktivnost drugega, kar samo iz začetnih hitrosti ne bi bilo mogoče. Študije pogosto poročajo, da ena od encimskih aktivnosti korelira z nekim kliničnim parametrom, druga pa ne; merjenje kinetike bi raziskovalcem omogočilo boljši uvid v odnos med aktivnostjo PON1 in klinično sliko.

Vpliv ketamina na viabilnost podganjih astrocitov

Dan Faganeli, Metoda Lipnik-Štangelj

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo

Mentorica: Metoda Lipnik-Štangelj

Ketamin je učinkovina, pogosto uporabljena za indukcijo in vzdrževanje anestezije pri dnevnih kirurških posegih. Uporaba ketamina, tako kot ostalih anestetikov, je pri otrocih, mlajših od treh let, omejena. Vzrok je v številnih poročilih o celični toksičnosti nekaterih anestetikov, opaženi v testnih živalskih modelih, ter nevrodegeneraciji, opaženi v klinični praksi. Podatkov o toksičnem vplivu anestetikov na možgane v razvoju je malo in mehanizem, ki bi poročano toksičnost pojasnjeval, še ni dokončno pojasnjen. Sočasno se astrociti izkazujejo kot ključne celice, ki vzdržujejo možgansko homeostazo, kar pomeni, da vpliv na viabilnost astrocitov vpliva na funkcijo celotnega centralnega živčnega sistema. V tej študiji smo zato želeli *in vitro* preveriti, kako ketamin, kot splošni anestetik, vpliva na viabilnost astrocitov novorojenih podgan.

Kot osnovo eksperimentalnega modela smo uporabili primarno celično kulturo astrocitov, dobljenih iz možganske skorje novorojenih podgan. Celice smo za 24 ur izpostavili naraščajočim koncentracijam ketamina, vključno s koncentracijami, tipično prisotnimi pri anesteziji. Viabilnost smo nato določili s pretočno citometrijo z merjenjem apoptoze, nekroptoze in nekroze, kot različne vrste celične smrti.

Rezultati so pokazali, da koncentracije ketamina vse do 5 mM niso vplivale na viabilnost astrocitov. Citotoksičnost, vidno kot povečanje deleža mrtvih celic, smo opazili šele pri koncentracijah, 100-krat višjih od tistih, ki so prisotne v plazmi tekom anestezije (5 mM - 3,8-kratno povečanje v primerjavi s kontrolo, $p < 0,0001$). Večina celic je pri tem umrla apoptotične smrti (5 mM – 56%). Delež nekroptotičnih celic se z višanjem koncentracije ketamina ni spreminjal.

Zaključimo lahko, da ketamin v *in vitro* pogojih ne zmanjšuje viabilnosti astrocitov pri tipičnih plazemskih koncentracijah med anestezijo. Njegova toksičnost je odvisna od odmerka in opažena šele pri koncentracijah, ki so več kot 100-krat višje od terapevtskih. Kljub temu, da so astrociti relativno odporni na apoptozo, ketamin v visokih koncentracijah proži apoptotično in ne nekroptotične oblike regulirane celične smrti.

Povezava med zaznanim stresom, depresivnostjo, anksioznostjo in koncentracijo kortizola v lasih mladostnikov

Filip Dugonik^{1,2}, Jure Škraban¹, Boštjan Vihar²

¹ II. gimnazija Maribor

² Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta

Mentorja: Jure Škraban, Boštjan Vihar

V raziskovalni nalogi smo merili povezavo med zaznanim stresom in kortizolom v lasih, depresivnostjo, anksioznostjo, spolom, indeksom telesne mase, hujšimi stresnimi dogodki ter odnosom do stresa. Rezultati Pearsonove korelacije niso pokazali signifikantne povezave med kortizolom v lasih in zaznanim stresom. Udeleženci z visoko stopnjo zaznanega stresa so v povprečju dosegli višje rezultate depresivnosti in anksioznosti kot udeleženci s srednjo ali nizko stopnjo zaznanega stresa. Povezanost zaznanega stresa z depresivnostjo in anksioznostjo smo dodatno potrdili z rezultati korelacije, ki so pokazali veliko pozitivno korelacijo med stresom in depresivnostjo ter med stresom in anksioznostjo. Raziskava je pokazala majhno negativno korelacijo med stresom in indeksom telesne mase. Med zaznanim stresom in hujšimi stresnimi dogodki nismo zaznali signifikantnih povezav. Udeleženci z različnim odnosom do stresa so se signifikantno razlikovali glede zaznane ravni stresa, pri čemer so imeli udeleženci z negativnim odnosom do stresa višjo raven le-tega. Moški in ženske so se razlikovali po stopnji zaznanega stresa, pri čemer so ženske zaznavale več stresa kot moški. Rezultati raziskovalne naloge prispevajo k izboljšanju metode meritve koncentracije kortizola v lasih in k boljšemu razumevanju povezav med zaznanim stresom in depresivnostjo, anksioznostjo ter koncentracijo kortizola v lasih.

Polisaharidni kompoziti kot novi materiali za kostne implantate

Katja Bedernjak^{1,2}, Mateja Godec¹, Gabrijela Horvat³

¹ Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

² Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

³ Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Mentorici: Mateja Godec, Gabrijela Horvat

Zaradi staranja prebivalstva in povečanega števila poškodb, ki so večinoma posledica športne aktivnosti in avtomobilskih nesreč, se je v zadnjih letih potreba po ortopedskih implantatih zelo povečala. Danes se za kostne implantate večinoma uporablja kovina, keramika in steklo, a so ti materiali lahko slabše vzdržljivi, telo pa jih lahko tudi zavrne. V raziskavi smo pripravili kompozitne materiale iz polimlečne kisline in etil celuloze po dveh različnih metodah sušenja, ki bi lahko služili kot potencialni biorazgradljivi kostni implantati, s katerimi bi se takim nevšečnostim lahko izognili. Kserogeli se zaradi načina sušenja običajno skrčijo, njihova struktura pa je drugačna od strukture aerogela. Preverili smo razpad teh biomaterialov v simulirani prebavni tekočini in ugotovili, da se materiali v simulirani prebavni tekočini obnašajo podobno, ne glede na metodo sušenja. Pri pripravljenih kompozitih smo s pomočjo karakterizacije materialov, ki je potekala na vrstičnem elektronskem mikroskopu, posneli fotografije, s katerih smo lahko razbrali, da so nastali kompoziti EC-PLA visoko porozni materiali z velikimi porami do 10 μm . Hkrati imajo tudi manjše pore v velikosti nekaj nm, ki omogočajo, da v materiale vežemo aktivno učinkovino, ki se iz materiala kontrolirano sprošča. V materiale smo vezali modelno učinkovino indometacin, da bi preverili njeno sproščanje iz materiala. Sproščanje indometacina smo izvedli v treh ponovitvah na USP II-napravi. Ugotovili smo, da se indometacin uspešno vgradi v material ter se sprošča daljše časovno obdobje. Potrebne so še raziskave materialov na in-vitro celičnih linijah, vendar dobljeni rezultati kažejo na velik potencial takih materialov za kostne implantate.

Razvoj genske terapije za zdravljenje sindroma CTNNB1

Duško Lainšček^{1,2,3}, Špela Miroševič^{4,5}, Damjan Osredkar^{6,7}, Ana Gonzalez Hernandez^{4,8}, Roman Jerala^{1,2,3}, Andrea Perez-Iturralde⁹, Leszek Lisowski⁹

¹ *Kemijski inštitut, Odsek za sintezno biologijo in imunologijo*

² *EN-FIST Center odličnosti*

³ *Center za tehnologije genske in celične terapije*

⁴ *CTNNB1 Fundacija*

⁵ *Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za družinsko medicino*

⁶ *UKC Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični oddelek za otroško, mladostniško in razvojno nevrologijo*

⁷ *Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta*

⁸ *Asociación CTNNB1 España, Basauri*

⁹ *University of Sydney and Sydney Children's Hospital Network, Faculty of Medicine and Health, Children's Medical Research Institute, Gene Therapy Research Unit*

Sindrom CTNNB1 je redka nevrorazvojna motnja, ki jo povzročajo mutacije v genu CTNNB1, kar vodi v zmanjšano raven in delovanje beta-katenina, proteina, ki je ključnega pomena za razvoj nevronov in tvorbo sinaps. Sindrom CTNNB1 se kaže v motoričnem in intelektualnem deficitu otrok, lahko se pojavljajo tudi težave z vidom, srčne težave, epilepsije ipd. Pojavnost bolezni je 1:50.000, trenutno je diagnosticiranih približno 500 otrok po celotnem svetu, za katere še vedno ni zdravila.

Fundacija CTNNB1, ki se zavzema za izboljšanje življenja obolelih otrok in njihovih družin, je prevzela vodilno vlogo pri spodbujanju raziskovalnega sodelovanja, ozaveščanju in zagotavljanju sredstev za pospeševanje razvoja možnih terapij. Aktivno zbiranje finančnih sredstev je omogočilo razvoj celičnih in živalskih modelov sindroma CTNNB1 ter raziskovanje različnih terapevtskih možnosti, vključno z gensko nadomestno terapijo.

Naša raziskovalna skupina je razvila šest kandidatov za gensko terapijo, ki temelji na osnovi uporabe modificiranih virusnih vektorjev AAV9 z namenom dostave celotnega človeškega gena CTNNB1. Sprva smo kandidate testirali v možganskih organoidih bolnika s sindromom CTNNB1 ter njegovih induciranih pluripotentnih zarodnih celicah, da bi ocenili sposobnost obnovitve izražanja proteina beta-katenina. Najbolj obetaven kandidat je nato prešel v in vivo preizkušanje učinkovitosti na mišjem modelu (Ctnnb1+/-), kjer smo AAV9-CTNNB1 injicirali cerebro-intraventricularno. Vedenjski testi, določitev ravni izražanja gena CTNNB1 ter proteina beta-katenina v različnih delih možganov so dokazali pozitivno učinkovitost terapije. Prav tako smo izvedli dolgotrajno ne-GLP toksikološko študijo, pri kateri nismo dokazali nobenih negativnih učinkov terapije.

Genska terapija z AAV9-CTNNB1 je pokazala obetavne rezultate v modelih in vitro in in vivo z obnovitvijo izražanja beta-katenina in izboljšanjem fenotipov bolezni z ugodnim varnostnim profilom. Omenjeni rezultati so utrli pot za naslednjo fazo razvoja. Trenutno se vektor AAV9-CTNNB1 izdeluje pod pogoji GMP za namene toksikološke študije pod smernicami GLP, čemur bo sledilo klinično preizkušanje na pacientih, če bodo predhodno potrjeni vsi varnostni vidiki terapije.

Razvoj genske terapije za zdravljenje sindroma CTNNB1T je primer moči pobud, osredotočenih na pacienta in skupnih raziskav za napredek potencialnih zdravil za redke genetske bolezni.

Načrtovanje sintezne vnetne poti receptorja STING z uporabo oligomerizacijskih domen

Ana Babnik^{1,2}, Elvira Boršič¹, Vera Župunski², Iva Hafner Bratkovič¹

¹ *Kemijski inštitut, Ljubljana*

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

Mentorice: Elvira Boršič, Vera Župunski, Iva Hafner Bratkovič

Stimulator interferonskih genov (STING) je adaptorski protein, sestavljen iz N-končne transmembranske domene, osrednje oligomerizacijske domene in C-končnega repa (CTT). Do aktivacije pride ob vezavi cikličnega gvanozin monofosfat-adenozin monofosfata, ki ga sintetizira ciklična GMP-AMP sintaza (cGAS) ob prisotnosti dvojno vijajne DNA v citosolu. Aktiviran STING oligomerizira, pri čemer se na izpostavljene CTT veže TANK-vezavna kinaza 1 (TBK1) in regulatorni faktor interferonov 3 (IRF3). TBK1 fosforilira IRF3, ki dimerizira in v jedru aktivira transkripcijo pro-vnetnih citokinov in interferonov (IFN) tipa I. Signalna pot cGAS-STING ima zaradi aktivacije imunskih celic pomembno vlogo v ustvarjanju protitumorskega imunskega odziva, zaradi česar je privlačna tarča za imunoterapijo raka. Razvitih je bilo že nekaj agonistov STING, ki pa lahko ob administraciji sprožijo sistemsko vnetje, zaradi česar so potrebni novi pristopi.

Za učinkovitejšo aktivacijo transkripcijskih dejavnikov IRF3 in NF- κ B preko STING smo pripravili t.i. vnetno napravo na osnovi kimernega CTT iz človeka in navadne cebrice, za katerega so pokazali, da vzpodbudi signalizacijo preko IRF3 in NF- κ B. Za izboljšanje signaliziranja smo ubrali različne pristope: pripravili smo konstrukte CTT z različnim številom ponovitev CTT, z dodatkom oligomerizacijskih domen in TDP-43, ki tvori kondenzate preko fazne separacije, s čimer smo posnemali oligomerizacijo STING na membrani endoplazemskega retikuluma ali Golgijevega aparata.

Analizirali smo učinkovitost aktivacije IRF3 in NF- κ B v celični liniji HEK293T. Najbolje sta se odrezali različici, kjer je bil CTT vezan na protein TDP-43 v kombinaciji s tetramerizacijsko domeno in kjer so bile na TDP-43 vezane tri zaporedne ponovitve CTT. Aktivacijo smo dodatno potrdili z merjenjem sproščenega interleukina-8 in zaznanim izražanjem IFN tipa 1. Najboljša konstrukta smo vnesli v rakavo celično linijo HeLa, kjer smo prav tako izmerili aktivacijo IRF3 in NF- κ B. Ti rezultati nakazujejo, da smo pripravili različico STING, s katero se izognemo aktivaciji endogene signalne poti cGAS-STING, s potencialom za obetaven in inovativen pristop pri imunoterapiji raka, ki ne temelji na izražanju endogenih komponent signalne poti cGAS/STING v rakastih celicah.

Ovrednotenje fosforilacije RNA-vezavnih proteinov v nevrosferoidih

Iva Matić¹, Helena Motaln², Boris Rogelj^{1,2}

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo,

² Institut "Jožef Stefan", Odsek za biotehnologijo

Mentorja: Helena Motaln, Boris Rogelj

FUS (angl. fused in sarcoma) in TDP-43 (angl. TAR DNA-binding protein 43) sta RNA-vezavna proteina udeležena v celičnih procesih, kot so transkripcija, procesiranje RNA in transport mRNA. Okvare v teh procesih velikokrat vodijo v nastanek nevrodegenerativnih obolenj, kot sta amiotrofična lateralna skleroza (ALS) in frontotemporalna demenca (FTD). Za oba zgoraj omenjena proteina je značilno aktivno prerazporejanje med jedrom in citoplazmo. Tako FUS kot TDP-43 sta podvržena tudi različnim posttranslacijskim modifikacijam (fosforilaciji, acetilaciji, metilaciji), ki dokazano vplivajo na njuno razporejanje in funkcijo v celici. Fosforilacija C-terminalnega tirozinskega ostanka v proteinu FUS s strani Src kinaz pospešuje agregacijo proteina FUS v citoplazmi. Podobno fosforilacija TDP-43 s strani serinskih kinaz vpliva na njegovo znotrajcelično razporejanje med jedrom in citoplazmo. Patološka agregacija FUS in TDP-43 v nevronih vodi v odmiranje nevronov pri različnih nevrodegenerativnih boleznih, zato je razumevanje patologije teh proteinov ključno za razvoj novih terapij.

Cilj magistrske naloge je ovrednotiti prisotnost in lokalizacijo fosforiliranega proteina FUSp-Tyr526 ter fosforiliranega proteina TDP-43 na mestih TDP-43p-Ser369, TDP-43p-Ser375, TDP-43p-Ser409/410 in prisotnost Src/serinskih kinaz, v mišjih iPSC celicah med diferenciacijo v nevronom podobne celice v 3D dvopartitnem sferoidnem modelu. Mišje inducirane pluripotentne matične celice so bile diferencirane v nevronom podobne celice v 3D kulturi sferoidov. Pri različnih časovnih točkah (2., 3., 4. in 5. tedna) so bili sferoidi fiksirani, njihove pripravljene zamrznjene rezine pa podvržene imunocitokemijskemu barvanju za določitev prisotnosti fosforiliranih oblik FUS in TDP-43. Analiza fosforiliranih oblik proteinov v različnih celičnih tipih je bila ovrednotena s pomočjo ustreznih označevalcev (protiteles) in fluorescentne konfokalne mikroskopije.

Antimikrobno delovanje izolatov naravnih učinkovin vrtnega ognjiča (*Calendula officinalis*) in njihov potencial pri zaviranju tvorbe biofilma bakterij *Escherichia coli*

Luka Bonin^{1,2,3}, Jan Hafner Korošec^{1,3,4}, Tine Oblak¹, Martina Oder⁵, Marko Jeran¹

¹ Institut "Jožef Stefan", Odsek za anorgansko kemijo in tehnologijo

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta³ Gimnazija in veterinarska šola, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana

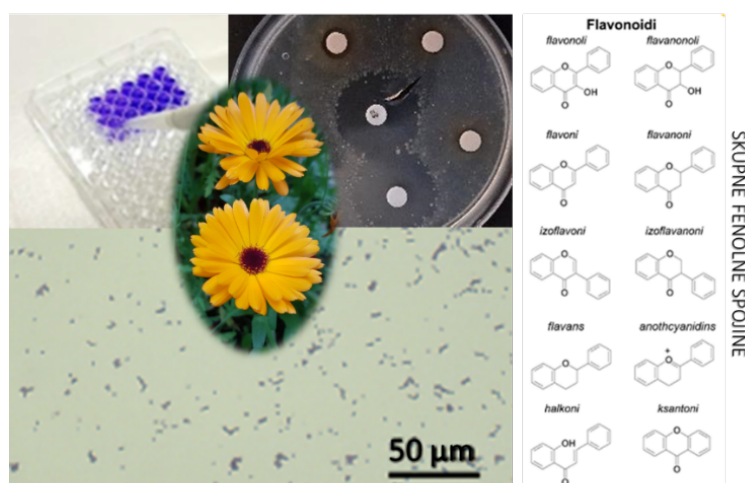
⁴ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

⁵ Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta, Oddelek za sanitarno inženirstvo

Mentorja: Marko Jeran, Martina Oder

Raziskovalno delo preučuje antimikrobno delovanje izolatov vrtnega ognjiča (*Calendula officinalis*) in njegov potencial pri zaviranju tvorbe biofilma bakterije *Escherichia coli* (*E. coli*). Bakterija poleg tega, da lahko povzroči okužbe pri ljudeh, predstavlja tudi indikator fekalnega onesnaženja, in privede do velikih tveganj v živilskih obratih. Zaradi njene vsesplošne pojavnosti se je tako povečalo raziskovanje uporabe naravnih in t.i. »zelenih« učinkovin, ki bi potencialno nadomestila protibakterijske učinkovine kemijskega izvora.

Ob pomoči reagenta Folin-Ciocalteu je bila, v vodno-etanolnem izvlečku in ekstraktu s superkritičnim ogljikovim dioksidom, kvantitativno določena vsebnost skupnih fenolnih spojin. Zaradi polarnosti aktivnih učinkovin, v primerjavi z ekstrakti s superkritičnim ogljikovim dioksidom, so vodno-etanolni izvlečki vsebovali višjo vsebnost skupnih fenolov. Ker fenolne spojine omejujejo in ošibijo interakcijo med bakterijami in površino, lahko njihova povečana koncentracija inhibira rast biofilma bakterije *E. coli*. Na primeru vodno-etanolnega koncentrata, z visoko vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, je bilo z analizo pod mikroskopom in merjenjem optične gostote, na celice vezanega barvila kristal vijolično, opaženo delovanje tovrstnih učinkovin. Razgradnja biofilma je bila, glede na kontrolo, kar 42 %. Tudi ekstrakt s superkritičnim ogljikovim dioksidom je pokazal delovanje lipofilnih učinkovin z naraščajočo koncentracijo. Metoda difuzije učinkovin vodno-etanolnega koncentrata na trdo gojišče modelne kulture tako še dodatno potrjuje tudi njihovo antimikrobno delovanje in prisotnost aktivnih učinkovin. Rezultati raziskave vodno-etanolnega pripravka navadnega ognjiča so tako razkrili potencialni primer prenosa znanja na področju dezinfekcije površin, kontaminiranih z bakterijo *E. coli*. Ciljno, v različnih obratih živilske industrije in drugih higiensko občutljivih področjih.



Slika: Oris raziskovalnega dela.

Hafner Korošec J, Bonin L, Oblak T, Oder M, Jeran M. Vpliv izvlečkov vrtnega ognjiča (*Calendula officinalis*) na biofilm bakterije *Escherichia coli* ter njihovi protimikrobni učinki. *Mikrobiolog.si*. 2023, 3, 1, 3-7. ISSN 2784-4463. Dostopno na: <https://drive.google.com/file/d/1zepw-r23dHym-v5hZEDRp2bkEN44fEud/view>

Nad biofilme bakterije *Pseudomonas aeruginosa* z njenimi naravnimi sovražniki – bakteriofagi

Julia Kresse^{1,2}, Jure Škraban¹, Sandra Janežič³, Urša Miklavčič³

¹ II. Gimnazija Maribor

² Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta

³ Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano Maribor

Mentorji: Jure Škraban, Sandra Janežič, Urša Miklavčič

V raziskovalni nalogi sem preučevala učinkovitost bakteriofagov pri uničevanju biofilmov bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, ki v zdravstvenih ustanovah predstavlja resno težavo zaradi svoje odpornosti na številna razkužila in antibiotike. Namen raziskovalne naloge je bil preveriti, ali lahko bakteriofagi, kot naravni sovražniki bakterij, učinkovito zmanjšajo ali uničijo že nastale biofilme te patogene bakterije.

V raziskovalni nalogi sem uporabila dve vrsti bakteriofagnih suspenzij: eno z enim samim bakteriofagom in drugo z mešanico več različnih bakteriofagov. S tema suspenzijama sem tretirala materiale, kot so kovinski vijaki, plastični vodni filtri in urinski katetri, ki so pogosta mesta tvorbe biofilmov v kliničnih okoljih. Po umetni kontaminaciji materialov z bakterijo *P. aeruginosa* sem opazovala učinke tretiranja z bakteriofagi na biofilme.

Rezultati so pokazali, da so bakteriofagi v določenih primerih uspeli delno uničiti biofilme, pri čemer je bila učinkovitost odvisna predvsem od vrste materiala. Najbolj uspešni so bili pri zmanjševanju biofilma na plastičnih katetih, kjer je mešanica bakteriofagov dosegla nekoliko boljše rezultate v primerjavi z uporabo enega samega bakteriofaga. Na kovinskih vijakih pa bakteriofagi niso pokazali znatnega učinka, kar kaže na specifične omejitve njihove uporabe glede na površino.

Raziskovalna naloga je pokazala, da bakteriofagi predstavljajo potencialno učinkovito sredstvo za dekontaminacijo površin, kontaminiranih z biofilmi bakterije *P. aeruginosa*, predvsem tam, kjer običajna razkužila ne delujejo. Vendar pa je za popolno uveljavitev te metode v vsakodnevni klinični praksi potrebnih še več raziskav, zlasti glede optimizacije fagne terapije za različne vrste materialov in pogojev v zdravstvenih ustanovah.

Kvasovke so mojstri vseh mojstrov: Z genomiko dokazali izjemno evolucijsko prilagodljivost

Neža Čadež

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Kvasovke so enocelične glive, ki ne tvorijo plodišč. Čeprav se je enocelična oblika gliv tekom evolucije razvila večkrat, je skupina kvasovk poddebla *Saccharomycotina* industrijsko najpomembnejša. Ta raznolika skupina kvasovk vključuje tako modelni organizem, vrsto *Saccharomyces cerevisiae*, kot za človeka patogeni kvasovki *Candida albicans* in *Candida auris*, ter tudi industrijsko zanimive oljne kvasovke *Yarrowia lipolytica* in *Lipomyces sterkeyi*, ter čez 1000 drugih vrst.

Kvasovke najdemo skoraj v vsakem biomu in na vseh kontinentih in njihova genetska raznolikost je večja kot genetska raznolikost rastlin ali živali. Zaradi enostavne kulture, preprostega celičnega cikla in majhnih genomov, so kvasovke izredno uporabne v molekularni genetiki, biotehnologiji in evolucijski genomiki.

V predstavljenem delu objavljenem v reviji *Science* smo preučili 1051 različnih vrst kvasovk, katerim smo sekvencirali genome, določili njihov fenotip pod 24-imi različnimi ravnimi pogoji, ter te informacije z uporabo strojnega učenja in mrežno analizo povezali z okoljem iz katerega so bile izolirane. Rezultati so presenetljivi predvsem iz vidika nasprotovanja dobro poznani ekološki paradigmi, saj smo v nasprotju z njo smo dokazali, da generalisti s svojo sposobnostjo izrabe različnih substratov na ta račun niso izgubili prednosti pred specialisti. S tem, tekom evolucije pridobljena metabolna vsestranskost, ni povezana z izgubo drugih lastnosti, kot je na primer počasnejša rast. Na podlagi tega lahko zatrdimo, da so notranji - genetski in ne zunanji – okolje dejavniki tisti, ki določajo katere vire ogljika in s tem v kateri ekološki niši so prisotne določene vrste kvasovk. Z drugimi besedami, določene vrste kvasovke so mojstri-vseh-mojstrov.

Glivni lektini kot bioinsekticidi proti invazivnim žuželčjim škodljivcem: določanje molekularnega mehanizma

Sergej Praček¹, Primož Žigon², Tjaša Peternel³, Katarina Karničar^{4,5}, Tadeja Tumpej³, Dušan Turk^{4,5}, Jaka Razinger², Jerica Sabotič³

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

² Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin

³ Institut "Jožef Stefan", Odsek za biotehnologijo

⁴ Institut "Jožef Stefan", Odsek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo

⁵ Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov (CIPKeBiP)

Mentorica: Jerica Sabotič

Intenzivno kmetijstvo v trenutnem stanju ne bo zmožno zagotoviti hrane v naraščajočem prebivalstvu. Ena glavnih težav, kateremu bo intenzivno kmetijstvo vedno bolj podleženo so visoko specializirani škodljivci iz skupine žuželk. Kot primer lahko naštejemo koloradskega hrošča (*Leptinotarsa decemlineata* Say) kot škodljivca krompirja, koruznega hrošča (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) kot škodljivca koruze in plodovo vinsko mušico (*Drosophila suzukii*) kot škodljivca sadja. Ti škodljivci imajo dve ključni nevarni lastnosti: kot prvo so z globalizacijo postali nevarni invazivni organizmi, ki lahko zrušijo obstoječe trofične mreže, kot drugo pa imajo hitro sposobnost prilagajanja na insekticide. Zaradi teh lastnosti je nujen razvoj insekticidov z novim molekularnim mehanizmom delovanja. Za ta namen je bil predhodno izveden širok presejalni test, s katerim smo določili 3 glivne lektine z bioinsekticidnim delovanjem: *Agrocybe aegerita* galektin (AAG) in *Sclerotinia sclerotiorum* aglutinin (SSA) s toksičnim delovanjem proti plodovi vinski mušici in *Marasmius oreades* aglutinin (MOA) s toksičnim delovanjem proti koloradskemu hrošču. Koloradski in koruzni hrošč sta visoko evolucijsko podobna, a MOA ni izkazal toksičnega učinka proti slednjemu. V sklopu raziskave smo določili molekularni mehanizem toksičnosti lektinov proti tarčnim organizmom in molekularni mehanizem odpornosti koruznega hrošča proti lektinu MOA. Mehanizem delovanja lektinov smo potrdili z *in vivo* testom lektinov, mutant lektinov in lektinov inhibiranih z enostavnim sladkorjem na tarčnih organizmih. Glede na molekularni mehanizem delovanja smo poskusili določiti glikozilacijski profil molekularnih tarč v proteinskem izvlečku čreves tarčnih organizmov. Kot zadnje smo z afinitetno kromatografijo in analizo masne spektrometrije pridobili potencialne proteinske tarče lektinov. Ob zaključku raziskave smo na ta način potrdili proteinsko tarčo v črevesju koloradskega in koruznega hrošča in v plodovi vinski mušici. Ob potrditvi molekularne tarče se odpirajo vrata v nadaljnje raziskave in mogočo končno uporabo novih bioinsekticidov, ki bodo omogočali dostop do hrane v prihodnosti.

Preučevanje tristrane interakcije med rastlino krompirja, endofitsko bakterijo *Bacillus subtilis* in endofitsko glivo *Fusarium oxysporum*

Aljaž Nagode^{1,2}, Anže Vozelj¹, Tjaša Lukan¹, Kristina Gruden¹

¹ Nacionalni inštitut za biologijo

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Mentorja: Tjaša Lukan, Anže Vozelj

Prekomerna in nesmotrna raba okolju škodljivih pesticidov predstavlja veliko grožnjo okolju. Zato je nujen razvoj novih, okolju prijaznih, sistemov za zaščito rastlin pred patogenimi mikroorganizmi. Na Nacionalnem inštitutu za biologijo se ukvarjamo s preučevanjem posebne skupine mikroorganizmov, ki naseljujejo notranjost rastlin. Gre za endofite, ki izkazujejo velik potencial za zaščito rastlin pred neugodnimi biotskimi in abiotskimi stresnimi dejavniki, na okolju prijazen način. Raziskovalno delo v okviru magistrske naloge zajema optimizacijo sistema za preučevanje tristrane interakcije med krompirjem, endofitsko bakterijo *Bacillus subtilis* in endofitsko glivo *Fusarium oxysporum*. Optimizirali smo sistem za preučevanje tristrane interakcije. Preko različnih načinov prostorske inokulacije obeh mikroorganizmov, kot tudi njunega filtriranega medija, v katerem sta predhodno rastla, smo spremljali koreninsko arhitekturo opazovanih rastlin krompirja. Pokazali smo spremenjeno koreninsko arhitekturo ob prisotnosti enega od mikroorganizmov ali njunega filtriranega medija. Tovrstne in nadaljnje raziskave predstavljajo pomemben aspekt v razumevanju interakcij med endofiti in rastlinami. Določitev optimalnih pogojev za delovanje endofitov je ključno za razvoj novih, okolju prijaznih strategij za zaščito rastlin, kar bo zmanjšalo potrebo po kemičnih pesticidih in prispevalo k uveljavitvi koncepta trajnostnega kmetijstva.

Vključevanje alelopatije v aktualne okoljske izzive

Vid Grušovnik^{1,2}, Lenart Frankovič^{1,3}, Irena Štimac¹, Sandra Potušek⁴

¹ Šolski center Velenje – Gimnazija

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

³ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za matematiko in fiziko

⁴ Sartorius BIA Separations

Mentorici: Irena Štimac, Sandra Potušek

Alelopatija je posreden ali neposreden vpliv ene rastline na drugo z alelokemikalijami, ki jih izloča v okolje. Kljub temu da je področje že zelo uveljavljeno, se še vedno pojavlja veliko neznank glede delovanja posameznih alelokemikalij na tarčne rastline. Z raziskovalno nalogo sva želela proučiti možnost uporabe izbranih rastlinskih vrst kot inhibitor plevela v kmetijstvu kot okolju prijaznejšo alternativo herbicidom in ugotoviti njihov potencial za boj proti invazivnim vrstam.

Preizkušala sva vpliv posameznih alelopatskih rastlinskih vrst na kalitev semen in rast koreninic semen bele gorčice (*Sinapis alba*), kot dodatek pa sva izvedla tudi test na semenih invazivne vrste pelinolistne žvrklje (*Ambrosia artemisiifolia*) ter izvedla poskus, kjer sva primerjala rezultate s komercialno dostopnim herbicidom. S pomočjo standardnih ekotoksikoloških testov sva poskušala definirati vpliv posameznih vodnih ekstraktov 11 alelopatskih rastlinskih vrst in ugotovila, da imajo vse izbrane rastlinske vrste zaviralen vpliv na kalitev semen in razvoj koreninic, pri čemer se zaviralna moč s koncentracijo povečuje. Za najboljša zaviralca sta se izkazala hmelj (*Lupuli strobuli*) in sivka (*Lavandula sp.*), ki sta najbolj učinkovito zavirala razvoj semen bele gorčice.

Izvečki izbranih rastlin so imeli na semena pelinolistne žvrklje precej manjši vpliv kot na semena bele gorčice, v nekaterih primerih pa so raztopine na semena pelinolistne žvrklje delovale celo spodbujajoče. Največji inhibicijski vpliv so pokazali izvečki kamilice (*Matricaria chamomilla*) in sivke (*Lavandula sp.*), presenetljivo pa so v nižjih koncentracijah izvečki hmelja (*Humulus lupulus*) in konoplje (*Urtica dioica*) rast koreninic celo spodbujali.

Dobljeni rezultati torej nakazujejo velik potencial predvsem za uporabo vodnih ekstraktov v kmetijstvu v boju proti plevelu in invazivnim rastlinskim vrstam.

PROTIMIKROBNI UČINKI KEFIRJA NA RAST BAKTERIJE *Staphylococcus epidermis*

Živa Juvan^{1,2}, Ana Markič^{1,2}, Maj Zupan^{1,3}, Tadeja Polajnar¹

¹ Biotehniški center Naklo

² Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

³ Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mentorica: Tadeja Polajnar

Kefir je starodavni mlečni napitek, pridobljen z mlečnokislinsko in alkoholno fermentacijo, saj je kultura kefirja v obliki kefirnih zrn sestavljena tako iz mlečnokislinskih in drugih bakterij, kot iz kvasovk.

Raziskovali smo optimalno količino kefirnih zrn, potrebnih za pripravo kefirja, ki bi imela zaviralni učinek na bakterijo *Staphylococcus epidermis*, ki smo jo kot glavno povzročiteljico aknavosti in mozoljavosti, izolirali iz kože mladostnika.

Po izolaciji je bilo bakterijo potrebno okarakterizirati. To smo storili z barvanjem po Gramu, katalaznim testom, hemoliznim testom in z gojenjem na selektivnim gojišču z manitolom in fenol rdečim. Pri barvanju programu smo potrdili prisotnost Gram pozitivnih bakterij. Dokazali smo tudi sposobnost razgradnje vodikovega peroksida in, da ne pride do razgradnje eritrocitov (gama hemoliza). Po gojenju na selektivnem gojišču smo zaključili, da smo uspešno izolirali *Staphylococcus epidermidis*.

Protimikrobne učinke kefirja smo nato potrdili z difuzijskim antibiogramom, kjer smo opazovali premere inhibicijskih con. Za izvedbo smo diske iz filtrnega papirja sterilizirali in jih namočili v kefir. Diske smo nato položili na petrijeve plošče z nacepljenimi bakterijami. Plošče smo inkubirali 48 ur na 37°C in nato izmerili premere inhibicijskih con.

Najboljše rezultate smo dosegli pri koncentracijah šest gramov kefirnih zrn v 100 mL mleka, pri 24 urni fermentaciji na sobni temperaturi.

Za konec smo se odločili izdelati obrazno masko. To smo naredili iz kefirja, ki smo mu dodali belo glino in dobili boljšo konsistenco.

S projektno nalogo smo tako potrdili obe hipotezi (s kože smo uspešno izolirali *Staphylococcus epidermidis* in dokazali, da nanjo kefir deluje protimikrobno), ter dosegli naš cilj z izdelavo obrazne maske, ki bo imela na povzročiteljico mozoljev protimikroben učinek.

Raziskovanje človeškega genoma: od diagnostičnega orodja do novih odkritij

Tine Tesovnik^{1,2}

¹ *Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko*

² *Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta*

Humana genetika je znanstvena veda, ki se ukvarja s proučevanjem genov in njihove vloge pri razvoju človeka. Pri tem je eno izmed ključnih področij humane genetike raziskovanje človeškega genoma, ki predstavlja celotno dedno informacijo posameznika zapisano z nukleotidnim zaporedjem DNA. Človeški genom je sestavljen iz približno treh milijard nukleotidnih parov, ki so v zaporedju DNA organizirani v 23 parov kromosomov, od katerega podedujemo enega od matere in drugega od očeta. Vsak kromosom vsebuje regulatorne elemente in gene z informacijami za sintezo proteinov, ki omogočajo usklajeno delovanje celic in celotnega organizma.

Prvo nukleotidno zaporedje DNA človeškega genoma je bilo določeno pred dobrimi dvajsetimi leti, ko je mednarodni raziskovalni projekt Človeški genom zaključil osnovno kartiranje celotne človeške dedne informacije. Tako določeno osnovno zaporedje človeške DNA je omogočilo boljše razumevanje, kako geni delujejo in kako nukleotidne spremembe v genih vplivajo na njihovo izražanje ter človeško zdravje. Z napredkom tehnologije in širitvijo področja genomike je določanje zaporedja DNA človeškega genoma postalo cenovno dostopno in del diagnostike v klinični praksi. Na tak način lahko bolnikom z genskimi boleznimi določimo bolezenske genske spremembe, opredelimo bolezen ter omogočimo ustrezno zdravljenje.

Pomena večine človeškega zaporedja DNA še vedno ne poznamo. Raziskave človeškega genoma se zato nadaljujemo z določanjem prepisov DNA v celicah, tkivih in bioloških tekočinah, z namenom odkrivanja še nepoznanih dejavnikov in mehanizmov človeškega organizma. Poleg tega potekajo populacijske genomske raziskave, ki proučujejo gensko raznovrstnost populacij in s tem prispevajo k boljšemu razumevanju evolucijskih procesov, ki oblikujejo našo vrsto. Nova dognanja o človeški DNA nam bodo omogočila globlji vpogled v vpliv genoma na zdravje človeka ter pripomogla k razvoju posamezniku prilagojenih terapij za zdravljenje genetskih bolezni.

***In Vitro* karakterizacija proteinskega kompleksa FHL2- β -catenin**

Tina Logonder, Aljaž Gaber

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Mentor: Aljaž Gaber

Epitelijska celična adhezijska molekula (EpCAM) je transmembranski glikoprotein, ki se uporablja kot diagnostični tumorski marker. Prekomerno izražanje proteina EpCAM pogosto povezano s slabo prognozo pri raku. Je ključen protein pri celični proliferaciji, diferenciaciji, morfogenezi epitelijskih celic. Sodeluje v številnih signalnih poteh in ena izmed njih je regulirana znotrajmembranska proteoliza (RIP), pri čemer se po cepitvi sprosti topna znotrajcelična domena (EpIC). Ta interagira s proteini v kanonični signalni poti Wnt in tvori signalni kompleks s FHL2 in β -kateninom, kar vodi do izražanja onkogenov. Kljub terapevtskemu interesu je strukturnih informacij o tem kompleksu malo. Glavna omejitev dosedanjih študij je bila, da je bil FHL2 v prejšnjih raziskavah očiščen kot fuzijski protein z oznako. Uspešno smo izrazili in očistili FHL2 brez oznake, naš cilj pa je raziskati kompleks FHL2- β -katenin in vitro z vezanim ali nevezanim EpIC, da bi razumeli strukturno osnovo vezave EpIC. Dokazali smo tvorbo kompleksa z velikostno izključitveno kromatografijo in SDS-PAGE. Analiza stehiometrije s statičnim sipanjem svetlobe je potrdila razmerje 2:1 med FHL2 in β -kateninom v kompleksu. Z izotermno titracijsko kalorimetrijo smo potrdili stehiometrijo in določili disociacijsko konstanto kompleksa FHL2- β -katenin v mikromolarnem območju. Vezave EpIC na kompleks v in vitro eksperimentih zaenkrat nismo uspeli potrditi, bomo pa v prihodnje preverili, ali so morda posttranslacijske modifikacije β -katenina ključne za vezavo EpIC. Naše delo je osnova za prihodnje eksperimente strukturne karakterizacije vezave EpIC na kompleks FHL2- β -katenin, kar bi prineslo vpogled v mehanizem signalizacije in boljše razumevanje vloge EpCAM pri karcinogenezi.

Določanje novih biokemičnih označevalcev in genetskih polimorfizmov, povezanih s Fabryjevo nefropatijo

Erazem Bahčič¹, Tina Levstek², Bojan Vujkovic³, Katarina Trebušak Podkrajšek²

¹ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

² Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika

³ Splošna bolnišnica Slovenj Gradec

Mentorici: Katarina Trebušak Podkrajšek, Tina Levstek

Fabryjeva nefropatija predstavlja pomemben vzrok obolenosti ter umrljivosti pri Fabryjevi bolezni. Kasnejši pričetek zdravljenja predstavlja povečano tveganje za hitro napredovanje nefropatije, zato potrebujemo zanesljive biokemične označevalce, s katerimi bi preprečili nepopravljivo okvaro ledvic. Namen naše raziskave je bil opredeliti plazemske, urinske in genetske dejavnike, ki so povezani z razvojem in napredovanjem Fabryjeve nefropatije.

V prvi del raziskave smo vključili 35 bolnikov s Fabryjevo boleznijo in 35 po starosti in spolu ujemajočih kontrolnih preiskovancev. Označevalce v plazmi in urinu smo analizirali s paneloma LEGENDplex (BioLegend) na pretočnem citometru. V genetski del smo vključili 103 bolnike; 67 iz Univerzitetne bolnišnice Zürich v Švici in 36 slovenskih bolnikov. Genotipizacijo smo izvedli za *IL6* rs1800795, *TNFA* rs1800629, *VEGFA* rs2010963, *UMOD* rs12917707 in *CST3* rs13038305 na aparatu QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System. Bolniki so bili razdeljeni na tiste s stabilno ledvično funkcijo (SLF) in napredujočo nefropatijo (NN) glede na naklon ocenjene hitrosti glomerulne filtracije.

Pri bolnikih s SLF smo ugotovili statistično značilne razlike v koncentracijah uromodulina (UMOD) v urinu v primerjavi s kontrolami ($p = 0,027$). Poleg tega so se med skupinami bolnikov statistično značilno razlikovali urinski označevalci IGFBP-7, EGF in OPN ($p = 0,015$, $<0,001$ in $0,006$). Pri plazemskem OPN smo ugotovili statistično značilno razliko, ko smo primerjali bolnike s SLF s kontrolnimi preiskovanci ($p = 0,048$). Prav tako smo pokazali statistično značilne razlike v plazemskih NGAL, cistatinu C (CysC), TFF3 in UMOD ($p = 0,038$, $0,007$, $0,007$ oziroma $0,010$) med bolniki s PN in kontrolnimi preiskovanci ter med skupinama bolnikov ($p = 0,022$, $0,002$, $0,019$ oziroma $0,006$). V raziskavi nismo našli nobene povezave med stopnjo nefropatije in izbranimi genetskimi različicami.

Naše ugotovitve pojasnjujejo vlogo nekaterih kandidatnih biokemičnih označevalcev pri razlikovanju med bolniki s stabilno in napredujočo Fabryjevo nefropatijo ter s tem postavljajo temelje za prihodnje raziskave in morebitno klinično aplikacijo.

Vpliv ivermektina na vid opravevalcev

Neža Kunič¹, Emma Železnik¹, Gregor Križ¹, Gregor Belušič²

¹ Gimnazija Bežigrad

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Mentorja: Gregor Križ, Gregor Belušič

Opravevalci so živali, ki sodelujejo pri procesu opraveitve in imajo zato pomembno vlogo za ekosisteme. Ogrožajo jih številni posegi v okolje, med drugim prisotnost pesticidov in drugih škodljivih kemičnih sredstev. Od pandemije SARS-CoV-2 se je v naravi povečala prisotnost ivermektina, ki je praviloma antiparazitik, uporabljen pri ljudeh in živalih, in je v času pandemije nepravilno dobil sloves kot zdravilo, četudi nedelujoče, proti novemu koronavirusu. V okviru raziskovalne naloge smo preučevali vpliv tega sredstva na vid opravevalcev, s tem, da smo opazovali odzivnost sestavljenih oči žuželk med njegovo aplikacijo. Zanimal nas je splošen vpliv sicer razširjenih pesticidov v okolju, vendar smo se odločili za uporabo ivermektina, čeprav le-ta ni najbolj razširjen. Drugi pesticidi so namreč lahko veliko bolj toksični in lahko vplivajo na zdravje, čemur se je bilo potrebno izogniti. Poskuse smo izvajali na šestih različnih živalih in prav toliko vrstah, specifično na štirih vrstah metuljev, eni čebeli in eni muhi trepetavki. Za raziskave smo uporabili metodo elektroretinograma (ERG). Ugotovili smo, da je preprosta meritev električnega odziva oči na bliskanje, s površinskimi elektrodami, dovolj občutljiva za zaznavo vpliva pesticidov na žuželke. Opazili smo, da ivermektin negativno vpliva na vid opravevalcev, zato sklepamo, da bi se zaradi njega v naravi lahko spremenilo njihovo vedenje, kar bi negativno vplivalo na preživetje žuželk in na celotne ekosisteme.

Določanje optimalnih pogojev za rast alg rodu *Dunaliella* iz Sečoveljskih solin

Maks Leon Rogelj¹, Helena Potočnik Vičar¹, Petra Tavčar Verdev²

¹ Gimnazija Vič

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Mentorici: Helena Potočnik Vičar, Petra Tavčar Verdev

Alge rodu *Dunaliella* so enocelične zelene alge, med katerimi najdemo številne slanoljubne predstavnike, ki pogosto naseljujejo evaporacijske bazene v solinah in jim poleti dajejo značilno rdeče-oranžno barvo. Njihovo raziskovanje je pomembno, ker se nekatere vrste *Dunalielle* uporabljajo v kozmetični in prehrabeni industriji zaradi velike količine beta-karotenoidov in drugih bioaktivnih snovi, ki jih proizvajajo. Alge iz rodu *Dunaliella* so prisotne tudi v Sečoveljskih solinah, vendar trenutno malo vemo o njihovi raznolikosti in biotehnoškem potencialu.

V raziskovalnem delu smo se osredotočili na dve kulturi rodu *Dunaliella*. Prva je *Dunaliella salina*, ki je najbolj raziskana predstavnica svojega rodu, druga pa je neznana vrsta tega rodu, izolirana iz Sečoveljskih solin. Raziskovali smo njuno rast v različnih razmerah: pri standardnih solinskih pogojih (kontrolne), pri visoki in nizki koncentraciji soli, ter pri visoki in nizki svetlosti. Rast alg smo spremljali spektrofotometrično z merjenjem absorbanca pri 600 nm (sorazmerna gostoti celic) in absorbanca pri 740 nm (sorazmerna koncentraciji klorofila). Pri kontrolnih poskusih smo rast dodatno spremljali s tedenskim štetjem celic, pri čemer smo uporabili svetlobni mikroskop.

Cilj naloge je bil poiskati najboljše pogoje za rast obeh kultur (še posebej alg iz Sečoveljskih solin), kar bo pripomoglo k hitremu razmnoževanju teh alg v laboratorijskih pogojih. Z opazovanjem morfoloških značilnosti pod mikroskopom smo želeli ugotoviti, ali sta obe preučevani algi iste vrste. Naši rezultati so pokazali, da *Dunaliella salina* najbolje uspeva v kontrolnih razmerah (srednja slanost gojišča) in pri visoki svetlosti. *Dunaliella* iz Sečoveljskih solin pa je najbolje uspevala v zelo slanem gojišču. Ugotovili smo, da se testirani kulturi alg razlikujeta glede na optimalne rastne razmere, poleg tega pa imata tudi različne morfološke značilnosti. Sklepamo, da *Dunalielle* iz Sečoveljskih solin najverjetneje niso vrste *D. salina*, kar pa bi morali v nadaljevanju raziskave preveriti z analizo genomske DNA, ki omogoča zanesljivo prepoznavanje različnih alg do vrste natančno.

Vloga γ -enolaze v centralnem živčnem sistemu: več kot le glikolitični encim

Anja Pišlar, Selena Horvat, Janko Kos

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Funkcija živčnega sistema je odvisna od visokospecifičnih stikov, ki se tvorijo med nevroni med njihovim razvojem, za njihovo pravilno razporeditev v centralnem živčevju pa je odgovorna nevroglija. Pri tem so ključnega pomena proteini z nevrotrofično aktivnostjo, t.i. nevrotrofični dejavniki, ki omogočajo preživetje, diferenciacijo, regeneracijo in vzdrževanje nevronov v centralno živčnem sistemu. Zaradi svojega delovanja so pomembni pri nevrodegenerativnih boleznih, saj zaščitijo poškodovane nevrone pred propadom in spodbujajo njihovo regeneracijo. Nevrotrofičnim dejavnikom podobno delovanje izkazuje tudi glikolitični encim γ -enolaza. V človeških možganih so prisotne tri oblike enolaze, in sicer $\alpha\alpha$, $\alpha\gamma$ in $\gamma\gamma$. Izoobliki $\alpha\gamma$ in $\gamma\gamma$ sta poznani tudi kot nevron-specifična enolaza, ki je poznan označevalec nevronov in perifernih neuroendokrinih celic. Poleg vloge označevalca nevronskih celic, γ -enolazi pripisujejo nevrotrofično delovanje, saj C-končni del γ -enolaze izkazuje nevrotrofično aktivnost, in sicer spodbuja preživetje in diferenciacijo nevronskih celic preko sproženja signalnih poti, ki jih aktivirajo tudi nevrotrofični dejavniki. Nevrotrofična aktivnost γ -enolaze je odvisna od proteolitičnega delovanja cisteinske karboksipeptidaze katepsina X, ki s cepitvijo dveh aminokislin na C-končnem delu γ -enolaze, ohromi njen prenos do plazemske membrane in interakcijo z tirozin-kinaznim receptorjem ter s tem izniči njeno nevrotrofično aktivnost. Nedavne ugotovitve kažejo na zaščitno delovanje γ -enolaze pred toksičnimi procesi v centralnem živčnem sistemu, ki vodijo v nevrodegeneracijo. Slednje označuje γ -enolazo ne le kot glikolitični encim in označevalec nevronskih celic, temveč tudi kot protein, katerega neokrnjeno delovanje pomembno prispeva k preprečevanju nevrodegenerativnih procesov in spodbujanju regeneracije poškodovanih nevronov z izkazovanjem nevrotrofične aktivnosti γ -enolaze.

Razvoj nove učinkovine za lajšanje simptomov kognitivne motnje psov

Urban Košak¹, Damijan Knez¹, Anja Pišlar¹, Janko Kos¹, Simon Žakelj¹, Jurij Trontelj¹, Odon Planinšek¹, Ilija German Ilič¹, Jure Stojan², Marko Živin², Kinga Sařat³, Florian Nachon⁴, Xavier Brazzolotto⁴, Maja Zakošek Pipan⁵, Gregor Majdič⁵, Stanislav Gobec¹

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

² Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

³ Jagielonska univerza Krakov, Fakulteta za farmacijo

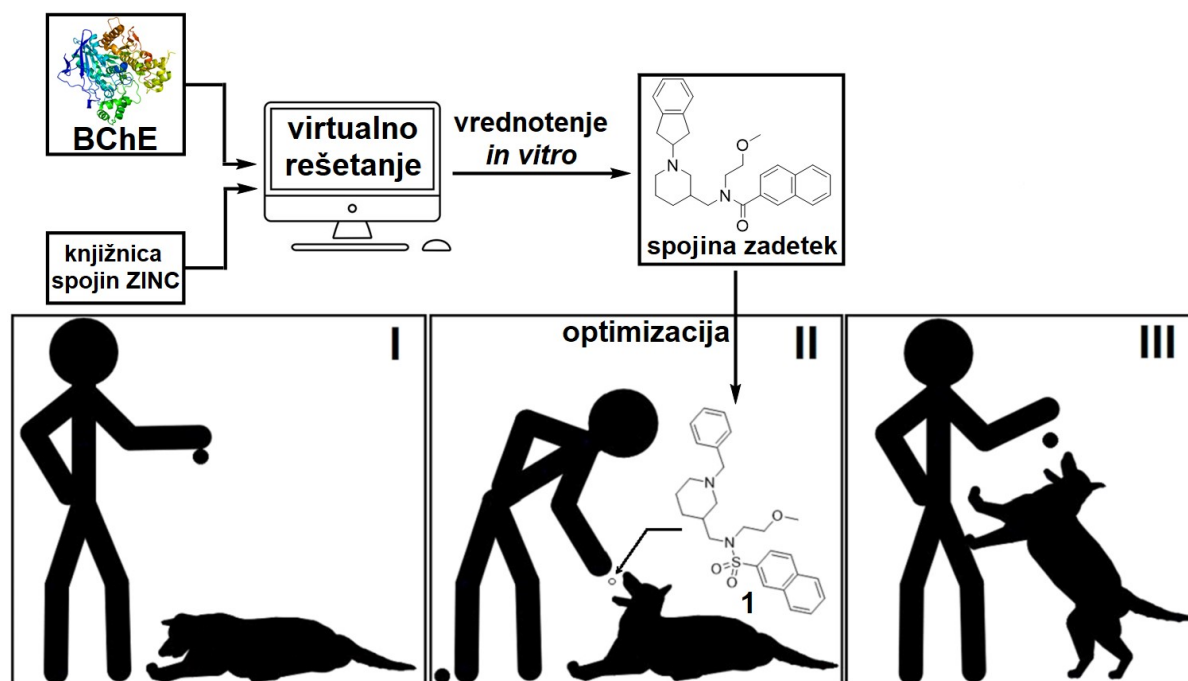
⁴ Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny sur Orge

⁵ Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

Kognitivna motnja psov (KMP) in Alzheimerjeva bolezen (AB) sta neozdravljivi nevrodegenerativni bolezni možganov, ki ju povzročajo patološki agregati proteinov, oksidativni stres in vnetni procesi. Ti patofiziološki procesi se začnejo in najbolj prizadenejo živčno-prenašalni sistem, ki je odgovoren za normalno delovanje spomina in kognitivnih funkcij, to je holinergični sistem. Zaradi propadanja holinergičnih nevronov je v možganih psov s KMP in AB močno znižana koncentracija prenašalca acetilholina (ACh).

V sinapsi se holinergični živčni prenos prekine s hidrolizo ACh na holin in acetat. To reakcijo katalizirata holin esterazi (ChE): acetilholin esteraza (AChE) in butirilholin esteraza (BChE). V možganih zdravih odraslih oseb in živali AChE hidrolizira 80% vsega ACh, BChE pa igra stransko vlogo in hidrolizira 20%. Z napredovanjem bolezni se vloga BChE pri hidrolizi ACh spremeni iz stranske v vodilno. Zato je za lajšanje simptomov KMP (dezorientiranost, anksioznost, agresivnost ali apatičnost) in AB (motnje spomina, osebnostne spremembe, govorne in jezikovne motnje) zelo smiselna uporaba selektivnih zaviralcev BChE.

Leta 2014 smo objavili, da smo z virtualnim reševanjem odkrili spojino zadetek (Slika 1), ki je selektivni zaviralec BChE. Z načrtovanjem na osnovi liganda in strukturno podprtim načrtovanjem smo načrtovali in nato sintetizirali ter biološko ovrednotili ogromno število novih selektivnih zaviralcev BChE. Med njimi pa je najbolj obetaven sulfonamid 1 (Slika 1), ki izboljša spomin, kognitivne funkcije in učne sposobnosti miši s povzročenimi AB podobnimi simptomi in izboljša kognitivne funkcije psov s KMP. Vsi lastniki zdravljenih psov so poročali o drastičnem izboljšanju kakovosti življenja in interakcij med psom in lastnikom. Bistveno pa je, da spojina 1, tako pri miših kot psih, ne povzroča neželenih holinergičnih učinkov, ki so značilni za odobrene učinkovine, ki povišajo koncentracijo ACh v možganih. Naš selektivni zaviralec BChE 1 je tako nova učinkovina za lajšanje simptomov KMP pri psih in kandidat za učinkovino za lajšanje simptomov AB.



Slika 1. Razvoj spojine 1 za lajšanje simptomov KMP in AB.

Prpar Mihevc S, Majdič G. Canine cognitive dysfunction and Alzheimer's disease – two facets of the same disease? *Front Neurosci.* 2019; 13: 604.

Reid GA, Chilukuri N, Darvesh S. Butyrylcholinesterase and the Cholinergic System. *Neuroscience* 2013; 234: 53–68.

Giacobini E. Cholinomimetic replacement of cholinergic function in Alzheimer disease. In *Treatment of dementias: A new generation of progress, 1st ed*; Meyer EM, Simpkins JW, Yamamoto J, Crews FT, Eds.; Springer: New York, 1992; 19–34.

Brus B, Košak U, Turk S, Pišlar A, Coquelle N, Kos J, Stojan J, Colletier JP, Gobec S. Discovery, biological evaluation and crystal structure of a novel nanomolar selective butyrylcholinesterase inhibitor. *J Med Chem.* 2014; 57: 8167–8179.

Košak U, Brus B, Knez D, Šink R, Žakelj S, Trontelj J, Pišlar A, Šlenc J, Gobec M, Živin M, Tratnjek L, Perše M, Sašat K, Podkova A, Filippek B, Nachon F, Brazzolotto X, Więckowska A, Malawska B, Stojan J, Mlinarič Raščan I, Kos J, Coquelle N, Colletier JP, Gobec S. Development of an in-vivo active reversible butyrylcholinesterase inhibitor. *Sci Rep.* 2016; 6: 39495

Zakošek Pipan M, Prpar Mihevc S, Štrbenc M, Košak U, German Ilić I, Trontelj J, Žakelj S, Gobec S, Pavlin D, Majdič G. *Sci Rep.* 2021; 13: 18098.

Giacobini E. Cholinesterase inhibitors: New roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol Res.* 2004; 50: 433–440.

Vloga γ -enolaze in njena regulacija s katepsinom X: od razvoja do degeneracije celic centralnega živčnega sistema

Selena Horvat, Anja Pišlar

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Mentorica: Anja Pišlar

Razvoj nevronov je močno odvisen od nevrotrofičnih dejavnikov, katerim podobno delovanje izkazuje tudi glikolitični encim γ -enolaza, natančneje njen C-končni del. Čeprav je γ -enolaza uveljavljen označevalec nevronov, njena vloga in uravnavanje z lizosomsko peptidazo katepsinom X pri razvoju in degeneraciji celic centralnega živčnega sistema (CŽS), ostaja neraziskana. Pri diferenciaciji humane nevroblastomske celične linije SH-SY5Y v specifični dopaminergični in holinergični podtip, ki odražata značilnosti Parkinsonove in Alzheimerjeve bolezni, smo pokazali pomembno povišanje izražanja γ -enolaze. Skladne rezultate smo pokazali tudi ob obogatitvi in diferenciaciji celične linije v nevroblastomsko-podoben fenotip, za razliko od epiteljsko-podobnega fenotipa, ki lastnosti nevrnskih celic ne odraža. Obenem smo na diferenciranih nevrnskih celicah pokazali ko-lokalizacijo γ -enolaze s katepsinom X, kar nakazuje na vlogo katepsina X pri uravnavanju nevrotrofične aktivnosti γ -enolaze. Pri diferenciaciji humane celične linije oligodendrocitov HOG smo pokazali pomemben prehod v izražanju iz vseprisotno izražene α -enolaze v nevronske-specifično γ -enolazo. Na diferenciranih oligodendrocitih smo s čezmernim izražanjem kot utišanjem γ -enolaze ugotovili, da je slednja pomembno udeležena pri diferenciaciji oligodendrocitov, procesu, ki je ključen za mielinizacijo in s tem podporo nevronov. Na modelu degeneracije dopaminergičnih nevronov in vnetnem modelu oligodendrocitov smo s specifičnim zaviralcem katepsina X, AMS36, opazili povečano raven aktivne oblike γ -enolaze v primerjavi z njeno celokupno obliko ter hkrati izkazan zaščitni učinek zaviralca na poškodovanih celicah. Dodatno smo vlogo katepsina X ovrednotili na in vivo vnetnem živalskem modelu eksperimentalnega avtoimunskega encefalomyelitisa, kjer smo opazili znatno povišano izražanje in aktivnost katepsina X ob časovnem vrhu bolezni in hkratnih spremembah v izražanju γ -enolaze. Naše dosedanje ugotovitve kažejo, da ima γ -enolaza pomembno vlogo pri razvoju in diferenciaciji celic CŽS, pri čemer je njeno delovanje uravnano s katepsinom X, ki izkazuje patogeno vlogo pri nevrodegenerativnih procesih in procesih, povezanih z vnetjem.

Izpostavljenost potrošnikov bisfenolu A, njegovim analogom in mešanicam ter njihov vpliv na zdravje

Neja Štampar^{1,2}, Marija Meznarič¹, Martina Štampar³

¹ Gimnazija Franca Miklošiča Ljutomer

² Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

³ Nacionalni inštitut za biologijo

Mentorici: Marija Meznarič, Martina Štampar

Bisfenoli so skupina industrijsko pomembnih kemikalij, ki se uporabljajo pri proizvodnji polikarbonatne plastike in epoksidnih smol, tako predstavljajo materiale, ki tvorijo široko paleto izdelkov za vsakdanjo uporabo, od oblog za konzerve, embalaže živil, igrač, računov in mnogih drugih. Namen raziskovalne naloge je bil raziskati, kakšna je ozaveščenost potrošnikov o bisfenolih in njihovem vplivu na zdravje ter ugotoviti, ali bisfenol A, njegovi analogi in kompleksne mešanice le-teh delujejo citotoksično. V prvem delu sem predstavila rezultate ankete, ki so pokazali slabo ozaveščenost anketirancev o bisfenolih. V drugem delu so laboratorijski rezultati na jetrnem HepG2 modelu (sferoidu) pokazali, da višje koncentracije BPA in BPAP vplivajo na rast, površino in premer sferoidov, medtem ko BPC in kompleksne mešanice ne povzročajo nobenih sprememb. Na živost celic v sferoidu pa vplivajo višje koncentracije BPA in BPAP, kombinacija BPA+BPAP in kombinacija BPA+BPC+BPAP. Prisotnost BPC in BPA+BPC ni delovala citotoksično na celice.

Učinek zaužitja kofeina na rezultate VO₂max, izmerjene pri športnikih in nešportnikih

Nejc Moškotelec, Petra Košir

Gimnazija Kranj

Mentorica: Petra Košir

Z VO₂max označujemo največji privzem kisika oziroma največji volumen kisika, ki ga je posameznik sposoben porabiti. VO₂max odraža privzem kisika, dosežen med največjo intenzivnostjo vadbe, ki ga ni bilo mogoče povečati kljub nadaljnjemu povečanju obremenitve pri vadbi. Je torej največja količina kisika, ki ga mišice sprejmejo za produkcijo energije, pri visoki obremenitvi. Izraža se lahko kot absolutna mera v litrih kisika na minuto (l/min) ali kot relativna mera v mililitrih porabljenega kisika na kilogram telesne teže na minuto (ml/ (kg·min)). Z raziskovalno nalogo smo želeli ugotoviti, ali obstajajo dejavniki oziroma snovi, ki lahko potencialno izboljšajo vzdržljivost posameznika, merjeno kot parameter VO₂max, brez škodljivih stranskih učinkov. Zato je bil cilj raziskovalne naloge ugotoviti kako zaužitje kofeina vpliva na vrednosti največjega privzema kisika (VO₂max). Poleg učinka zaužitja kofeina smo vključili tudi spremenljivko telesne pripravljenosti (športnik in nešportniki), da bi ugotovili, ali bo prišlo do kakšne pomembne razlike v VO₂max rezultatih. V vzorec je bilo vključenih 20 merjencev. Vsi udeleženci so bili moškega spola. Njihova povprečna starost je bila 17,5 let. Preizkušance smo nato razdelili glede na njihovo telesno pripravljenost v dve skupini in sicer na skupino športnikov in skupino nešportnikov. VO₂max rezultati so bili posredno izmerjeni z zvočno ukazanim testom izčrpanosti, tj. Beep testom. Rezultati, podani v obliki ravni in premikov, ki so bili pridobljeni z Beep testom, so bili nato uporabljeni v enačbi za izračun VO₂max rezultata. Da bi preverili pomembnost razlik med povprečji rezultatov obeh skupin, smo izvedli dvostranski t-test. Ugotovili smo, da zaužitje kofeina povzroči znatno povečanje vrednosti VO₂max rezultata v primerjavi s stanjem brez kofeina tako pri športnikih kot pri nešportnikih. S primerjavo VO₂max rezultatov pred in po zaužitju kofeina, smo ugotovili, da je povprečni rezultat športnikov veliko višji v primerjavi s povprečno največjo porabo kisika nešportnikov. Razlike med vrednostmi VO₂max rezultatov med športniki in nešportniki so statistično značilne. To velja tako za pogoje brez zaužitja substanc, kot po zaužitju kofeina.

OSTALI POVZETKI

Učinkovitost samoizrežujočega se označevalca CPD iz bakterije *Vibrio cholerae*

Ela Bizjak¹, Gregor Gunčar²

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Mentor: Gregor Gunčar

Cisteinska proteazna domena (CPD) je del večfunkcijskega samoprocirajočega toksina, ki vsebuje ponavljajoče motive (MATRX), iz bakterije *Vibrio cholerae*. Domena je ključna za virulentnost toksina, saj s cepitvijo na več mestih aktivira ostale domene, med njimi tudi domeno, ki kovalentno povezuje aktin in Rho-inaktivirajočo domeno. Za aktivacijo mora katalitično aktivnost CPD inducirati inozitol heksakisfosfat (IP6), ki je prisoten v citosolu evkariontskih celic. Ker CPD specifično cepi tudi na mestu, ki je del njenega aminokislinskega zaporedja, je primerna za uporabo kot samoizrežujoči se označevalec. Prednosti njene uporabe so: eliminacija potrebe po uporabi komercialno dostopnih proteaz, izvedba cepitve na koloni za nikljevo afinitetno kromatografijo in nizki stroški uporabe IP6. V bakteriji *Escherichia coli* seva BL21[DE3] smo izražali protein EGFP s C-končno fuzijo CPD s heksahistidinsko oznako. S poskusnim izražanjem smo določili, da zvijanje proteina ob indukciji z IPTG najbolje poteka pri 18 °C. V nadaljevanju smo izražanje ob takih pogojih izvajali v večjem merilu. Rekombinantni protein smo preko heksahistidinske oznake izolirali, in katalitično domeno v prisotnosti različnih koncentracij IP6 aktivirali in opazovali, kako uspešno poteka samoizrezovanje. Cepitev smo spremljali v raztopini in preko vezave na aktivirane nikljeve kroglice. Potrdili smo, da prezgodnja aktivacija in nespecifične cepitve niso prisotne. Optimalne rezultate smo dosegli ob dvourni inkubaciji na aktiviranih nikljevih kroglicah s 500 µM IP6 pri 18 °C.

Vpliv utišanja A3B in A3A na lokalizacijo ciklina D1 v keratinocitih

Zarja Doberšek, Živa Flego, Marija Nika Lovšin

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Mentorica: Marija Nika Lovšin

Proteini družine APOBEC (angl. *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide*) so poznani predvsem po svoji vlogi v prirojenem in pridobljenem imunskem sistemu, vendar pa nekatere raziskave kažejo pomen in vpliv teh proteinov tudi v drugih funkcijah, na primer pri razvoju rakavih obolenj.

APOBEC proteini so citidinske deaminaze, ki deaminirajo citidin v uracil pri RNA, oziroma v timidin v enoverižni DNA. S tem lahko deaktivirajo virusne nukleinske kisline in tako organizem ščitijo pred virusi. Prvotno so bili povezani z obrambo pred virusom HIV, kasneje pa se je izkazalo, da lahko delujejo tudi na nekatere DNA viruse, na primer humane papiloma viruse (HPV).

Naša raziskava se osredotoča na vpliv APOBEC3A (A3A) in APOBEC3B (A3B) na celično rast in delitev v keratinocitih. Preučiti smo želeli, kako utišanje izražanja A3A in A3B v keratinocitih vpliva na lokalizacijo ciklina D1 – proteina, ki ima pomembno vlogo v nadzoru celičnega cikla. Naša hipoteza je bila, da bo pri celicah z utišanem A3B, ciklin D1 lokaliziran bolj v jedru, kot pri celicah, ki nimajo utišanega A3B.

Uporabili smo celično linijo HFK (*Human foreskin keratinocytes*), ki predstavlja gostiteljsko celico za HPV. Izražanje A3A in A3B smo utišali s transfekcijo s siRNA. Celice smo 48 ur po transfekciji fiksirali, jih imunofluorescenčno pobarvali s protitelesi proti ciklinu D1 ter analizirali s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa.

Dosedanji rezultati nakazujejo, da razlike niso tolikšne, kot smo pričakovali. Poznavanje vpliva utišanja A3A in A3B na protein celičnega cikla, bo pomagalo pri razumevanju kancerogeneze pri onkogenih genotipih HPV virusa.

Insektna biokonverzija kot rešitev za trajnostni prehranski sistem v krožnem biogospodarstvu

Luka Irenej Pečan^{1,2}, Aleš Kuhar¹, Ema Luna Karara Geršak¹, Alenka Levart³, Marko Jeran⁴

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za agrarno ekonomiko politiko in pravo

² Università degli Studi di Trieste, Dipartimento di Scienze della Vita

³ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za prehrano

⁴ Institut "Jožef Stefan", Odsek za anorgansko kemijo in tehnologijo

Evropski zeleni dogovor (European Green Deal, 2021) stremi k preoblikovanju EU v trajnostno in konkurenčno skupnost, kjer je trajnost prehranskih sistemov ključna prednostna naloga. S prehodom na krožno biogospodarstvo se spodbuja sprememba proizvodnje, predelave, distribucije in porabe hrane, kar zmanjšuje okoljski vpliv in odvisnost od neobnovljivih virov.

Med najbolj obetavnimi področji je učinkovitejša uporaba bioloških odpadkov in stranskih tokov biomase, vključno z rastlinskimi stranskimi proizvodi. Tehnologija insektne biokonverzije omogoča valorizacijo teh odpadkov v visokokakovostne surovine za živalsko krmo, bioplinarne, kozmetiko in farmacevtske izdelke. Evropski zeleni dogovor izpostavlja insektno biokonverzijo kot alternativo, ki zmanjšuje okoljski vpliv živinoreje.

Uvedba insektne biokonverzije lahko znatno zmanjša uvozno odvisnost Slovenije in EU na področju beljakovin. Svetovna populacija naj bi do leta 2050 dosegla 9,7 milijarde, kar bo zahtevalo 50 % več beljakovin, kot jih proizvedemo danes. Ob trenutnih obremenitvah okolja in omejenih pridelovalnih površinah je ključno učinkovito izkoristiti odpadno hrano, ki je danes zavržemo približno tretjino.

Insekti ponujajo rešitev za oskrbo z beljakovinami in obvladovanje odpadne hrane, saj reciklirajo hranila v visokokakovostne beljakovine. Hranjene z organskimi surovinami imajo številne prehranske in trajnostne prednosti ter predstavljajo manjkajoč člen v krožnem gospodarstvu. Leta 2021 smo v Sloveniji zavržli 143.254 ton hrane, kar predstavlja velik potencial za uporabo v insektni biokonverziji. Opisano je botrovalo k zasnovi in realizaciji raziskovalnega projekta, ki obravnava valorizacijo stranskih proizvodov v rastlinski pridelavi z uvajanjem sodobnih konceptov in tehnologij krožnega biogospodarstva na kmetijah (EIP ŽUŽ).

Učinkovita uvedba insektne biokonverzije lahko prinese številne pozitivne učinke na lokalni in širši ravni, s čimer podpira cilje evropskega zelenega dogovora in krepi trajnost evropskega kot tudi lokalnega prehranskega sistema.

Almeida, C., Rijo, P., & Rosado, C. (2020). Bioactive Compounds from *Hermetia Illucens* Larvae as Natural Ingredients for Cosmetic Application. *Biomolecules*, 10(7), 976. <https://doi.org/10.3390/biom10070976>

European Commission. Directorate General for Research and Innovation. (2021). *European Green Deal: Research & innovation call*. Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2777/33415>

Szczepanik, K., & Świątkiewicz, M. (2024). *Hermetia illucens* as a Source of Antimicrobial Peptides – A Review of *in vitro* and *in vivo* Studies. *Annals of Animal Science*, 24(1), 77–88. <https://doi.org/10.2478/aoas-2023-0071>

Yamamoto, F. Y., Suehs, B. A., Ellis, M., Bowles, P. R., Older, C. E., Hume, M. E., Bake, G. G., Cammack, J. A., Tomberlin, J. K., & Gatlin, D. M. (2022). Dietary fishmeal replacement by black soldier fly larvae meals affected red drum (*Sciaenops ocellatus*) production performance and intestinal microbiota depending on what feed substrate the insect larvae were offered. *Animal Feed Science and Technology*, 283, 115179. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115179>

Projekt je sofinanciran iz Programa razvoja podeželja Republike Slovenije 2014–2020 in Evropskega kmetijskega sklada za razvoj podeželja v okviru ukrepa Sodelovanje, podukrep M16.2 - Podpora za pilotne projekte ter za razvoj novih proizvodov, praks, procesov in tehnologij.

Produkcija zelene mikroalge *Chlorella vulgaris* na polifluoroetilenpropilskem (FEP) nosilcu kot potencialnem onesnaževalcu vodnih ekosistemov

Martina Kogovšek^{1,2}, Patricija Lap¹, Gašper Tavčar¹, Maja Ponikvar-Svet¹, Marko Jeran¹

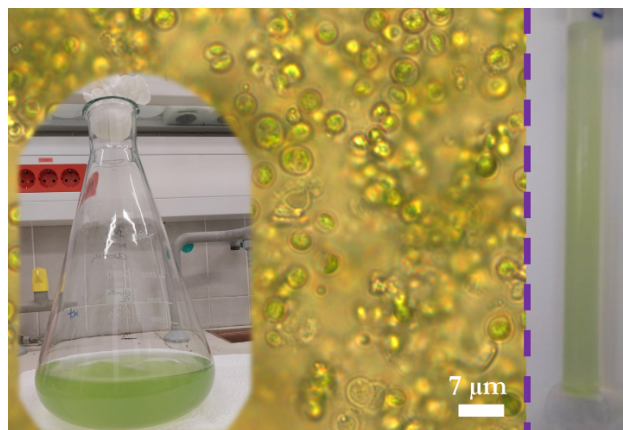
¹ Inštitut "Jožef Stefan", Odsek za anorgansko kemijo in tehnologijo, Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo, Ljubljana

Mentorja: Marko Jeran, Maja Ponikvar-Svet

Polifluoroetilenpropilen (FEP) uvrščamo med fluorirane polimere (PFAS). Izkazal se je kot pomemben industrijski material, ki ga odlikuje odpornost na širok spekter kemikalij. Zaradi strožjih okoljskih predpisov, lahko v prihodnosti privede do omejitev njihove uporabe. Perfluorokemikalije so znane po svoji izjemni okoljski obstojnosti, saj se dlje časa kopičijo v organizmih ter se obdržijo v tleh, vodi in zraku. Ker takih molekul ni mogoče enostavno razgraditi, se postajajo vprašanja dolgoročnega vpliva na ekosisteme.

Pokazali smo, da prisotnost nosilca FEP pomembno pripomore k rasti in razmnoževanju celične kulture mikroalge *Chlorella vulgaris*. Po 41 dneh inkubacije, preidejo celice v fazo intenzivne rasti in produkcijo biološko-aktivnih učinkovin. Tvorijo se celični skupki in aglomerati delcev. Celična biomasa postaja, ob stiku fluoropolimera, neenakomernih matematičnih oblik. Sorazmerno, z uporabo jedkala, niha tudi koncentracija celičnih struktur. Rezultati kvantitativnih določanj skupnega fluorida in kroma so pokazali, da kemijsko jedkana površina na osnovi brezvodnega vodikovega fluorida in močnega oksidanta kromil fluorida (CrO_2F_2), pomembno pripomore k vsebnosti skupnega fluorida in kroma. Glede na določitve komponent v kontrolnih vzorcih, lahko zaznamo tudi privzeme fluorida in kroma ter njuno nadaljnjo vezavo v nepolaro lipidno ovojnico modelnega organizma.



Slika: Gojenje mikroalge *Chlorella vulgaris* v stekleni (levo) in FEP posodi (desno).

Mehanizem delovanja N-acetil-L- cisteina na rast bakterij in tvorbo biofilmov

Nina Oven, Pamela Moussa, Cristina Galiano

Wetsus Institute in University of Groningen

Mentorici: Pamela Moussa, Cristina Galiano

Zagotavljanje pitne vode, ki ustreza normativom ter je kemijsko in mikrobiološko varna, še vedno predstavlja izziv. Eden glavnih onesnaževalcev vodovodnih sistemov je rast biofilmov, katerih odvajanje v vodni tok vpliva na okus, vonj in barvo pitne vode, izprane bakterije iz biofilma so tudi potencialno patogene. Podjetja za oskrbo s pitno vodo po vsem svetu se pogosto poslužujejo dezinfekcije s klorom, vendar pa v interakcijah med klorom in zunajceličnimi polimeri (EPS), ki tvorijo biofilm, nastajajo škodljivi stranski produkti dezinfekcije.

Namesto klora bi se za dezinfekcijo lahko uporabljal N-acetil-L-cistein (NAC), acetilirani derivat cisteina, ki se v medicini že uporablja za lajšanje težav z zadebeljeno sluznico pri pljučnih obolenjih. Na modelnih bakterijah bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* in *Sphingomonas paucimobilis* smo pokazali, da je rast kultur ireverzibilno ustavljena takoj po tretiranju s prvo učinkovito inhibitorno koncentracijo (1 mg/mL). Vendar je delovanje NAC le bakteriostatično, celice se sicer ne morejo več deliti, tudi če jim dodamo sveža hranila, s fluorescentno in situ hibridizacijo pa smo pokazali, da vseeno ostanejo metabolno aktivne. Izmerili smo tudi padec razmerja $NAD^+/NADH$ v celici, kadar smo kulture tretirali s koncentracijami NAC s $pH < pK_a$, na podlagi česar zaključujemo, da NAC poruši redoks ravnotežje v celici, kadar je molekula nenabita in lahko prehaja celično membrano. Da za učinek NAC ni razlog le nizek pH smo pokazali z inhibicijo rasti acidofilne bakterije *Acidiphilium cryptum* po tretiranju z 1 mg/mL NAC, katerega pH sicer ustreza optimalnemu pH te bakterije. Na modelnih bakterijah pa smo pokazali, da NAC delno zaustavlja rast tudi pri nižjih koncentracijah, medtem ko druga kislina na rast pred prvo inhibitorno koncentracijo ni imela vpliva. Kadar je pH raztopine NAC naravnana na 7, je njegov vpliv manjši in opazen šele pri višjih koncentracijah (> 6 mg/mL). S HPLC smo v tem primeru izmerili zanemarljivo nizke koncentracije intracelularnega NAC, kar pomeni da mora za vpliv na rast preiti celično membrano. S kvantifikacijo EPS smo ugotovili, da NAC zmanjša proizvodnjo EPS tudi pri koncentracijah, nižjih od prve inhibitorne koncentracije, pri višjih koncentracijah pa smo opazili tudi delno razgradnjo EPS. Kar daje podlago za nadaljnje raziskave in vzpostavitev alternativnega načina zagotavljanja neoporečne pitne vode.

Na poti k uporabi fluoriranih lipofilnih ksantenskih fluorescenčnih učinkovin za označevanje dednega materiala v medicinski diagnostiki

Sara Petrovčič^{1,2}, Lana Lopert^{1,2}, Katja Marinko³, Gašper Tavčar¹, Mateja Erdani Kreft⁴, Tine Tesovnik^{5,6}, Marko Jeran^{1,*}

¹ Institut "Jožef Stefan", Odsek za anorgansko kemijo in tehnologijo

² Gimnazija in veterinarska šola, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana

³ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo

⁴ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

⁵ Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

⁶ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo

Mentorja: Marko Jeran, Tine Tesovnik

Razvoj in razumevanje mehanizmov nastanka različnih genetskih bolezni je postalo predmet raziskovanja z napredkom področja genetike. Med razvojem zarodka lahko prihaja do prirojenih nepravilnosti. Skladno z razvojem novih diagnostičnih metod proučevanja genetske informacije so se razvijala tudi nova fluorescenčna barvila. V primerjavi s klasičnimi kemiluminiscenčnimi reakcijami (emisija svetlobe kot posledica kemijske reakcije) potrebuje fluorescenca za svoj obstanek svetlobni vir. Svetlobni vir dovaja fotone, ki jih snov v nadaljevanju absorbira. Proces povzroči preskok osnovnega delca ciljne snovi v elektronsko vzbujeno stanje. Snov fotone znova odda ter se vrne v začetno t.j. osnovno stanje, kar opazimo kot vidno emisijo svetlobe.

Z interdisciplinarnim pristopom smo s kombinacijo sodobne kemijske sinteze in mikrobioloških aplikacij pripravljali nova barvila. Spojino nove generacije fluorescenčnih molekul smo z uvedbo nepolarnih strukturnih fragmentov modificirali in tako prispevali k izboljšanju lastnostim. Polarni, hidroksilni in manj polarni fluorirani analog barvil ksantenskega tipa, ki je svoje delovanje izkazoval na področju vezave na celične strukture, smo prenesli na model komercialne DNA z znano sestavo fragmentov kot tudi na celice zelene mikroalge *Chlorella vulgaris*.

Rezultati eksperimentalnega dela nakazujejo, da igrata ključno vlogo tako čas izpostavljenosti vzorca z barvilom kot njegova koncentracija. Slednje predstavlja podlago za nadaljnje delo. Testirani barvili na gelu odsevata lise fragmentov DNA zaporedij, mogoče pa je zaznati tudi izplavljanje barvila. Pas se nahaja ob končni točki gela, proti kateremu potuje DNA, kar je najverjetneje posledica različnih nabojev barvila. Ključni izziv uporabe fluorescenčnih označevalcev se med drugim skriva v vezavnih mestih. Barvilo se lahko ne veže na mesto, kamor ga želimo aplicirati, zato je nujen razvoj vezavno-specifičnih označevalcev. Na predlagan način želimo prispevati tudi k razvoju manj toksičnih, pogosto uporabnih barvil, kot so etidijev bromid in varnejših barvil družine SYBR. Pot do novih specifičnih označevalcev DNA je verjetno še dolga, vendar je zelo pomembno, da se njihovo učinkovitost in uporabnost preizkusi na različnih modelnih sistemih. Opisana študija je bila objavljena v obliki raziskovalnega [članka](#).

Vpliv genetske variabilnosti in koncentracije vnetnih dejavnikov na vrednosti PCSK9 pri bolnikih z zgodnjim miokardnim infarktom

Nik Podkrajšek¹, Nika Breznik², Andreja Rehberger Likozar³, Miran Šebeštjen^{3,4,5}, Tina Levstek^{2,6}

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,

² Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko

³ Univerzitetni klinični center Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za žilne bolezni

⁴ Univerzitetni klinični center Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za kardiologij,

⁵ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za interno medicino

⁶ Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

Mentorja: Miran Šebeštjen, Tina Levstek

Protein konvertaza subtilisin/keksin tipa 9 (PCSK9) je protein, ki sodeluje pri lizosomalni razgradnji receptorjev za lipoproteine nizke gostote (LDL) in tako zmanjšuje privzem plazemskega LDL, kar lahko zveča tveganje za razvoj ateroskleroze. Še posebno, ker je PCSK9 vpleten tudi v procese vnetja in imunskega odziva. Za zdravljenje hiperholesterolemije se uporabljajo različne učinkovine, tudi zaviralci PCSK9, ki znižujejo biološko dostopnost PCSK9. Na ta način pomembno znižajo vrednosti krvnega holesterola in zmanjšajo verjetnost za kardiovaskularne zaplete. Na raven PCSK9 vplivajo različni dejavniki, ki še niso popolnoma pojasnjeni. Namen je bil preučiti vpliv genetske variabilnosti in obsega vnetnega stanja na vrednosti PCSK9 pri bolnikih z zgodnjim miokardnim infarktom.

V raziskavo smo vključili 65 bolnikov z zdravljeno hiperholesterolemijo in stabilno koronarno arterijsko bolezen vsaj šest mesecev po miokardnem infarktu, ki so ga doživeli v povprečju pri starosti 45,1 let (38,5–51,7). S kvantitativnim PCR smo v vzorcih DNA določili polimorfizme rs1800795 gena *IL6*, rs1800629 gena *TNFA* in rs1800947 gena *CRP*. Plazemske koncentracije dejavnikov vnetja (interlevkin 6, *IL6*; dejavnik tumorske nekroze α , TNF- α ; C-reaktivni protein visoke občutljivosti, hsCRP) ter PCSK9 so bile določene imunokemijsko v laboratoriju Kliničnega oddelka za žilne bolezni v Ljubljani.

Z izračunom Pearsonovih koeficientov korelacije smo ugotovili, da plazemske koncentracije vnetnih dejavnikov ne vplivajo na koncentracijo PCSK9 (*IL6*: $r=-0,115$ ($p=0,269$); TNF- α : $r=-0,081$ ($p=0,434$); hsCRP $r=-0,146$ ($p=0,158$)). Poleg tega tudi genotipi polimorfizmov rs1800795 gena *IL6* ($p=0,527$) in rs1800629 gena *TNFA* ($p=0,471$) ne vplivajo na vrednosti PCSK9. Se pa koncentracije PCSK9 razlikujejo pri bolnikih z različnim genotipom polimorfizma rs1800947 gena *CRP*. Bolniki z genotipom GG imajo namreč statistično značilno višje vrednosti PCSK9 kot osebe z genotipom CC ($p<0,001$) ali CG ($p<0,001$). V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno razširiti nabor preučevanih genetskih dejavnikov in tako natančneje preučiti njihov vpliv na plazemske koncentracije PCSK9 ter s tem oceniti možen vpliv na zdravljenje z zaviralci PCSK9.

Vpliv prehranjevalnih navad športnic na pojavnost sindroma REDs

Vesna Potočnik¹, Neža Botica¹, Katarina Rogelj¹, Ana Karin Kozjek²

¹ Gimnazija Kranj

² Splošna bolnišnica Jesenice

Mentorici: Katarina Rogelj, Ana Karin Kozjek

Sindrom relativnega energijskega pomanjkanja v športu ali sindrom REDs (angl. *Relative Energy Deficiency in sport – REDs*) je stanje, ki lahko prizadene moške ali ženske, profesionalne ali rekreativne športnike. Glavni vzrok za pojav sindroma je nizka energijska razpoložljivost. Energijska razpoložljivost predstavlja energijo iz hrane in pijače, ki je športnik ne porabi med telesno vadbo in se porabi za podpiranje različnih fizioloških funkcij v telesu. V kolikor se zgodi, da je energijska razpoložljivost pri športniku prenizka, torej da telo vseh fizioloških funkcij ne zmore zadostno podpirati, se razvije sindrom REDs. Ta vodi v različne motnje delovanja organizma, kot so motnje presnovne funkcije, presnove kosti, imunskega sistema, menstrualnega cikla, izgradnje beljakovin in srčno-žilnega sistema. V kolikor sindroma ne diagnosticiramo dovolj zgodaj, ima lahko poleg kratkotrajnih tudi dolgotrajne posledice na športnikovo zdravje in športno uspešnost.

Namen najine raziskave je bil, da ugotoviva, kako prehranjevalne navade slovenskih športnic vplivajo na njihovo stopnjo tveganja za sindrom REDs. Raziskavo sva izvedli s pomočjo anketnega vprašalnika, ki je bil sestavljen iz dveh delov. Prvi del je predstavljal validiran vprašalnik RST (angl. *REDs specific screening tool*), ki je omogočil ugotavljanje tveganja za prisotnost sindroma REDs pri športnicah, drugi del vprašalnika pa je spraševal po prehranjevalnih navadah športnice.

V raziskavi sva ugotovili, da na višjo stopnjo tveganja za sindrom REDs vpliva zmanjšano tedensko število zaužitih obrokov. Prav tako je raziskava pokazala, da uživanje prehranskih dopolnil in beljakovinskih dodatkov ob uživanju zdrave in raznolike prehrane ne vpliva na stopnjo tveganja za sindrom. Rezultati ankete pa so pokazali še, da stopnjo tveganja opazno znižujeta uživanje preprostih ogljikovih hidratov med treningom in obroka po treningu, medtem ko uživanje obroka pred treningom nima takšnega vpliva. Športnik lahko z upoštevanjem zgornjih ugotovitev zniža tveganje za pojavnost sindroma REDs in se še naprej brezskrbno ukvarja s športom.

Identifikacija patogenih gliv, ki povzročajo zgodnje odpadanje plodov oljke, na osnovi črtne kode DNA

Petja Premrl, Petra Tavčar Verdev, Marko Dolinar

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Mentorja: Petra Tavčar Verdev, Marko Dolinar

V oljkarstvu severnega Sredozemlja se v zadnjih letih pojavlja problem odpadanja plodov oljk v zgodnji fazi razvoja. Plodovi potemnijo, se posušijo in odpadejo, kar lahko pridelek zmanjša za več kot polovico. Razlog za ta pojav še ni znan. Različni viri kot vzrok navajajo abiotske dejavnike, kot sta suša in temperaturna nihanja, spet drugi pa navajajo prisotnost patogenih gliv ali škodljivih insektov.

V raziskovalni nalogi smo želeli z metodo črtne kode DNA identificirati vrste gliv, ki so prisotne na okuženih plodovih oljk in povzročajo njihovo zgodnje odpadanje. Izolirali smo genomsko DNA in z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) pomnožili dele genoma, ki predstavljajo vmesnik – regijo ITS – med zapisoma za ribosomsko RNA 18 S in 28 S. Regija ITS velja za najprimernejše variabilno zaporedje v genomu gliv, ki omogoča določitev organizma do ravni vrste.

Dobljenim produktom PCR smo določili nukleotidno zaporedje. S primerjavo teh zaporedij z zaporedji iz zbirk GenBank in BOLD smo identificirali več rodov gliv, med katerimi najdemo tudi znane patogene glive, ki okužujejo oljke. Najpogosteje identificirani rodovi gliv so bili *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Neofusicoccum* in *Trichoderma*. Določanje gliv do vrste natančno se je izkazalo za problematično, saj smo pri analizi posameznih zaporedij pogosto naleteli na več zadetkov z visoko podobnostjo, ki so pripadali različnim vrstam istega rodu. Mnogi rodovi vsebujejo poleg patogenih tudi endofitne glive, kot sta *Alternaria alternata* in *Aureobasidium pullulans*, ki lahko pod določenimi pogoji (npr. ob temperaturnem nihanju) postanejo patogene za oljke.

Naši rezultati kažejo, da je prezgodnje odpadanje plodov oljk najverjetneje posledica okužbe z eno ali več izmed gliv, katerih zaporedja smo našli v vzorcih okuženih plodov oljke. Možno pa je tudi, da so za okužbo krivi abiotski dejavniki in njihov vpliv na patogenost nekaterih endofitnih gliv.

Zaviranje homodimerizacije proteaze Mpro in bakterijske histidin kinaze EnvZ z malomolekulskimi inhibitorji v bakteriji *Escherichia coli*

Gaja Starc, Marko Novinec

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Mentor: Marko Novinec

Homodimerizacija proteinov je ključna za uravnavanje številnih procesov v celicah. Encimi morajo za katalitično aktivnost pogosto dimerizirati, na ta način je torej opravljanje morfološke funkcije uravnavano z oligomernim stanjem. S porastom pojava odpornosti na antibiotike in pojavom novih virusov, se vse več raziskav ukvarja tudi s preučevanjem dimerizacijske površine kot potencialne tarče v razvoju novih zdravil. Dimerizacija pogosto temelji na manjšem številu ključnih interakcij, ki jih je mogoče učinkovito prekiniti z uporabo malih molekul. Iskanje novih malomolekulskih inhibitorjev dimerizacije pa terja učinkovite metode presejanja knjižnic malih molekul, ki omogočajo identifikacijo oligomernega stanja proteinov. Tekom dela smo skušali preveriti uporabnost sistemov LEXGFP in TOXGFP za detekcijo homodimerizacije v bakteriji *Escherichia coli* pri presejanju knjižnic malomolekulskih inhibitorjev dimerizacije v celicah. Analizirali smo oligomerno stanje štirih ključnih bakterijskih oziroma virusnih encimov, za katere so poznani inhibitorji dimerizacije – proteaze Mpro iz SARS-CoV-2, bakterijske histidin kinaze EnvZ iz *E. coli*, proteaze citomegalovirusa in proteaze herpes virusa povezanega s Kaposijevim sarkomom. V bakteriji *Escherichia coli* smo uspeli potrditi le homodimerizacijo prvih dveh testnih proteinov, nato pa smo njuno oligomerno stanje analizirali še po uporabi malomolekulskih inhibitorjev homodimerizacije in v primeru proteaze Mpro po uvedbi mutacij aminokislinskega ostanka Arg298, s ključno vlogo pri homodimerizaciji. Statistično značilne rezultate smo uspeli pridobiti le s sistemom TOXGFP, za potrditev uporabnosti tega sistema pri presejanju knjižnic inhibitorjev dimerizacije pa so potrebne dodatne raziskave.

Identifikacija človeških citoplazemskih proteinov, ki interagirajo z dvema derivatoma pirazola

Milena Stojkowska Docevska, Marko Novinec

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Mentor: Marko Novinec

Identifikacija malih molekul, ki interagirajo z biološkimi makromolekulami, je eden od temeljnih pristopov pri iskanju novih zdravilnih učinkovin. Pri tem ponavadi izhajamo iz znane makromolekule in odkrivamo male molekule, ki z njo interagirajo. Alternativno pa lahko iščemo tudi makromolekule, ki interagirajo z neko izbrano malo molekulo, katere biološka (fenotipska) aktivnost je lahko znana ali pa ne. Najbolj razširjena tehnika, ki se uporablja v ta namen, je afinitetna kromatografija.

Namen našega raziskovalnega dela je bil identificirati proteine, ki specifično interagirajo z dvema podobnima malima molekulama, 4-(2-aminoetil)-1-cikloheksil pirazol-5-olom (ligand 1) in 4-(2-aminoetil)-1-fenil pirazol-5-olom (ligand 2), ki sta bili sintetizirani na Katedri za organsko kemijo UL FKKT. Mali molekuli smo imobilizirali na afinitetni nosilec in pripravljeni koloni uporabili za izolacijo tarčnih proteinov. Kot preiskovani vzorec smo imeli lizat celic človeških monocitov U937, gojenih v suspenzijski kulturi. Analize so pokazale, da se liganda med seboj razlikujeta v naboru interagirajočih proteinov. Eluate s kolone z ligandom 1 smo analizirali z masno spektrometrijo in na ta način identificirali enega od interagirajočih proteinov kot Isochorismatase domain-containing protein 2 (ISOC2) – slabo poznan človeški protein, ki vsebuje izohorizmatazno domeno in interagira z zaviralcem tumorjev p16INK4a.

Zaenkrat še ni znano ali je ISOC2 regulator p16INK4a. V primeru da ima takšno vlogo, bi bil nova potencialna tarča za razvoj nove strategije za zdravljenje raka in staranja, ligand 1 pa prva znana mala molekula, ki se nanj specifično veže. Za namen podrobnejše karakterizacije interakcije in vitro smo v okviru tega dela pripravili tudi sistem za izražanje človeškega ISOC2 v bakteriji *E. coli*. Analiza rekombinantnega proteina s kromatografijo z ločevanjem po velikosti je pokazala, da je rekombinanten protein najverjetneje homodimer, po čemer se razlikuje od svojih homologov, ki so večinoma homotetrameri.

Optimizacija testov biološke aktivnosti encimov, zanimivih za kozmetično industrijo

Pia Trošt, Petra Tavčar Verdev, Marko Dolinar

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Mentorja: Marko Dolinar, Petra Tavčar Verdev

Pomembno vlogo pri staranju kože imajo encimi, ki sodelujejo pri sintezi melanina, ali razgrajujejo komponente zunajceličnega matriksa. Mnogi izmed teh encimov so prisotni v vrhnjih plasteh kože, kjer lahko nanje vplivamo z nanosom kozmetičnih izdelkov z aktivnimi sestavinami. V mnoge kozmetične izdelke kot učinkovine dodajajo inhibitorje encimov, ki vplivajo na stanje in izgled kože. Za odkrivanje potencialnih novih inhibitorjev je ključnega pomena razvoj enostavnih in robustnih testov za določanje encimske aktivnosti.

V raziskovalni nalogi smo optimizirali test aktivnosti za dva encima, ki sodelujeta pri staranju kože, in sicer tirozinazo ter hialuronidazo. V obeh primerih smo si kot osnovno izbrali spektrofotometrični test, saj ima preprost postopek izvedbe in omogoča enostavno detekcijo signala tudi pri velikem številu vzorcev. Najprej smo izmerili aktivnost posameznih encimov brez prisotnosti inhibitorja, s čimer smo določili koncentracijo encima, ki daje signal ustrezne intenzitete. Te teste smo nato ponovili v prisotnosti že znanega inhibitorja encima in tako določili njegovo učinkovitost. Pri testu aktivnosti tirozinaze smo testirali različne koncentracije encima, barvila TMB (tetrametilbenzidin) in Ag⁺ ionov. Na podlagi meritev smo pripravili optimiziran postopek, ki smo ga validirali še z meritvami inhibitornega učinka kodžijske kisline (angl. kojic acid), ki je znan inhibitor tirozinaze. Pri testu aktivnosti hialuronidaze smo testirali različne čase inkubacije in koncentracije karbocianinskega barvila »Stains-all« ter hialuronske kisline, ki v reakciji deluje kot substrat. Validacijo optimiziranega postopka smo izvedli z meritvami inhibitornega učinka apigenina, ki inhibira širok nabor hialuronidaz. Z uporabo teh testov je mogoče določiti aktivnost novih inhibitorjev in primerjati njihovo učinkovitost z že znanimi inhibitorji teh encimov.

Analiza genetske variabilnosti na mestih izrezovanja intronov pri selekcioniranih linijah miši za debelost in vitkost

Matevž Žula¹, Martin Šimon¹, Nicholas M. Morton², Simon Horvat¹, Tanja Kunej¹

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za zootehniko

² Nottingham Trent University, Centre for Systems Health and integrated Metabolic Research, Clifton Campus

Mentorja: Tanja Kunej, Martin Šimon

Debelost je kompleksna bolezen, ki vključuje številne genetske in okoljske dejavnike. Z razvojem debelosti so povezali različne mehanizme, med drugim tudi alternativno izrezovanje intronov (angl. alternative splicing). Genetska variabilnost v zaporedju izrezovalnih mest intronov (angl. splice region) je povezana s številnimi boleznimi, vendar v povezavi z debelostjo še ni bila sistematično preučena, kar predstavlja vrzel v trenutnem razumevanju genetskega ozadja debelosti. Cilj naše raziskave je zato bil identificirati polimorfizme posameznega nukleotida (SNP-je), ki se nahajajo v donorski in akceptorski izrezovalni regiji intronov na ravni celotnega genoma na modelu miši, ki bi lahko potencialno vplivali na debelost ali vitkost.

Za namene študija debelosti so vzredili dva edinstvena mišja modela, debelo linijo (FLI; angl. Fat line) in vitko linijo (FHI; angl. Lean line) ter izvedli genomsko sekvenciranje. Iz teh rezultatov smo izbrali linijsko specifične SNP-je, ki se nahajajo v izrezovalnih mestih. Prioritizacijo zanesljivejših kandidatnih lokusov za debelost smo izvedli z bioinformacijsko analizo različnih setov podatkov, kot so genomska lokacija, biotip gena in različice, vrednost GERP (Genomic Evolutionary Rate Profiling) in njihov vpliv na izražanje genov.

Skupno se na mestih donorjev in akceptorjev izrezovalnih mest nahaja 697 SNP-jev v 500 genih. S postopkom izbiranja po prioriteti smo določili 14 SNP-jev, ki bi potencialno lahko vplivali na alternativno izrezovanje intronov in nalaganje maščobe. Različice na obeh izrezovalnih mestih introna je vsebovalo 12 genov, med njimi Gm41561. Ena izmed različic akceptorske regije se prekriva z dvema genoma; Pgr1a in Gm42742.

Razvoj inovativnih biosenzorjev za detekcijo virusne aktivnosti z uporabo orodij sintezne biologije

Maša Bratkovič¹, Zoja Jesih¹, Alenka Mozer¹, Taja Železnik Ramuta²

¹ Gimnazija Vič

² Kemijski inštitut

Mentorici: Alenka Mozer, Taja Železnik Ramuta

Pandemija SARS-CoV-2 je ponovno pokazala velik pomen diagnostike virusnih okužb. Trenutno uveljavljene metode za odkrivanje virusov zahtevajo veliko časa in so običajno neuspešne pri detekciji mutiranih virusov, zato biosenzorji predstavljajo alternativen pristop. Eden od naravnih sistemov za odkrivanje virusov je inflamatom CARD8. Namen naše študije je bil razviti biosenzor za detekcijo virusov, pri čemer smo s pristopi sintezne biologije preoblikovali molekulo CARD8. Z uporabo molekularnega kloniranja, konfokalne mikroskopije in celičnih kultur smo zasnovali in preizkusili biosenzor, sestavljen iz senzorske komponente (t.j. modificiran CARD8) in encimske komponente (t.j. sistem z razcepljenim encimom). Najprej smo rekonstruirali aktivnost inflamatom CARD8 v celični liniji HEK293T, ki se pogosto uporablja pri razvoju biosenzorjev, vendar naravno ne izraža inflamatom CARD8. Transfekciji biosenzorja v celice HEK293T in aktivatorju je sledila proteolitična cepitev in oligomerizacija CARD8, kar je privedlo do rekonstrukcije razcepljenega encima, čigar delovanje nam je omogočilo merjenje aktivnosti biosenzorja. Razvili smo dva biosenzorja; v prvem primeru je bil CARD8 spojen z razcepljeno beta-laktamazo (CARD8-TEV-splitBetaLac), v drugem primeru pa z razcepljeno luciferazo (CARD8-TEV-splitLuc). Medtem ko senzor CARD8-TEV-splitBetaLac ni ustrezno zaznal aktivnosti virusne proteaze, je senzor CARD8-TEV-splitLuc uspešno zaznal delovanje proteaz HIV in TEV. Prednost biosenzorja CARD8-TEV-splitLuc je v tem, da ne zaznava specifičnega virusnega zaporedja, temveč samo aktivnost virusne proteaze, s čimer je neodvisen od virusnih mutacij. Poleg tega je biosenzor modularen, saj ga je mogoče prilagoditi za zaznavanje katerekoli virusne proteaze. Tovrstni senzorji bi se lahko uporabljali tako v diagnostiki, kot tudi pri razvoju protivirusnih zdravil, usmerjenih proti virusnim proteazam.

Vloga sekundarnih struktur DNK vijačnice pri zdravljenju genetskega raka

Živa Kocman¹, Anita Kotar², Alenka Mozer¹

¹ Gimnazija Vič

² Kemijski inštitut

Mentorici: Anita Kotar, Alenka Mozer

Ko je v DNK vijačnici baza gvanin prisotna v visokih koncentracijah lahko tvori edinstveno sekundarno strukturo, ki se imenuje G-kvadrupleks. Dosedanje raziskave so pokazale, da imajo G-kvadrupleksi pomemben vpliv na izražanje naših genov. To je zelo zanimivo v kontekstu raka, saj so višje koncentracije gvanina ponavadi prisotne prav v onkogenih.

V promotorski regiji gena EGFR, ki nadzoruje njegovo aktivnost, smo se osredotočili na štiri regije bogate z gvaninom. Želeli smo ugotoviti ali so ti G-kvadrupleksi dovolj stabilni, da regulirajo aktivnost gena EGFR. Prav tako smo želeli ugotoviti, ali temperatura vpliva na stabilnost G-kvadrupleksov. Če je tako, bi lahko potencialno izkoristili to sposobnost pri alternativnem zdravljenju raka.

Po testiranju in analiziranju rezultatov, smo odkrili, da dve zaporedji tvorita G-kvadrupleks, ki je tako stabilen, da ustavi DNK polimerazo pri sintezi novih delov DNK. Prav tako smo odkrili, da so G-kvadrupleksi manj stabilni pri višji temperaturi, saj je DNK polimeraza bila zaustavljena prej pri nižji temperaturi.

Z uporabo G-kvadrupleksov bi lahko razvili posebej prilagojene ligande (molekule, ki se specifično vežejo na te strukture), ki bi bodisi inducirali G-kvadrupleks ali stabilizirali že obstoječega. To bi lahko vodilo k natančnejšim in učinkovitejšim terapijam proti raku, ciljno usmerjenim samo na rakave celice, ne da bi prizadele zdrave. Ta način zdravljenja raka bi lahko premagal omejitve trenutnih zdravljenj raka ter nudil upanje za bolj ciljno usmerjene in uspešne intervencije proti raku. Pristop bi lahko bil tudi posplošen in se uporabil na več genih kot le na EGFR.

LAPANJETOVI NAGRAJENCI

za leto 2024

Lapanjetova plaketa:
doc. dr. Ajda TALER-VERČIČ

Lapanjetovo priznanje:
dr. Duško LAINŠČEK

Lapanjetovo priznanje mladim:
dr. Anastasija PANEVSKA

Lapanjetovo priznanje mladim:
doc. dr. Tjaša LUKAN

Izboljšava orodij za urejanje genoma za razvoj naprednih metod genske terapije

Duško Lainšček^{1,2,3}

¹ *Kemijski inštitut, Odsek za sintezno biologijo in imunologijo*

² *EN-FIST Center odličnosti*

³ *Center za tehnologije genske in celične terapije*

Sistem CRISPR/Cas, za katerega je bila leta 2020 podeljena tudi Nobelova nagrada za kemijo, predstavlja revolucionarno orodje, ki je bilo odkrito kot imunski sistem bakterij, s katerim se slednje ščitijo pred virusi, omogoča pa tarčno spremembo genoma na osnovi izbrane gRNA, ki dobro deluje tudi na sesalskih celicah. To lastnost s pridom izkoriščamo v raziskavah, izboljšani produkciji hrane, biogoriv, v zadnjem času pa pridobiva na veljavi priprava novih zdravil, ki lahko pozdravijo neposreden vzrok različnih bolezni, tako raka kot drugih bolezni z genetskim ozadjem. Dvokomponentni sistem CRISPR/Cas sestavlja encim Cas9 ter majhna RNA, ki usmerja endonukleazo Cas9 na točno določeno tarčno zaporedje DNA, ki ga želimo spremeniti. Danes poteka več kot 100 kliničnih raziskav za zdravljenje številnih bolezni z uporabo CRISPR, eno gensko zdravilo za zdravljenje srpaste celične anemije je že odobreno, prej kot v desetletju po odkritju principa CRISPR.

Omenjen sistem z velikim potencialom je kljub izjemni uporabnosti mogoče še izboljšati. Lahko povečamo učinkovitost tarčnega izbivanja genov, tarčne integracije terapevtskih transgenov, lahko pa spreminjam tudi delovanje novih urejevalcev, kot so bazni urejevalci ali prime urejevalci na osnovi sistema CRISPR/Cas. Povečanje učinkovitosti sistema CRIPR za namene tarčne integracije in izbivanja genov je možno tudi z uporabo eksonukleaz. Protein Cas9 smo preko obvitih vijačnic povezali z eksonukleazami, encimi, ki skrajšujejo verigo DNK od mesta cepitve, kar smo poimenovali CCExo*. Tvorba obvite vijačnice omogoči premik eksonukleaze k mestu DNA preloma, kar povzroči dodatno odstranitev nukleotidov z obeh koncev preloma. Slednje prepreči, da bi celici lastni mehanizmi prelom DNA popravili brez spremembe, kar izboljša delež izbitja gena na točno določenem mestu. Robustno delovanja sistema CCExo smo raziskovalci potrdili na številnih celičnih linijah in različnih genih, terapevtsko aplikacijo pa dokazali na zdravljenju raka kronične mieloične levkemije. Ob sočasni modifikaciji matrice DNA za tarčno integracijo z vstavitvijo Cas prepoznavnih sekvenc in uporabi sistema CCExo lahko znatno povečamo tudi delež tarčne integracije terapevtskega transgena, npr. zapis za receptor CAR-T.

Naši rezultati predstavljajo pomemben del mozaika tehnološke platforme za napredno in personalizirano zdravljenje, ki ga razvijamo na Kemijskem inštitutu in ga želimo nadgraditi v Center za tehnologijo genske in celične terapije in s tem omogočiti dostop do sodobnih učinkovitih metod zdravljenja za številne bolezni.

* Lainšček, D., Forstnerič, V., Mikolič, V. et al. Coiled-coil heterodimer-based recruitment of an exonuclease to CRISPR/Cas for enhanced gene editing. *Nat Commun* 13, 3604 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31386-1>

Protein membrane interactions in nature and synthetic cells

Anastasija Panevska

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Biology is inherently complex, but we can study its fundamental processes by using minimal model systems to mimic cellular behavior. The attack/defense mechanism can rely on proteins punching cells. We investigated a nature derived pore forming complex and how it interacts with lipid membranes. By adding aegerolysins externally to lipid vesicles, we observed their strong binding to the most abundant insect lipid. When combined with the MACPF-domain protein PlyB, aegerolysins create bi-component pores that selectively disrupt membranes, particularly in insect cells. This mechanism has been applied to develop next-generation biopesticides, offering a sustainable strategy for crop protection.

To further mimic natural cellular processes, we encapsulate essential proteins within lipid vesicles. This simplified system allows us to investigate fundamental life events, such as cell division. The miracle of life begins with this process, and we aim to replicate it using Fts proteins, which are key to bacterial cell division. By reconstituting these proteins inside vesicles and reshaping them, we strive to induce full constriction and division through Fts filament dynamics. This minimal model of synthetic division sheds light on the core mechanisms of cellular division, with potential applications ranging from fundamental biological insights to the development of innovative drug delivery systems.

Nove tehnologije za preučevanje molekularnih mehanizmov, pomembnih za odpornost rastlin na stres

Tjaša Lukan

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Krompir, v prehrani tretja najpomembnejša poljščina na svetu, je izjemno občutljiv na številne stresne dejavnike iz okolja. Naša skupina išče rešitve za zmanjšanje izgub pridelka krompirja zaradi škodljivih organizmov in vremenskih ekstremov, ki lahko močno prizadenejo pridelek. Ključno je poznavanje mehanizmov, zaradi katerih so določene sorte bolj odporne kot druge. Mehanizme odpornosti smo preučevali na krompirju v interakciji z virusom PVY, ki sodi med deset ekonomsko najpomembnejšimi rastlinskih virusov, saj okužba krompirja na polju lahko vodi v 80-% izgubo pridelka.

Tradicionalno so celično smrt obravnavali kot ključno za zaustavitev širjenja patogena. Naše raziskave pa so pokazale, da je celična smrt, ki nastane v interakciji med krompirjem in PVY, ločena od mehanizmov odpornosti, ki vodijo do zaustavitve širjenja virusa in odkrili mehanizme omenjenih procesov.

Razvili smo senzorske rastline krompirja, ki omogočajo spremljanje oksidirajočega okolja v rastlinskih celicah v živo z veliko časovno in prostorsko ločljivostjo. Pokazali smo, da so reaktivne kisikove spojine, ki nastanejo v kloroplastih po okužbi, vključene v več različnih procesov odziva rastlin, ki so prostorsko uravnavani. Odkrili smo "signalizacijske celice", celice z oksidiranimi kloroplasti dlje od območja okužbe, ki dokazujejo prenos signala odpornosti na sosednje tkivo in tako omogočajo odpornost krompirja na virusno okužbo.

Poleg tega smo vzpostavili metodo za spreminjanje genoma krompirja s pomočjo CRISPR/Cas9. Tehniko smo uporabili za uravnavanje izražanja malih RNA, s čimer smo odprli nove možnosti uporabe te tehnologije za preučevanje vloge genov v krompirju in ostalih poliploidnih rastlinah.

Mehanizme odpornosti smo preučevali tudi v interakciji krompirja z endofiti, ki izkazujejo velik potencial za zaščito rastlin pred neugodnimi biotskimi in abiotskimi stresnimi dejavniki, kar je ključnega pomena za razvoj novih, okolju prijaznih sistemov za zaščito rastlin. Odkrili smo mehanizme, ki so vključeni v nastanek biofilma na koreninah in mehanizme, vključene v vzdrževanja populacije endofitne bakterije *Bacillus subtilis* znotraj rastline.