

**BIO**molekularec.si

Dan biomolekularnih znanosti



**Zbornik povzetkov**

Ljubljana, 22. september 2016

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

577.2(082)(0.034.2)

DAN biomolekularnih znanosti (2016 ; Ljubljana)

Zbornik povzetkov [Elektronski vir] / BIOMolekularec.si [tudi] Dan biomolekularnih znanosti, Ljubljana, 22. september 2016 ; [organizator prireditve Slovensko biokemijsko društvo ; uredniki Aljoša Bavec ... et al.]. - El. knjiga. - Ljubljana : Slovensko biokemijsko društvo, 2016

Način dostopa (URL): <http://biomolekularec.si/zbornik16.pdf>

ISBN 978-961-93879-2-4 (pdf)

1. Bavec, Aljoša 2. Slovensko biokemijsko društvo  
286331904

**DAN BIOMOLEKULARNIH ZNANOSTI**  
**Biomolekularec 2016**

**Organizator:**

Slovensko biokemijsko društvo

**Kraj prireditve:**

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

**Uredniki:**

Aljoša Bavec, Aleš Berlec, Blaž Cigić, Marko Dolinar, Bojan Doljak

**Računalniško oblikovanje:**

Aljoša Bavec

**Založil:**

Slovensko biokemijsko društvo

**Tisk:**

Uičakar&JK

**Programski in organizacijski odbor:**

Aljoša Bavec (predsednik)

Aleš Berlec

Blaž Cigić

Marko Dolinar

Bojan Doljak

**Splet:**

<http://biomolekularec.si/zbornik16.pdf>

Ljubljana, 2016

---

## PROGRAM SREČANJA

8:15-8:30 Otvoritev: Janko Kos, predsednik Slovenskega biokemijskega društva

### Sekcija 1

*Vodja sekcije: Aljoša Bavec*

- 8:30-8:45 Marko Goličnik: Paraoksonaza - encim z imenom, ki ne ustreza njegovi funkciji
- 8:45-8:55 Urška Pevec: Hormonski receptorji in njihov vpliv na lastnosti raka dojke
- 8:55-9:05 Eva Jarc: Ali so lipidne kapljice v stičišču metaboličnih okvar in vnetnih procesov v celicah raka dojke?
- 9:05-9:15 Borut Šketa, Lucija Parkelj: Načrtovana proteinska mreža kot perspektiven pameten nanomaterial
- 9:15-9:25 Ana Halužan Vasle, Ana Milovanović: Načrtovanje umetnih genskih omrežij
- 9:25-9:35 Pogovor z Andrejem Podobnikom, prejemnikom državne nagrade za izjemne dosežke na področju srednjega šolstva za leto 2015
- 9:35-9:55 Odmor

### Sekcija 2

*Vodja sekcije: Marko Dolinar*

- 9:55-10:10 Gregor Gunčar: Struktura in uporaba nanoteles
- 10:10-10:20 Tjaša Goričan: Identifikacija in karakterizacija novih alosteričnih efektorjev katepsina K
- 10:20-10:30 Ana Mitrović: Uporaba derivatov nitroksolina za regulacijo aktivnosti katepsina B
- 10:30-10:40 Tristan Kovačič, Domen Kulovec, Uroš Prešern: Aktivno ciljanje cisteinskih katepsinov z liposomi, konjugiranimi s cistatinom C
- 10:40-10:50 Mariša Cvitanič, Aleš Zupančič: Od odpadkov do goriva: gensko spremenjena *E. coli* za trajnostno proizvodnjo biobutanola iz organskih odpadkov
- 10:50-11:00 Pogovor z Miho Pavšičem, raziskovalcem in gornikom
- 11:00-11:20 Odmor

### Sekcija 3

Vodja sekcije: Aleš Berlec

- 11:20-11:35 Marko Fonović: Eksperimentalni pristopi k študiju proteaz in njihove fiziološke vloge
- 11:35-11:45 Katja Lužar: Površinska predstavitev evazinov na rekombinantnih mlečnokislinskih bakterijah *Lactococcus lactis*
- 11:45-11:55 Angelika Vižintin: Priprava samomorilskega genetskega stikala za obvladovanje cianobakterije *Synechocystis sp. PCC 6803*
- 11:55-12:05 Tjaša Kitanovski: Opis, priprava in učinkovitost bakteriofaga PC14, specifičnega za *Campylobacter jejuni*
- 12:05-12:15 Jerneja Nimac, Anže Vozelj: Ovrednotenje jakosti različnih kvasnih promotorjev s pomočjo molekularno-bioloških tehnik
- 12:15-12:25 Pogovor z Nejcem Škobernetom, direktorjem podjetja Genialis
- 12:25-13:25 Odmor za kosilo

### Sekcija 4

Vodja sekcije: Bojan Doljak

- 13:25-13:40 Stanislav Gobec: Razvoj novih zaviralcev holin esteraz za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni
- 13:40-13:50 Klemen Dolinar: Vpliv sestave medija na delovanje aktivatorjev AMPK v celičnih kulturah
- 13:50-14:00 Nina Roštan: Analiza vpliva različnih koncentracij vitamina C in glutationa na preživetje celic raka dojke MDA-MB-231
- 14:00-14:10 Anja Dremelj, Anja Pirih: Vpliv glukoze na celično preživetje po elektroporaciji
- 14:10-14:20 Anže Šumah, Lejla Šabić: Možnost uporabe barvil, pridobljenih iz vrst alg *Chlorella vulgaris* in *Scenedesmus sp.*, v elektrokemijskih sončnih celicah
- 14:20-14:30 Pogovor z Matejo Prunk, raziskovalko in akademsko flavtistko
- 14:30-14:50 Odmor

## **Sekcija 5**

*Vodja sekcije: Blaž Cigić*

14:50-15:05 David Stopar: Biofilmi

15:05-15:15 Anja Pecman: Odkrivanje virusov v okoljskih vodah s sekvenciranjem naslednje generacije

15:15-15:25 Katarina Šoln: Listni ekstrakti invazivnih dresnikov (*Fallopia sp.*) sprožijo oksidativni stres pri testnih rastlinah

15:25-15:35 Sara Jamnik, Helena Perić: Prehransko dopolnilo iz soka granatnega jabolka

15:35-15:45 Gabriela Štumberger: Vpliv treh pesticidov na heterotrofne talne mikroorganizme

15:45-15:55 Pogovor z Gašperjem Grubelnikom, absolventom magistrskega študija Mikrobiologije in organizatorjem Mikrobiološke poletne šole

15:55-16:30 Odmor

### od 16:30 **Podelitev Lapanjetovih nagrad in skupščina SBD**

Skupščina Slovenskega biokemijskega društva, podelitev Lapanjetovih nagrad in predavanja nagrajencev:

Peter Maček - Lapanjetova nagrada

Mojca Mattiazzi Ušaj - Lapanjetovo priznanje

Marija Žakelj Mavrič - Lapanjetova plaketa

Družabni večer



## KAZALO POVZETKOV

|  |    |
|--|----|
| POVZETKI PREDAVANJ   | 11 |
| <i>Marko Goličnik</i>  |    |
| Paraoksonaza - encim z imenom, ki ne ustreza njegovi funkciji  | 13 |
| <i>Urška Pevec, Mateja Cigoj, Nataša Debeljak</i>  |    |
| Hormonski receptorji in njihov vpliv na lastnosti raka dojke   | 14 |
| <i>Eva Jarc, Anja Pucer Janež, Vesna Brglez, Thomas O. Eichmann, Robert Zimmermann, Toni Petan</i>   |    |
| Ali so lipidne kapljice v stičišču metaboličnih okvar in vnetnih procesov v celicah raka dojke?  | 15 |
| <i>Borut Šketa, Lucija Parkelj, Alenka Mozer, Roman Jerala, Helena Gradišar, Nino Bašič</i>  |    |
| Načrtovana proteinska mreža kot perspektiven pameten nanomaterial  | 16 |
| <i>Ana Halužan Vasle, Ana Milovanović, Mojca Alif, Tina Lebar</i>  |    |
| Načrtovanje umetnih genskih omrežij  | 17 |
| <i>Gregor Gunčar</i>   |    |
| Struktura in uporaba nanoteles   | 18 |
| <i>Tjaša Goričan, Nejc Petek, Jurij Svete, Marko Novinec</i>   |    |
| Identifikacija in karakterizacija novih alosteričnih efektorjev katepsina K  | 19 |
| <i>Ana Mitrović, Bojana Mirković, Izidor Sosič, Damijan Knez, Stanislav Gobec, Janko Kos</i>   |    |
| Uporaba derivatov nitroksolina za regulacijo aktivnosti katepsina B  | 20 |
| <i>Tristan Kovačič, Domen Kulovec, Uroš Prešern, Branka Klemenčič, Lovro Kramer, Andreja Bratovš, Boris Turk</i>   |    |
| Aktivno ciljanje cisteinskih katepsinov z liposomi, konjugiranimi s cistatinom C   | 21 |
| <i>Mariša Cvitanič, Nina Jerala, Domen Kulovec, Ana Milovanović, Zala Sekne, Jernej Šavli, Anže Vozelj, Aleš Zupančič, Marina Klemenčič, Marko Dolinar, Ilja Gasan Osojnik Črnivec, Albin Pintar</i> |    |
| Od odpadkov do goriva: gensko spremenjena <i>E. coli</i> za trajnostno proizvodnjo biobutanola iz organskih odpadkov   | 22 |
| <i>Marko Fonović</i>   |    |
| Eksperimentalni pristopi k študiju proteaz in njihove fiziološke vloge   | 23 |
| <i>Katja Lužar, Borut Štrukelj, Aleš Berlec</i>  |    |
| Površinska predstavitev evazinov na rekombinantnih mlečnokislinskih bakterijah <i>Lactococcus lactis</i>   | 24 |
| <i>Anja Tanšek, Aneja Tahirović, Angelika Vižintin, Jernej Mustar, Vita Vidmar, Helena Čelešnik, Marko Dolinar</i>   |    |
| Priprava samomorilnega genetskega stikala za obvladovanje cianobakterije <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803   | 25 |
| <i>Tjaša Kitanovski, Jerca Kristan, Janja Pust, Matjaž Peterka, Eva Zaletel</i>  |    |
| Opis, priprava in učinkovitost bakteriofaga PC14, specifičnega za <i>Campylobacter jejuni</i>  | 26 |
| <i>Jerneja Nimac, Anže Vozelj, Aleksander Medveš, Darjan Andrejc</i>   |    |
| Ovrednotenje jakosti različnih kvasnih promotorjev s pomočjo molekularno-bioloških tehnik  | 27 |

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Stanislav Gobec</i>   |           |
| Razvoj novih zaviralcev holin esteraz za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni   | 28        |
| <i>Klemen Dolinar, Mojca Pavlin, Alexander V. Chibalin, Sergej Pirkmajer</i>   |           |
| Vpliv sestave medija na delovanje aktivatorjev AMPK v celičnih kulturah  | 29        |
| <i>Nina Roštan, Maruša Rajh, Mojca Pavlin</i>  |           |
| Analiza vpliva različnih koncentracij vitamina C in glutationa na preživetje celic raka dojke MDA-MB-231   | 30        |
| <i>Anja Dremelj, Anja Pirih, Alenka Mozer, Alenka Maček-Lebar</i>  |           |
| Vpliv glukoze na celično preživetje po elektroporaciji   | 31        |
| <i>Anže Šumah, Lejla Šabić, Katja Stopar, Mateja Hočevar</i>   |           |
| Možnost uporabe barvil, pridobljenih iz vrst alg <i>Chlorella vulgaris</i> in <i>Scenedesmus sp.</i> , v elektrokemijskih sončnih celicah            | 32        |
| <i>David Stopar</i>  |           |
| Biofilmi   | 33        |
| <i>Denis Kutnjak, Anja Pecman, Ion Gutiérrez-Aguirre, Nataša Mehle, Nastja Pavlič, Magda Tušek Žnidarič, Nejc Rački, Matevž Rupar, Maja Ravnikar</i> |           |
| Odkrivanje virusov v okoljskih vodah s sekvenciranjem naslednje generacije   | 34        |
| <i>Katarina Šoln, Jasna Dolenc Koče</i>  |           |
| Listni ekstrakti invazivnih dresnikov ( <i>Fallopia sp.</i> ) sprožijo oksidativni stres pri testnih rastlinah                                       | 35        |
| <i>Sara Jamnik, Helena Perić, Alenka Mozer, Mihaela Skrt, Nataša Poklar Ulrich</i>   |           |
| Prehransko dopolnilo iz soka granatnega jabolka  | 36        |
| <i>Gabriela Štumberger, Katja Holnthaner Zorec</i>   |           |
| Vpliv treh pesticidov na heterotrofne talne mikroorganizme   | 37        |
| <b>OSTALI POVZETKI</b>   | <b>39</b> |
| <i>Ana Krišelj, Nežka Kavčič, Katarina Pegan, Boris Turk</i>   |           |
| Uporaba različnih metod za dokazovanje prisotnosti reaktivnih kisikovih zvrsti v živih celicah   | 41        |
| <i>Danijela Vočanec, Tinkara Prijatelj, Nataša Debeljak, Tanja Kunej</i>   |           |
| Mutacijska analiza genov za <i>EPO</i> in <i>EPOR</i> pri družinski eritrocitozi: klinični primer  | 42        |
| <i>Erik Mršnik, Marko Novinec</i>  |           |
| Analiza potencialnih alosteričnih efektorjev katepsinov V in S na podlagi homologije alosteričnih mest s katepsinom K                                | 43        |
| <i>Jernej Vidmar, Tomaž Žagar, Živa Moravec, Aljaž Gaber, Miha Pavšič, Brigita Lenarčič</i>  |           |
| Načrtovanje in priprava konstruktov za analizo dimerizacije proteinov EpCAM in Trop2   | 44        |
| <i>Jure Zabret, Marina Klemenčič, Marko Dolinar</i>  |           |
| Ortokaspaze - kaspazam podobni encimi pri bakterijah   | 45        |
| <i>Maja Križnik, David Dobnik, Špela Baebler, Marko Petek, Jana Žel, Kristina Gruden</i>   |           |
| Vloga malih RNA pri obrambnem odgovoru krompirja na okužbo z virusom Y krompirja   | 46        |
| <i>Maruša Rajh, Klemen Dolinar, Katarina Miš, Mojca Pavlin, Sergej Pirkmajer</i>   |           |
| Učinek metformina na celice raka dojke v razmerah <i>in vitro</i> je odvisen od koncentracije glukoze v gojišču                                      | 47        |



---

|   |    |
|---|----|
| <i>Mateja Prunk, Milica Perišić Nanut, Jerica Sabotič, Janko Kos</i><br>Vpliv cistatina F na delovanje citotoksičnih limfocitov T   | 48 |
| <i>Nina Strah, Nežka Kavčič, Katarina Pegan, Boris Turk</i><br>Vpliv butilhidroksianizola na signalne poti, sprožene s citokinom TNF- $\alpha$ , na celični liniji<br>človeškega adenokarcinoma debelega črevesa          | 49 |
| <i>Nives Škorja, Maruša Rajh, Klemen Dolinar, Katarina Miš, Mojca Pavlin, Sergej Pirkmajer</i><br>Vpliv metformina na energijsko presnovo v celicah raka dojke in raka prostate   | 50 |
| <i>Petra Vivod, Irena Oven, Nejc Bravničar</i><br>Filogenija mutacij virusa Ebola   | 51 |
| <i>Tadej Ulčnik, Marko Novinec</i><br>Funkcijska analiza nekaterih mutant katepsina K   | 52 |
| <i>Tjaša Lukan, Anna Coll, Špela Baebler, Kristina Gruden</i><br>Analiza promotorskih zaporedij genov signalizacijskega omrežja v interakciji med<br>krompirjem in virusom PVY  | 53 |
| <i>Vid Jan, Katarina Miš, Urška Matkovič, Zoran Grubič, Matej Podbregar, Sergej Pirkmajer,<br/>Tomaž Marš</i><br>Človeške mišične celice kot model za sodobne biomolekularne raziskave živčno-mišičnih<br>obolenj         | 54 |
| <i>Vito Mihael Savinek, Benedetto Ruperti</i><br>Vpliv različnih pogojev skladiščenja na ekspresijo antioksidativnih genov v jabolkah   | 55 |
| <i>Klavdija Bastl, Rok Gorenšek, Jožica Kovač, Majda Kamenšek Gajšek</i><br>Biolško aktivne snovi v plodovih aronije ( <i>Aronia melanocarpa</i> ) in njihov vpliv na rast<br>kvasovk ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) | 56 |
| <i>Luka Gajšt, Kaja Ivanc, Alma Kapun Dolinar, Marko Jeran</i><br>Nastanek kemiluminiscenčne svetlobe in njen prehod skozi celično membrano evkariontov   | 57 |
| <i>Krištof Fortuna, Tončka Požek-Novak, Bojan Doljak</i><br>Proučevanje inhibitorjev katepsina X <i>in vitro</i> z merjenjem fluorescence   | 58 |
| <i>Ana Štuhec, Zdenka Keuc, Urban Bren, Eva Brglez Mojzer</i><br>Računalniške simulacije karcinogeneze $\beta$ -propiolaktona   | 59 |
| <i>Tiana Karmen Kokalj, Ana Menegaliya, Sonja Artač, Maja Gerden, Nežka Kavčič, Boris<br/>Turk, Katarina Pegan</i><br>Vpliv resveratrola na rast in razvoj rakavih celic  | 60 |
| LAPANJETOVI NAGRAJENCI  | 61 |
| <i>Peter Maček</i><br>Prejemnik Lapanjetove nagrade za leto 2016<br>Kaj imajo skupnega aktinoporini in egerolizini?   | 63 |



# **POVZETKI PREDAVANJ**



**Paraoksonaza - encim z imenom, ki ne ustreza njegovi funkciji**

Marko Goličnik

*Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani*

Paraokson je aktivni metabolit insekticida parationa, ki je bil sintetiziran v laboratorijih IG Farben leta 1940. Le 13 let kasneje je bil v serumu sesalcev odkrit encim; ti. A-esteraza, ki učinkovito hidrolizira ta nefiziološki substrat, in zaradi tega se je encima kmalu oprijelo ime paraoksonaza (PON). Po več kot 60 letih od odkritja tega encima je znano, da družino encimov PON najdemo le pri sesalcih, a fiziološka vloga teh encimov še vedno ni popolnoma pojasnjena. Najintenzivneje preučevan encim iz družine PON je paraoksonaza 1 (PON1), ki se sintetizira v jetrih in veže na lipoproteine visoke gostote. Pri tem daje slednjim posebne lastnosti, ki so zanimive predvsem iz kliničnega vidika. Zato se vloga PON1 v zadnjem času izredno intenzivno študira v povezavi s krvno-žilnimi in nevrodegenerativnimi boleznimi. V prispevku bo prikazan splošen pregled do danes znanih domnevnih vlog PON1; tj. encima za katerega pravzaprav zagotovo vemo le to, da njegovo ime ne opisuje njegove prave fiziološke funkcije.

## Hormonski receptorji in njihov vpliv na lastnosti raka dojke

Urška Pevec<sup>1</sup>, Mateja Cigoj<sup>1</sup>, Nataša Debeljak<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani*

<sup>2</sup> *Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani*

mentorica: Nataša Debeljak

Rak dojke je v razvitem svetu najpogostejši rak pri ženskah in zato pomemben javnozdravstveni problem. V Sloveniji vsako leto za rakom dojke zbolijo 1000 žensk; bolezen se redko pojavi tudi pri moških (1 % bolnikov). Več kot polovico primerov raka dojke je hormonsko odvisnih, to pomeni, da je za rast teh celic nujna prisotnost hormonov estrogena in progesterona. Hormonsko odvisen rak dojke zdravimo z zdravili, ki inhibirajo delovanje estrogenskih receptorjev, na primer s tamoksifenom. Terapija ni vedno uspešna; domnevajo, da na pojav rezistence vpliva prisotnost več drugih receptorjev. Raziskave na bolnicah s hormonsko odvisnim rakom dojke so pokazale slabši izid zdravljenja s tamoksifenom pri bolnicah z visokim izražanjem receptorja za eritropoetin. Receptor za eritropoetin veže hormon eritropoetin, ki spodbuja rast in preživetje različnih celic, tudi rakastih. Mehanizem so-izražanja receptorjev za eritropoetin in estrogen na pojav tamoksifenske rezistence še ni pojasnjen.

Namen naše naloge je, da z metodo prenosa Western (WB) preverimo prisotnost receptorjev za eritropoetin in estrogen v izbranih celičnih linijah raka dojke. Prenos Western je analitična metoda za detekcijo proteinov iz kompleksnih bioloških vzorcev. Kvalitetna analiza WB zahteva uporabo specifičnih protiteles, ki zaznajo le tarčne proteine in normalizacijo na ustrezno notranjo kontrolo, ki se v celici stalno izraža. Signale za tarčni protein normaliziramo na signale kontrolnega proteina in tako pridobimo rezultate, ki jih lahko med seboj primerjamo. Z izbranimi kvalitetnimi protitelesi bomo na celičnih linijah raka dojke določili nivo izražanja receptorjev za eritropoetin in estrogen. Izbrane celične linije, ki receptorja izražajo, in take, ki ju ne, bomo izpostavili tamoksifenu in primerjali njihovo preživelost.

Cilj naloge je, da izberemo ustrezne modelne celične linije raka dojke, ki nam bodo v prihodnje omogočile poglobljeno analizo mehanizma soizražanja receptorjev za eritropoetin in estrogen pri razvoju rezistence na tamoksifen.

## Ali so lipidne kapljice v stičišču metaboličnih okvar in vnetnih procesov v celicah raka dojke?

Eva Jarc<sup>1,2</sup>, Anja Pucer Janež<sup>1,2</sup>, Vesna Brglez<sup>1,2</sup>, Thomas O. Eichmann<sup>3</sup>, Robert Zimmermann<sup>3</sup>, Toni Petan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institut Jožef Stefan*

<sup>2</sup> *Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana*

<sup>3</sup> *Institut za molekularne bioznanosti, Gradec, Avstrija*

mentor: Toni Petan

Prekomerno kopičenje maščob in kronično vnetje sta značilna za metabolne in rakave bolezni. Odvečne maščobne kisline (MK) se v naših telesih shranjujejo v različnih tkivih v obliki netopnih triacilglicerolov (TAG) v t.i. lipidnih kapljicah (LK), iz katerih se MK po potrebi sproščajo. MK so tudi pomembni dejavniki vnetja, saj iz polinenasičenih MK (PNMK) nastanejo vnetne signalne molekule, t.i. eikozanoidi, ki obenem spodbujajo rast rakavih celic in uravnavajo povezane vnetne procese. Povečane količine LK in eikozanoidov so odkrili v različnih tumorskih celicah, vendar so povezave med LK, vnetnimi procesi in rakom še nepojasnjene.

Sekretorne fosfolipaze (sPLA2) so encimi, ki iz celičnih membran rakavih celic sproščajo različne nenasičene MK, vključno z omega-3 in omega-6 PNMK. Pred kratkim smo ugotovili, da sPLA2 spodbujajo tvorbo LK in s tem bistveno povečajo odpornost rakavih celic. Še posebej presenetljivo je bilo dejstvo, da je delovanje sPLA2 privedlo do kopičenja PNMK v LK. Vloga LK obogatene s PNMK je popolnoma neznana, predvidevamo pa, da LK uravnavajo sproščanje PNMK in s tem sintezo eikozanoidov ter vplivajo na vnetne in metabolične spremembe povezane z rakom.

Da bi ugotovili, ali so s sPLA2 inducirane LK obogatene s PNMK vir za sintezo eikozanoidov, smo se vprašali, ali preprečevanje razgradnje LK vodi k zmanjšani sintezi eikozanoidov. Najprej smo potrdili, da sPLA2 inducira sintezo eikozanoidov v celicah raka dojke. Z utišanjem encima ATGL, ki odceplja MK iz TAG, smo blokirali lipolizo in nato pomerili količino LK in nastalih eikozanoidov. Rezultati potrjujejo, da smo s tem preprečili razgradnjo LK in sintezo eikozanoidov. Pokazali smo torej, da so s sPLA2 inducirane LK pomemben vir za sintezo eikozanoidov v rakavih celicah. Rezultati obenem postavljajo LK v središče uravnavanja metabolizma maščob in jih povezujejo z vnetjem pri raku. Proces, ki uravnavajo kopičenje LK in njihovo razgradnjo s tem postajajo zanimive tarče za razvoj novih učinkovin za preprečevanje in zdravljenje raka.

## Načrtovana proteinska mreža kot perspektiven pameten nanomaterial

Borut Šketa<sup>1</sup>, Lucija Parkelj<sup>1</sup>, Alenka Mozer<sup>1</sup>, Roman Jerala<sup>2</sup>, Helena Gradišar<sup>2</sup>, Nino Bašič<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Gimnazija Vič

<sup>2</sup> Kemijski inštitut

<sup>3</sup> Fakulteta za matematiko in fiziko Univerze v Ljubljani

mentorji: Alenka Mozer, Roman Jerala, Helena Gradišar, Nino Bašič

Bionanotehnološke raziskave so v zadnjem času usmerjene predvsem v razvoj in sintezo novih bionanomaterialov z različnimi možnostmi uporabe. Molekularno samosestavljanje, kot glavni način organizacije v bioloških sistemih, nam omogoča pripravo novih proteinskih nanomaterialov, ki so pametni, prilagodljivi, biokompatibilni in biološko razgradljivi.

V naši raziskavi smo preučevali načrtovanje modela 2D proteinske kvadratne mreže, ki bi se samosestavila iz preprostih osnovnih gradnikov. Najprej smo preučili geometrijske značilnosti stabilne kvadratne mreže in poiskali ustrezne rešitve, temu je sledil prevod matematične rešitve v proteinsko mrežo, v kateri vsak rob predstavlja dimer ovite vijačnice. Z eksperimentom smo nato potrdili oblikovanje take mreže, in sicer s samosestavljanjem dveh osnovnih gradnikov – dveh polipeptidnih verig. Vsaka veriga je zgrajena iz štirih segmentov, ki tvorijo ovite vijačnice, in njihovo zaporedje je natančno določeno.

Polipeptide smo pripravili v celicah *Escherichia coli* in jih očistili. Ko zmešamo ekvimolarne raztopine proteinov, pride do samosestavljanja načrtovane mreže. Dobljene strukture smo karakterizirali z merjenjem parametrov zvitosti vijačnic, termične stabilnosti in velikosti delcev. Obliko samosestavljene strukture smo dokazali s transmisijem elektronskim mikroskopom. Rezultati dokazujejo uspešno pripravo načrtovane kvadratne mreže.

Potencialna uporaba tovrstnega tipa proteinskega nanomateriala je zelo obetavna, saj proteini omogočajo prilagoditev funkcionalnosti glede na želeno aplikacijo v medicini, farmacevtski industriji (ciljno vnašanje zdravil ali biomolekul, izdelovanje cepiv, inženiring tkiv) ter tudi v prehranski industriji za selektivne absorpcije, filtracije in biokatalize.



## Načrtovanje umetnih genskih omrežij

Ana Halužan Vasle<sup>1</sup>, Ana Milovanović<sup>1</sup>, Mojca Alif<sup>1</sup>, Tina Lebar<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *1. gimnazija v Celju*

<sup>2</sup> *Kemijski inštitut*

mentorici: Mojca Alif, Tina Lebar

Celice lahko prepoznavajo različne signale, ki se prenašajo preko transkripcijskih faktorjev. Ti nadzorujejo izražanje genov. Z vnosom genov za transkripcijske faktorje lahko obnašanje celice spremenimo tako, da se odzove na natančno določen način, in tako ustvarjamo umetna genska omrežja. Modularne DNK-vezavne proteine lahko načrtujemo za vezavo na katero koli zaporedje DNK in tako pripravimo različne proteine s podobnimi biokemijskimi lastnostmi v skoraj neomejenem številu, kar omogoča lažje načrtovanje kompleksnih genskih omrežij.

Do danes so bili v ta namen že uporabljeni TAL efektorji, katerih pomanjkljivosti so velikost, draga in počasna sinteza ter metabolna obremenitev celice pri vstavljanju večjega števila TAL efektorjev. V raziskovalni nalogi smo kot alternativo rešitev preizkusili sistem CRISPR/Cas, ki deluje prek vezave majhnih RNK molekul na DNK. Dokazali smo, da sta si oba sistema po delovanju zelo podobna, saj lahko v isti celici kombiniramo RNK molekule za tarčno ciljanje več vezavnih mest hkrati.

Naši rezultati kažejo, da bi bil sistem CRISPR/Cas potencialno uporaben za sestavljanje kompleksnih umetnih genskih omrežij. Ta predstavljajo nove možnosti za usmerjeno celično terapijo, razvoj novih biosenzorjev ter potencialno uporabo v metabolnem inženiringu. Uporaba sistema CRISPR/Cas bi zmanjšala metabolne obremenitve spremenjenih celic in omogočila hitrejšo, cenejšo in učinkovitejšo optimizacijo ter uporabo velikega števila regulatornih elementov hkrati.

## Struktura in uporaba nanoteles

Gregor Gunčar

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

Nanotelesa so majhni rekombinantni proteini, ki vežejo antigene. Izvirajo iz posebne vrste klasičnih protiteles, ki imajo le težko verigo in so jih našli le pri določenih vrstah živali, npr. kamelah, lamah, alpakah in morskih psih. So najmanjši del teh protiteles, ki še omogoča specifično vezavo na antigen in ima značilno imunoglobulinsko strukturo. Ker so majhni in stabilni, njihova zgradba pa ni preveč zapletena, jih lahko v večjih količinah proizvajamo v bakterijah. Zaradi vseh teh lastnosti so nanotelesa zelo uporabne molekule. Lahko jih uporabljamo za označevanje v diagnostiki, v dostavnih sistemih za zdravila, lahko pa so tudi sami biološka zdravila, saj s svojo specifično vezavo preprečijo interakcije med izbranimi molekulami. V naši raziskovalni skupini razvijamo senzorje na osnovi nanoteles, pripravili pa smo tudi nanotelesa, ki so povezana z drugimi proteini, ki omogočajo enostavno detekcijo na osnovi fluorescence ali encimske reakcije, ki jo katalizirajo. Za razvoj senzorjev na osnovi nanoteles smo uporabili nanotelesa, ki spoznajo kofein. Nanotelesa smo kovalentno povezali na nanožice, ki imajo veliko specifično površino, z merjenjem spremembe električnega toka pa lahko zaznamo že zelo majhne količine kofeina, ki se veže na nanotelesa. Določili smo tudi kristalno strukturo tega nanotelesa. Zanimivo je, da pri interakciji s kofeinom sodelujeta le dve od treh zank, ki so običajno vpletene v vezavo antigenov. Ugotovili smo, da se pri vezavi kofeina med seboj povežeta dve nanotelesi, ki vsak s svojima dvema zankama tvorita specifično vezavno mesto za kofein. Za vezavo kofeina so najbolj pomembni tirozini, katerih hidroksilna skupina s kofeinom tvori vodikovo vez, njihov aromatski obroč pa omogoča še pi-pi interakcije.

Drug del naših raziskav povezanih z nanotelesi je usmerjen v detekcijo in modulacijo delovanja proteina MLKL, ki je udeležen v posebnem tipu celične smrti, nekroptoz. Nanotelesa, ki spoznajo to molekulo smo povezali z različnimi fluorescenčnimi proteini, tako da lahko proteinu MLKL sledimo v živih celicah. Pripravili smo tudi nanotelo, ki je povezano z encimom alkalno fosfatazo, kar omogoče enostavno detekcijo še na druge načine. Trenutno raziskujemo, kako vezava nanoteles na MLKL vpliva na nekroptozo.

## Identifikacija in karakterizacija novih alosteričnih efektorjev katepsina K

Tjaša Goričan, Nejc Petek, Jurij Svete, Marko Novinec

*Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani*

mentorja: Jurij Svete, Marko Novinec

Katepsin K je papainu podobna cisteinska proteaza, ki se v visokih nivojih izraža v osteoklastih, celicah, ki v procesu preoblikovanja kosti odstranjujejo staro kostno tkivo. Je edina človeška kolagenaza, ki je sposobna cepiti trojno vijačnico kolagena tipa I na več mestih vzdolž molekule in je zato najpomembnejši encim pri procesu resorpcije kostnega matriksa. Hkrati je edina papainu podobna peptidaza, za katero so poznani mehanizmi alosterične regulacije. Povečano izražanje oz. aktivnost katepsina K je povezano s številnimi boleznimi, npr. osteoporozo, zato predstavlja pomembno tarčo za razvoj zdravil. Nekateri inhibitorji, ki se vežejo v aktivno mesto katepsina K, so že v razvoju kot potencialna zdravila za zdravljenje osteoporoze, a žal povzročajo neželene stranske učinke. Alternativa tem zdravilom bi lahko bila alosterična zdravila, ki bi se vezala na alosterična mesta katepsina K.

Namen dela je bil identificirati nove alosterične efektorje katepsina K in jih okarakterizirati. Med testiranimi spojinami so bili večinoma različno substituirani piroglutamati in piridini, za katere smo preko računalniškega modeliranja napovedali, da se vežejo na predpostavljena alosterična mesta na katepsinu K. Vse spojine smo testirali z merjenjem encimske aktivnosti katepsina K z uporabo različnih sintetičnih substratov in naravnega substrata kolagena tipa I. Spojinam, ki so vplivale na aktivnost katepsina K, smo določili kinetične parametre in testirali njihovo citotoksičnost, poskusili pa smo določiti tudi kristalne strukture njihovih kompleksov s katepsinom K. Vzpostavili smo tudi eksperimentalni sistem za testiranje učinkov spojin na aktivnost katepsina K v kulturi celic.

Poleg tega smo na osnovi kristalne strukture znanega efektorja, vezanega na alosterično mesto katepsina K, sintetizirali novo spojino z izboljšanimi lastnostmi. Testirali smo njen učinek na encimsko aktivnost katepsina K v prisotnosti različnih substratov in dokazali, da je imela večjo afiniteto vezave kot izhodiščna spojina in enak mehanizem delovanja kot znan alosterični inhibitor NSC13345, ki se veže na isto alosterično mesto na katepsinu K.

Na novo identificirane spojine predstavljajo osnovo za razvoj novih visokoafinitetnih efektorjev katepsina K, ki bodo uporabni v medicinske in raziskovalne namene.

## Uporaba derivatov nitroksolina za regulacijo aktivnosti katepsina B

Ana Mitrović<sup>1</sup>, Bojana Mirković<sup>1</sup>, Izidor Sosič<sup>1</sup>, Damijan Knez<sup>1</sup>, Stanislav Gobec<sup>1</sup>, Janko Kos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani*

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

mentor: Janko Kos

Cisteinski katepsini so encimi (proteaze), ki so v organizmu izraženi v različnih vrstah celic, kjer sodelujejo pri razgradnji proteinov znotraj lizosomov in so pomembno udeleženi še v različnih drugih fizioloških procesih. Spremembe v njihovem izražanju in aktivnosti so povezane s številnimi patološkimi procesi, med drugim tudi z rakom. Eden najpomembnejših cisteinskih katepsinov je katepsin B, ki je pri raku udeležen pri razgradnji proteinov zunajceličnega matriksa, invaziji in metastaziranju. Katepsin B se od ostalih katepsinov razlikuje po dodatnem strukturnem elementu, imenovanem zaporna zanka, prisotnost katere je glavni vzrok, da lahko cepi proteine na C-koncu polipeptidne verige (eksopeptidaza) in na sredini polipeptidne verige (endopeptidaza). Aktivnost katepsina B v telesu uravnava endogeni inhibitorji, za regulacijo njegove povečane aktivnosti pri patoloških stanjih pa je potrebna uporaba dodatnih zaviralcev (eksogenih inhibitorjev). Do danes je bilo opisanih več skupin eksogenih inhibitorjev katepsina B, vendar nobeden med njimi, zaradi nizke biološke uporabnosti in stranskih učinkov, ni v klinični uporabi. Kot selektivni, nekovalentni, reverzibilni inhibitor katepsina B je bil identificiran nitroksolin, ki je že uveljavljena protimikrobna učinkovina. Z namenom, da bi izboljšali njegovo delovanje, smo na podlagi kristalne strukture kompleksa nitroksolina in katepsina B razvili in testirali nove molekule, derivate nitroksolina. Derivate, ki so se v encimskih testih izkazali kot učinkoviti inhibitorji, smo v nadaljevanju ovrednotili v različnih *in vitro* funkcijskih testih na celičnih linijah. Pri tem smo določili njihov vpliv na tumorsko invazijo in razgradnjo proteinov zunajceličnega matriksa.

Novi derivati nitroksolina so izkazali različno jakost in selektivnost za inhibicijo katepsina B. Kot najboljši med njimi se je izkazal 2-[[[8-hidroksi-5-nitrokinolin-7-il)metil]amino]acetonitril, ki je selektivno in reverzibilno zavrl aktivnost katepsina B, z bistveno nižjo konstanto inhibicije v primerjavi z nitroksolinom. Hkrati pa je tudi učinkovito zmanjšal razgradnjo proteinov zunajceličnega matriksa in posledično invazijo tumorskih celic.

**Aktivno ciljanje cisteinskih katepsinov z liposomi, konjugiranimi s cistatinom C**

Tristan Kovačič<sup>1</sup>, Domen Kulovec<sup>1</sup>, Uroš Prešern<sup>1</sup>, Branka Klemenčič<sup>1</sup>, Lovro Kramer<sup>2</sup>, Andreja Bratovš<sup>2</sup>, Boris Turk<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Gimnazija Novo mesto*

<sup>2</sup> *Institut Jožef Stefan*

mentorji: Branka Klemenčič, Lovro Kramer, Andreja Bratovš, Boris Turk

V zadnjih letih je močno poraslo število raziskav na področju zdravljenja raka. Ena izmed novejših oblik zdravljenja rakastih obolenj je tudi tarčno zdravljenje, ki izkorišča patofiziološke lastnosti tumorskih celic in tumorskega mikrookolja ter omogoča visoko koncentracijo zdravilne učinkovine v rakastih tkivih v primerjavi z njeno koncentracijo drugod po telesu.

Cilj naše raziskovalne naloge je bil pripraviti tak sistem, ki bo omogočal aktivno tarčno zdravljenje raka. Sistem sestavlja liposom konjugiran s cistatinom C. V liposom lahko enkapsuliramo zdravilno učinkovino, medtem ko cistatin C služi kot tarčni ligand. Cistatin C je inhibitor cisteinskih katepsinov, med katere spada tudi katepsin B. Ti se nahajajo v lizosomih, kjer je njihova funkcija hidroliza beljakovin. Raziskave kažejo na njihovo povečano koncentracijo izven lizosomov v rakastih celic in tumorskem mikrookolju, kar lahko izkoristimo za aktivno tarčenje rakastih tkiv s cistatinom C.

Prvi del naloge obsega sintezo cistatina C s pomočjo bakterije *Escherichia coli*. Zapis za cistatin C smo pred samim izražanjem mutirali tako, da smo v cistatin C vpeljali dodatno tiolno skupino, kar nam je kasneje omogočilo konjugacijo z liposomom. Po izražanju smo mutiran cistatin C izolirali iz celičnega lizata in preverili njegovo inhibicijsko aktivnost. Pripravili smo PEG liposome, ki smo jih nato konjugirali s cistatinom C in na koncu preverili inhibicijsko aktivnost konjugiranega sistema.

## Od odpadkov do goriva: gensko spremenjena *Escherichia coli* za trajnostno proizvodnjo biobutanola iz organskih odpadkov

Mariša Cvitanič<sup>1</sup>, Nina Jerala<sup>2</sup>, Domen Kulovec<sup>3</sup>, Ana Milovanović<sup>4</sup>, Zala Sekne<sup>5</sup>, Jernej Šavli<sup>6</sup>, Anže Vozelj<sup>7</sup>, Aleš Zupančič<sup>8</sup>, Marina Klemenčič<sup>8</sup>, Marko Dolinar<sup>8</sup>, Ilja Gasan Osojnik Črnivec<sup>9</sup>, Albin Pintar<sup>9</sup>

<sup>1</sup> Gimnazija Bežigrad, <sup>2</sup> Škofijska klasična gimnazija, <sup>3</sup> Gimnazija Novo mesto, <sup>4</sup> I. gimnazija Celje, <sup>5</sup> Gimnazija Kranj, <sup>6</sup> Gimnazija Jurija Vege Idrija, <sup>7</sup> Gimnazija in ekonomska srednja šola Trbovlje, <sup>8</sup> Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, <sup>9</sup> Kemijski inštitut

mentorji: Marina Klemenčič, Marko Dolinar, Ilja Gasan Osojnik Črnivec, Albin Pintar

Ker je naša družba v veliki meri odvisna od fosilnih goriv, zaloge teh pa po napovedih strokovnjakov zadoščajo je le se za naslednjih 40 let, je iskanje alternative fosilnim gorivom postalo eden izmed pomembnejših izzivov sodobnega časa.

*n*-Butanol je eden izmed ogljikovodikov, ki imajo pretežno nepolaren značaj in so po lastnostih precej podobne bencinu. Njegova ključna prednost je, da jel primeren kot gorivo za dizelske motorje z notranjim izgorevanjem kot jih poznamo danes. Predstavlja dobro alternativo dizlu, saj je uporaben neposredno, brez potrebnih modifikacij motorja.

Biološko proizveden *n*-butanol (biobutanol) nastane v naravi v manjši meri pri fermentaciji sladkorjev. Učinkovitejši način za proizvodnjo biobutanola je pretvorba butanojske kisline v *n*-butanol z bakterijami rodu *Clostridium*. Butanojska kislina nastaja kot vmesni produkt pri direktni anaerobni biološki pretvorbi odpadkov v plinasta goriva, zlasti biovodik in biometan.

Pri našem raziskovalnem delu smo del metabolične poti bakterije *Clostridium acetobutylicum* prenesli v *E. coli* DH5 $\alpha$  s pomočjo konstrukta, sestavljenega iz treh genov (CtfA, CtfB in BdhB). Polipeptid CtfAB pretvarja butanojsko kislino v butiril-CoA, ki se nadalje pretvarja v *n*-butanol v prisotnosti BdhB dehidrogenaze. Sintetični geni so bili vstavljeni v pSB1C3 vektor, za vsakega smo uporabili močan promotor in RBS regijo pred encim kodirajočo regijo. Tako pripravljene konstrukte so bili nadalje preneseni v vektorje z dvojnimi terminatorjem transkripcije. Skupno smo pripravili devet DNA konstruktov za iGEM-ov register bioloških delov.

Nadalje smo optimizirali sistem bioreaktorjev za proizvodnjo biobutanola iz organskih odpadkov in pripravili metodo za analizo nastalih produktov z GC in HPLC. Sistem je zasnovan iz dveh stopenj, pri čemer v prvi ob prisotnosti organizmov aktivnega blata pride do pretvorbe organskih odpadkov v plinsko mešanico biovodika in ogljikovega dioksida, naravnega gnojila in organskih kislin, med katerimi prevladuje butanojska kislina. V drugi stopnji pa se butanojska kislina v prisotnosti reprogramirane *E. coli* pretvarja v biobutanol.

## **Eksperimentalni pristopi k študiju proteaz in njihove fiziološke vloge**

Marko Fonović

*Odsek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo, Institut Jožef Stefan*

Človeški organizem vsebuje več kot 560 različnih proteaz, ki uravnavajo številne življenjske procese. Prvotno domnevo, da proteaze sodelujejo izključno pri razgradnji odpadnih proteinov, je nadomestilo razumevanje, da proteaze preko cepitve peptidne vezi lahko spremenijo aktivnost, strukturo ali lokalizacijo proteinov in tako vplivajo na njihovo fiziološko funkcijo. Nepravilno delovanje proteaz je zato povezano z mnogimi bolezenskimi stanji kot so rak, nevrodegenerativne bolezni, ateroskleroza in artritis. V zadnjem desetletju farmacevtska industrija intenzivno usmerja razvoj terapevtikov na področje uravnavanja aktivnosti proteaz, zato je razumevanje njihovega delovanja na molekularnem nivoju vedno bolj pomembno. Da bi pojasnili mehanizem delovanja določene proteaze in potem to znanje nadgradili še z določitvijo njenih fizioloških substratov, vezavnih partnerjev ter njene fiziološke vloge *in vivo*, je potrebna uporaba kombinacije številnih kompleksnih eksperimentalnih postopkov. Proteaze in njihovo delovanje so na Odseku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo instituta Jožef Stefan že več desetletij osnovno področje raziskav in v okviru tega predavanja bodo predstavljeni nekateri najpomembnejši raziskovalni pristopi na tem zanimivem področju.

**Površinska predstavitev evazinov na rekombinantnih mlečnokislinskih bakterijah  
*Lactococcus lactis***

Katja Lužar<sup>1</sup>, Borut Štrukelj<sup>1, 2</sup>, Aleš Berlec<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Oddelek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan

<sup>2</sup> Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani

mentor: Aleš Berlec

Mlečnokislinske bakterije (MKB) so že stoletja sestavni del človeške prehrane, zato je njihova varnost splošno priznana. *Lactococcus lactis* je modelna mlečnokislinska bakterija, za katero obstajajo dobro razvita orodja za gensko manipulacijo. Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) predstavlja skupino kroničnih bolezni, za katere je značilno vnetje gastrointestinalnega trakta. Kemokini so kemotaktični citokini, ki vzbujajo in privlačijo določene vrste levkocitov in so ključne signalne molekule pri KVČB.

Z metodo površinske predstavitve lahko bakterije na površini izražajo proteine, ki vežejo kemokine in tako preprečijo njihov proinflamatorni učinek. Naš cilj je bil na površini mlečnokislinskih bakterij predstaviti kemokin-vezavne proteine, in sicer proteine, ki jih v žlezah slinavkah proizvaja rjavi klop *Rhipicephalus sanguineus* in se imenujejo evazini. Evazini so majhni proteini s sposobnostjo vezave in nevtralizacije kemokinov različnih družin (CC in CXC), ki inhibirajo migracijo ter aktivacijo levkocitov. V okviru raziskave smo pripravili gene za evazin-1, evazin-3 in evazin-4. Z metodami kloniranja smo gene vstavili v laktokolni površinsko predstavitveni vektor pSDLBA3b v fuziji s signalnim peptidom za izločanje v gojišče, potniškim proteinom B-domeno stafilokoknega proteina A in sidrnim proteinom AcmA, preko katerega se fuzijski protein pritrdi na celično steno bakterije. Proteine smo izrazili v bakteriji *Lactococcus lactis* NZ9000, izražanje genov pa smo detektirali s pomočjo metod NaDS PAGE in prenosom po Westernu. Površinsko lokalizacijo evazinov smo indirektno potrdili s pretočnim citometrom in konfokalnim mikroskopom z uporabo fluorescenčno označenih protiteles proti proteinu A, ki prepoznajo B domeno, ki je del fuzijskega proteina. Z metodo ELISA smo dokazali zmožnost bakterij s površinsko predstavljenim evazinom-1 za vezavo CCL3, evazinom-3 za vezavo CXCL8, CXCL2 in mCXCL1 ter evazinom-4 za vezavo CCL5. Učinkovitosti MKB z na površini predstavljenimi evazini smo potrdili tudi *in vitro* na celičnem modelu imunostimuliranih epiteljskih celic Caco-2, pri katerih je prišlo do zmanjšane izločanja kemokina CXCL-8.

Razvite bakterije izkazujejo obetavne protivnetne učinke *in vitro*, ki jih želimo v nadaljevanju potrditi tudi na živalskem modelu KVČB.



**Priprava samomorilskega genetskega stikala za obvladovanje cianobakterije  
*Synechocystis* sp. PCC 6803**

Anja Tanšek, Aneja Tahirović, Angelika Vižintin, Jernej Mustar, Vita Vidmar, Helena Čelešnik,  
Marko Dolinar

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

mentorja: Helena Čelešnik, Marko Dolinar

Cianobakterije so skupina bakterij, ki so tako kot rastline zmožne pretvarjati ogljikov dioksid in vodo v sladkorje v procesu fotosinteze, ob čemer sproščajo tudi kisik. S fotosintezo pridobljeno energijo lahko uporabijo za rast in razmnoževanje ali pa za proizvodnjo raznih molekul, kot so npr. vodik, olja, biogoriva in dr.

Zadnja leta narašča zanimanje za uporabo cianobakterij v biotehnologiji, saj lahko proizvajajo zanimive produkte. S pomočjo genskega inženirstva lahko cianobakterije spremenimo tako, da proizvajajo večje količine zelenega produkta ali celo tako, da začnejo proizvajati nek nov produkt, ki ga naravne, nespremenjene cianobakterije niso zmožne.

Ob uporabi gensko spremenjenih cianobakterij se poraja vprašanje biovarnosti - kaj bi se zgodilo, če bi te ušle iz bioreaktorja v naravo? Zato želimo imeti na voljo orodja za nadzor gensko spremenjenih cianobakterij. Radi bi, da bi se pobegle gensko spremenjene cianobakterije samouničile, če bi ušle v naravo. S tem namenom smo pripravili samomorilsko genetsko stikalo na osnovi encima nukleaze NucA in njenega inhibitorja Nui iz cianobakterije iz rodu *Anabaena* in ga vstavili v modelno cianobakterijo *Synechocystis* sp. PCC 6803. Kadar nukleaza ni inhibirana, razgradi dedni material cianobakterije, s čimer ubije celico in hkrati tudi prepreči, da bi se geni lahko prenesli v druge bakterije v naravi.

Ker želimo, da nukleaza pobije celice le pri določenih pogojih, smo jo vstavili pod inducibilnim promotorjem *PcopM*. Promotor je del gena, ki določa, v kolikšni meri se gen prepisuje. Prepisovanje genov pod inducibilnimi promotorji se močno poveča pri določenih pogojih, v primeru *PcopM* ob prisotnosti določenih kovinskih ionov. Gen za nukleazni inhibitor Nui pa smo vstavili pod konstitutiven promotor *PrnpB*, da pri normalnih pogojih puščanje nukleaze ne bi motilo rasti cianobakterij. Po dodatku kovinskih ionov smo opazili uspešno samoubijanje cianobakterij s samomorilskim genetskim stikalom. Z RT-PCR smo dokazali, da se je ob dodatku kovinskih ionov prepisovanje gena za nukleazo povečalo, medtem ko je prepisovanje gena za inhibitor ostalo enako.

## Opis, priprava in učinkovitost bakteriofaga PC14, specifičnega za *Campylobacter jejuni*

Tjaša Kitanovski<sup>1</sup>, Jerca Kristan<sup>1</sup>, Janja Pust<sup>1</sup>, Matjaž Peterka<sup>2</sup>, Eva Zaletel<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gimnazija Novo mesto

<sup>2</sup> COBIK, Ajdovščina

mentorji: Matjaž Peterka, Eva Zaletel, Janja Pust

Bakterijska vrsta *Campylobacter jejuni* je najpogostejši povzročitelj črevesnih infekcij v razvitem svetu. Zaradi prepovedi uporabe antibiotikov v priraji živali, naraščanja števila okužb in naraščanja odpornosti na antibiotike raziskovalci pospešeno iščejo načine za zmanjševanje kontaminacije z bakterijami rodu *Campylobacter*. Vse glasnejši so pozivi k razvoju novih protimikrobnih strategij ali dopolnil za zdravljenje bakterijskih infekcij in zmanjševanje kontaminacije s patogenimi bakterijami. Ena od najpogosteje navajanih alternativ so bakteriofagi, naravni bakterijski paraziti, ki so jih v času pred antibiotiki pogosto uporabljali za zdravljenje bakterijskih okužb. Raziskave so pokazale, da bakteriofagi bistveno znižajo število bakterij *Campylobacter jejuni* v piščančjem črevesju, kar ugodno vpliva na pojav kampilobakterioze. Za učinkovito uporabo bakteriofagov moramo dobro poznati njihove lastnosti, varnost ter značilnosti interakcije z gostiteljem. V tej nalogi smo nagojili bakteriofag PC14, specifičen za bakterijsko vrsto *C. jejuni*, ga očistili, inkapsulirali in ugotovili njegov litični spekter ter preverili učinkovitost protibakterijskega delovanja na bakterijo *C. jejuni* v celičnem modelu Caco-2.

Na podlagi morfoloških značilnosti smo bakteriofag PC14 uvrstili med predstavnike *Myoviridae*. Z metodo nakapljanja smo preverili njegov litični spekter in ugotovili, da inficira predvsem seve *C. jejuni* človeškega izvora. Izračunali smo tudi izkoristek samega proizvodnega postopka in postopka inkapsulacije. V celičnem modelu Caco-2 je bakteriofag PC14 znižal število *C. jejuni*, pri čemer je bil prost bakteriofag bolj učinkovit kot inkapsuliran bakteriofag.

## Ovrednotenje jakosti različnih kvasnih promotorjev s pomočjo molekularno-bioloških tehnik

Jerneja Nimac<sup>1</sup>, Anže Vozelj<sup>1</sup>, Aleksander Medveš<sup>1</sup>, Darjan Andrejc<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gimnazija in ekonomska srednja šola Trbovlje

<sup>2</sup> Kemijski inštitut

mentorja: Aleksander Medveš, Darjan Andrejc

Kvasovke se že vrsto let uporabljajo v živilski industriji, pri peki kruha in proizvodnji alkohola. V zadnjem času pa so, zaradi svojih lastnosti, postale nepogrešljiv element tudi v biotehnologiji, sploh v moderni proizvodnji bioloških zdravil. Sicer se za proizvodnjo slednjih uporabljajo tudi bakterije, a je v večini primerov proizvodnja bioloških zdravil v kvasovkah varnejša in učinkovitejša.

Kvasovke uporabljamo tudi v raziskovalne namene. Namen naše raziskovalne naloge je bil vrednotenje jakosti različnih kvasnih promotorjev. To smo dosegli s tem, da smo v isti vrsti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* izrazili rumen fluorescenčni protein (angl. Yellow fluorescent protein – YFP) pod različnimi kvasnimi promotorji in nato s pomočjo merjenja fluorescence ocenili količino izraženega proteina. Metode izražanja proteinov pa se danes s pridom uporabljajo v biotehnologiji tudi za izdelavo bioloških zdravil.

Pri našem raziskovanju smo uporabili inducibilni promotor CUP1, čigar jakost je odvisna od prisotne koncentracije bakrovih ionov in konstitutivna promotorja TEF in GPD. Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je najmočnejši konstitutivni GPD promotor, saj se je med njegovim delovanjem izrazilo največ proteina. Z različnimi koncentracijami bakra smo na podlagi izmerjene fluorescence sklepali na količino izraženega proteina in ugotovili dobro linearno koncentracijsko odvisnost pri manjših koncentracijah bakra pri večjih pa logaritemsko. Določili pa smo tudi minimalno in optimalno delovanje promotorja CUP1 pri določeni koncentraciji induktorja.

## Razvoj novih zaviralcev holin esteraz za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni

Stanislav Gobec

*Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani*

Alzheimerjeva bolezen (AB) predstavlja hudo bolezen, za katero na svetu trpi okoli 40 milijonov ljudi, število bolnikov pa se bo v naslednjih letih še povečalo. Zaradi izgube spomina, motenj v koncentraciji in sprememb v vedenju predstavlja hudo breme za bolnike, njihove svojce in nenazadnje tudi za celotno družbo. Nova zdravila, ki bi učinkovito lajšala simptome ali celo pozdravila to bolezen, so zaradi tega nujno potrebna.

V okviru znanstveno-raziskovalnega dela na Fakulteti za farmacijo smo v sodelovanju s partnerji iz tujine (Francija, Poljska) ter domačimi strokovnjaki (Medicinska fakulteta UL) odkrili potencialne nove zdravilne učinkovine, ki izjemno učinkovito zavirajo delovanje encima butirilholin-esteraza (BChE), ki je udeležen pri AB. Te učinkovine nakazujejo možnost zdravljenja tudi v kasnejših fazah bolezni, kjer obstoječa zdravila niso več učinkovita. Učinkovite so na mišjem modelu AB, hkrati pa imajo tudi manjšo možnost za neželene stranske učinke kot sedanja zdravila. Naše učinkovine bi podaljšale življenje bolnikov z AB in tudi izboljšale kakovost njihovega življenja. Poleg tekočih raziskav želimo na fakulteti in v sodelovanju z obstoječimi in novimi akademskimi ali industrijskimi mednarodnimi partnerji izvesti še dodatne raziskave, s katerimi bi te spojine pripeljali do kliničnih raziskav na bolnikih z AB.

Na primeru razvoja teh učinkovin si bomo ogledali predklinične faze razvoja zdravil, ki potekajo na Fakulteti za farmacijo.

## Vpliv sestave medija na delovanje aktivatorjev AMPK v celičnih kulturah

Klemen Dolinar<sup>1,2</sup>, Mojca Pavlin<sup>2,3</sup>, Alexander V. Chibalin<sup>4</sup>, Sergej Pirkmajer<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> *Skupina za nano in biotehnološke aplikacije, Fakulteta za elektrotehniko Univerze v Ljubljani*

<sup>3</sup> *Inštitut za biofiziko, Medicinska fakultet Univerze v Ljubljani*

<sup>4</sup> *Department of Molecular Medicine and Surgery, Integrative Physiology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden*

mentor: Sergej Pirkmajer

Z AMP aktivirana protein-kinaza (AMPK) uravnava številne celične procese, med drugim presnovo, rast in preživetje celic. Številne raziskave kažejo, da bi učinkovine, ki aktivirajo AMPK, lahko uporabili za zdravljenje sladkorne bolezni in raka. Eden prvih in najpogosteje uporabljenih aktivatorjev AMPK je AICAR. AICAR je po strukturi analog nukleozida adenoizina. V celico vstopi s pomočjo prenašalcev nukleozidov in se nato fosforilira v ZMP, analog AMP, ki poveča aktivnost AMPK.

Učinke in mehanizem delovanja zdravilnih učinkovin pogosto raziskujemo na celičnih kulturah. Nekateri mediji, ki jih uporabljamo za gojenje celičnih kultur, vsebujejo tudi nukleozide. Zanimalo nas je, ali prisotnost nukleozidov ovira vstop AICAR v celico in s tem zmanjša njegove farmakološke učinke.

Vpliv nukleozidov na delovanje AICAR smo preučili v celicah skeletne mišice, ki je ena glavnih farmakoloških tarč za zdravljenje sladkorne bolezni, celicah raka dojke MDA-MB-231 in celicah raka prostate PC-3. Skeletne mišične celice smo inkubirali z AICAR v mediju MEM $\alpha$  z oziroma brez nukleozidov. AICAR je aktiviral AMPK v MEM $\alpha$  brez nukleozidov, v MEM $\alpha$  z nukleozidi pa ne. Tudi v celicah MDA-MB-231 je MEM $\alpha$  z nukleozidi preprečil aktivacijo AMPK z AICAR, ki smo jo sicer opazili v mediju RPMI, ki ne vsebuje nukleozidov. V celicah PC-3 je AICAR aktiviral AMPK tako v RPMI kot v MEM $\alpha$  z nukleozidi, a je bila aktivacija v MEM $\alpha$  z nukleozidi manjša kot v RPMI. Nukleozidi so pri celicah MDA-MB-231 in PC-3 zmanjšali tudi negativen učinek AICAR na rast celic. Naši rezultati torej kažejo, da nukleozidi zmanjšajo delovanje AICAR.

Predstavili bomo, zakaj bi bili aktivatorji AMPK lahko uporabni za zdravljenje sladkorne bolezni in raka, in pokazali, da lahko sestava medija v poskusih na celičnih kulturah vpliva na delovanje farmakoloških učinkovin.

## **Analiza vpliva različnih koncentracij vitamina C in glutationa na preživetje celic raka dojke MDA-MB-231**

Nina Roštan, Maruša Rajh, Mojca Pavlin

*Skupina za nano in biotehnološke aplikacije, Fakulteta za elektrotehniko Univerze v Ljubljani*

mentorici: Mojca Pavlin, Maruša Rajh

Visoke doze vitamina C so bile že pred časom preučevane za protitumorsko delovanje. Več *in vitro* in *in vivo* raziskav je pokazalo učinke visokih koncentracij C vitamina v določenih pogojih vendar so si rezultati delno nasprotujoči. Več raziskave je pokazalo, da je mehanizem delovanja C vitamina verjetno povečanje oksidativnih kisikovih zvrsti, vendar mehanizem selektivnosti za rakave celice ni bil jasen.

Ena izmed nedavnih raziskav je pokazala, da tretma z visoko dozo vitamina C v celicah KRAS in BRAF je induciral smrt z uporabo in redukcijo dehidroaskorbata, oksidirane oblike vitamina C, nazaj v vitamin C. Redukcija dehidroaskorbata je s pomočjo preostanka glutationa inducirala oksidativni stres. Sledila je deaktivacija gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaze, inhibicija glikolize in posledično je nastala energijska kriza in celična smrt. Študije so nadaljno pojasnile mehanizem, s katerim lahko ROS inducira celično smrt in lepo pokaže kako lahko vitamin C kot antioksidant deluje kot dvorezni meč. Vendar pa je nadaljno delo nujno, da se ugotovi ali obstaja terapevtski potencial vitamina pri bolnikih z rakom. Zato smo se lotili raziskave, kjer analiziramo vpliv različnih koncentracij vitamina C na celice raka dojke, MDA\_MB-231. Koncentracije vitamina C kombiniramo tudi z različnimi koncentracijami glutationa.

Naši preliminarni rezultati kažejo, da vitamin C pri višji milimolarnih koncentracijah povzroči propad in manjšo rast celic MDA. Glutation v kombinaciji z vitamin C zmanjša smrt celic v primerjavi s tretiranjem zgolj z vitaminom C.

## Vpliv glukoze na celično preživetje po elektroporaciji

Anja Dremelj<sup>1</sup>, Anja Pirih<sup>1</sup>, Alenka Mozer<sup>1</sup>, Alenka Maček-Lebar<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gimnazija Vič

<sup>2</sup> Fakulteta za elektrotehniko Univerze v Ljubljani

mentorici: Alenka Mozer, Alenka Maček-Lebar

Rak in diabetes tipa 2 sta danes dve prevladujoči bolezni, ki ju lahko le delno preprečimo z zdravim načinom življenja. Znano je, da imajo sladkorni bolniki večjo možnost za razvoj določenih vrst raka, in sicer raka dojke, debelega črevesa in trebušne slinavke. Življenjska doba ljudi se podaljšuje, zato je pomembno, da razvijamo nova zdravljenja, ki so bolniku prijaznejša in manj boleča. Ena izmed teh oblik je tudi elektrokemoterapija, ki se je izkazala za zelo učinkovito obliko zdravljenja nekaterih vrst raka (kožni melanom). V primerjavi s kemoterapijo, ki je prav tako možna oblika zdravljenja raka, je bolnik citostatiku in električnemu polju izpostavljen le enkrat, zato ima elektrokemoterapija manj stranskih učinkov. V primerjavi z operativnim posegom pa bolnik v bistveni meri obdrži organ, ki ga zdravimo. Najina raziskava se je osredotočila le na del celotnega zdravljenja, in sicer kako se preživetje celic po elektroporaciji spremeni, če celice rastejo v mediju s povišano koncentracijo glukoze, podobno kot je v telesu sladkornega bolnika. Naredili smo rastne krivulje na zdravih celicah CHO in rakavih celicah B16F1, da bi ugotovili, če višja koncentracija glukoze v mediju vpliva na rast in podvojevanje celic. Izvedli smo elektroporacijo na celicah CHO, da bi ugotovili, kako se preživetje spreminja glede na raven glukoze v mediju.

Ugotovili smo, da je čas v katerem se celice prilagodijo na novo okolje krajši, če so celice gojene v mediju z dodano glukozo, podvojitveni čas pa se le minimalno razlikuje glede na medij. Preživetje celic, ki so pred/po elektroporaciji rasle v mediju z dodano glukozo, začne hitreje upadati z večjo jakostjo električnega polja, kot celic, ki so pred/po elektroporaciji rasle v navadnem mediju. Preživetje celic je večje, če je regeneracija izvedena v navadnem mediju, a razlika je neznatna. Da bi dosegli čim večjo učinkovitost zdravljenja, ki temelji na elektroporaciji, morajo sladkorni bolniki nadzorovati raven glukoze v krvi. Nadaljnje raziskave bode pokazale, če sladkorni bolniki potrebujejo posebno načrtovanje zdravljenja z elektrokemoterapijo.

**Možnost uporabe fotosinteznih barvil, pridobljenih iz vrst alg *Chlorella vulgaris* in *Scenedesmus sp.*, v elektrokemijskih sončnih celicah**

Anže Šumah<sup>1</sup>, Lejla Šabić<sup>1</sup>, Katja Stopar<sup>1</sup>, Mateja Hočevar<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ŠC Ravne na Koroškem, Gimnazija

<sup>2</sup> Fakulteta za elektrotehniko Univerze v Ljubljani

mentorici: Katja Stopar, Mateja Hočevar

Človek dandanes porabi toliko energije, kot je še ni nikoli prej, poraba pa iz dneva v dan narašča. Zato je pomembno, da energijo zagotavljamo iz obnovljivih virov, kot je na primer sončna energija. Eden izmed pomembnejših načinov pretvorbe sončne energije v električno so elektrokemijske sončne celice (angleško DSSC – dye-sensitized solar cells), ki imajo številne prednosti pred drugimi vrstami sončnih celic: njihova izdelava je enostavnejša in cenovno ugodnejša, zaradi možnosti uporabe naravnih fotosinteznih barvil pa so okoljsko sprejemljivejše.

V tej raziskovalni nalogi smo proučevali možnost uporabe fotosinteznih barvil za izdelavo elektrokemijskih sončnih celic. Osredotočili smo se na različne postopke ekstrakcije barvil iz avtohtonih vrst alg *Chlorella vulgaris* in *Scenedesmus sp.* Zanimale so nas primerjave med izkoristki elektrokemijskih sončnih celic, izdelanih z barvili iz izbranih vrst alg ter med izkoristki z barvili, pridobljenimi iz posušenih oziroma svežih alg. Za pripravo barvila so bila uporabljena različna topila (acetone, etanol in voda). Kot primerjalno oziroma referenčno barvilo je bilo uporabljeno umetno sintetizirano barvilo na osnovi rutenijevega kompleksa – N719, ki spada med najpogosteje uporabljena barvila v elektrokemijskih sončnih celicah.

Eksperimentalno delo je bilo opravljeno na Fakulteti za elektrotehniko v Ljubljani, kjer je bilo izdelanih 22 elektrokemijskih sončnih celic, za vsako barvilo po dve. Na Gimnaziji Ravne na Koroškem so bile izvedene tudi meritve absorbanca posameznega barvila v odvisnosti od svetlobe. Rezultati so pokazali, da je alga z višjim izkoristkom *Chlorella vulgaris*, najuporabnejše topilo pa acetone. Neposredna povezava med posušenostjo alg in izkoristkom ni bila ugotovljena. Največji izkoristek je imela elektrokemijska sončna celica, ki je bila izdelana z barvilom sveže alge *Chlorella vulgaris*, raztopljen v acetone (0,1431 %). Sončna celica, pripravljena z referenčnim barvilom N719 je dosegla skoraj desetkrat večji izkoristek (1,3135 %). Na osnovi vseh rezultatov lahko zaključimo, da je barvila iz alg teoretično mogoče uporabljati v elektrokemijskih sončnih celicah, potrebne pa bi bile številne optimizacije materialov v sončnih celicah.



## Biofilmi

David Stopar

*Katedra za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani*

Bakterije so po definiciji prokariotski enocelični organizmi. Vendar ima večina bakterij sposobnost tvorbe biofilmov, večceličnih struktur, kjer so posamezne celice obdane z zunajceličnim matriksom, ki ga sestavljajo polisaharidi, proteini in eDNA. V naravnih okoljih je večina bakterij večji del življenjskega cikla v biofilmu. Biofilmi določajo naš dnevni ritem od umivanja, čiščenja, priprave vode, do problemov v skoraj vseh industrijskih panogah in zdravstvenih težav. Struktura biofilmov je kompleksna in na izgled velikokrat podobna kompleksnemu tkivu večceličnih organizmov. V tkivu biofilma se genetsko identične celice diferencirajo v različne subpopulacije. Celice znotraj subpopulacije so specializirane za izvajanje izbranega transkripcijskega programa in s tem za izvajanje določenih fizioloških procesov. Tako imamo lahko v biofilmih celice, ki so gibljive, filamentozne, negibljive celice, celice za proizvodnjo hidrofobnih komponent, celice za proizvodnjo površinsko aktivnih snovi, kompetentne celice, kanibalne celice, celice za proizvodnjo zunajceličnega matriksa, celice, ki sporulirajo. Te strategije so večinoma neskladne druga z drugo in celice, ki se diferencirajo, lahko izvajajo samo en program. Mikrobne subpopulacije so v biofilmu prostorsko in časovno urejene, kar omogoča nastanek kompleksnih 3D struktur. Določanje teh struktur je zaradi velikosti, kemijske heterogenosti, amorfности in dinamike biofilmov težavno, vendar ključno za razumevanje delovanja najbolj pogoste bakterijske strukture na planetu.

Na katedri za mikrobiologijo se ukvarjamo s strukturno karakterizacijo različnih biofilmov. Predvsem nas zanima strukturiranost zunajceličnih matriksov, ki povezujejo bakterijske celice v strukturo biofilma in omogočajo izbrano fiziološko funkcijo. Za karakterizacijo strukturne heterogenosti biofilmov uporabljamo različne metode, kot so sipalne tehnike SAXS, SLS, DLS, fluorescenčna in DIC mikroskopija ter molekularno modeliranje zunajceličnih polimernih snovi. Ker so biofilmi na strig zelo odporne strukture, ki bakterijam omogočajo preživetje v stresnih razmerah in določajo uspešnost odstranjevanja biofilmov, v laboratoriju določamo tudi mehanske lastnosti biofilmov. Viskoelastične lastnosti biofilmov in njihovih komponent določamo s klasično reometrijo, začetne faze razvoja biofilmov in medceličnih mehanskih sklopitev pa proučujemo z uporabo optične pincete in mikrereologije. Skupaj s sodelavci na drugih raziskovalnih inštitucijah razvijamo protimikrobne površine in strategije za preprečevanje razvoja biofilmov.

## Odkrivanje virusov v okoljskih vodah s sekvenciranjem naslednje generacije

Denis Kutnjak<sup>1,2</sup>, Anja Pecman<sup>1,2</sup>, Ion Gutiérrez-Aguirre<sup>1</sup>, Nataša Mehle<sup>1</sup>, Nastja Pavlič<sup>1</sup>, Magda Tušek Žnidarič<sup>1</sup>, Nejc Rački<sup>1,3</sup>, Matevž Rupar<sup>1,4</sup>, Maja Ravnikar<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo*

<sup>2</sup> *Mednarodna podiplomska šola Jožef Stefan*

<sup>3</sup> *Lek d.d., Ljubljana, Slovenija*

<sup>4</sup> *The University of Nottingham, UK*

mentorja: Maja Ravnikar, Ion Gutiérrez-Aguirre

V zadnjih letih je razvoj tehnologije naslednje generacije sekvenciranja (NGS) omogočil razmah pri odkrivanju novih virusov v morju in celinskih vodah. Kot uporaben sistem za študij mikrobov v okoljskih vodah smo si izbrali vode iz čistilnih naprav. Z analizo mikrobne sestave vzorcev vode iz čistilnih naprav lahko dobimo vpogled v prisotnost mikrobov v ekosistemu, saj se v njih stekajo vode iz širše okolice.

NGS omogoča sekvenciranje vseh nukleinskih kislin v vzorcu, pri čemer pa lahko, zaradi ozadja visoko zastopanih organizmov, spregledamo manj zastopane, a še vedno zelo pomembne organizme, npr.: stabilne rastlinske viruse in humane gastroenteritične viruse. V predhodnih študijah smo dokazali, da lahko s CIM® (Convective Interaction Media) kromatografijo koncentriramo različne viruse iz odpadnih vod (Steyer in sod., 2013, 2015; Rački in sod., 2015,) in hkrati odstranimo ozadje rastlinskih nukleinskih kislin, kar omogoča uspešno analizo vzorca z NGS (Kutnjak in sod., 2015). V tem poskusu smo povezali uporabo CIM koncentriranja virusov iz odpadnih vod s pripravo vzorcev za NGS s ciljem odstranitve ozadja (bakterijskih in drugih prostih nukleinskih kislin).

Z analizo vode iz iztoka iz čistilne naprave smo zaznali patogene viruse za človeka in rastline ter veliko število bakteriofagov. Za viruse, ki smo jih zaznali, je v glavnem značilno, da se prenašajo z vodo in da lahko daljše obdobje preživijo izven gostitelja (humani gastroenteritični virusi, stabilni rastlinski virusi). Razumevanje virusnega metagenome odpadnih vod bo služilo za študij ekologije humanih in rastlinskih virusov ter predvidevanja vpliva teh virusov na okolje ter zdravje ljudi in rastlin.

## Listni ekstrakti invazivnih dresnikov (*Fallopia* sp.) sprožijo oksidativni stres pri testnih rastlinah

Katarina Šoln, Jasna Dolenc Koce

*Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani*

mentorica: Jasna Dolenc Koce

Oksidativni stres je oblika kemičnega stresa, ki je prisotna pri normalnem aerobnem celičnem metabolizmu. Kisik ima kot končni oksidant pomembno vlogo pri celičnem dihanju, a če se O<sub>2</sub> le polovično reducira, nastanejo toksični vmesni produkti, ki jih imenujemo reaktivne kisikove zvrsti (ROS). Če je organizem izpostavljen različnim abiotskim ali biotskim stresnim dejavnikom, se lahko sinteza ROS močno poveča. Visoke koncentracije ROS lahko povzročijo poškodbe DNA, proteinov in lipidov ter vodijo v programirano celično smrt. Eden izmed dejavnikov, ki lahko močno poveča koncentracijo ROS, so tudi sekundarni metaboliti. Rastline tekmujejo za vodo, mineralne snovi, prostor in sončno svetlobo. Ena izmed strategij za kompeticijsko prednost pred ostalimi rastlinami je tudi izločanje alelopatskih spojin, sekundarnih metabolitov, ki v sosednjih rastlinah inducirajo oksidativni stres.

V naši raziskavi smo se osredotočili na dve invazivni rastlini: japonski dresnik (*Fallopia japonica*) in češki dresnik (*Fallopia × bohemica*) ter njun vpliv na testne rastline. Iz listov dresnikov smo pripravili vodne ekstrakte različnih koncentracij in z njimi tretirali kalice redkvic (*Raphanus sativus*) in koruze (*Zea mays*). Ugotovili smo, da ekstrakti japonskega in češkega dresnika inducirajo povečan oksidativni stres v izpostavljenih rastlinah, kar se je odražalo predvsem na poškodbah membran, vsebnosti antioksidantov in spremenjeni vsebnosti fotosinteznih pigmentov. Lipidna peroksidacija je radikalska verižna reakcija, pri kateri ROS reagirajo z nenasičenimi maščobnimi kislinami in s tem poškodujejo membrane. Lipidno peroksidacijo smo merili spektrofotometrično preko malondialdehida (MDA). Pri testnih rastlinah, ki so bile izpostavljene ekstraktom dresnikov, je bila lipidna peroksidacija povečana v primerjavi s kontrolo. Antioksidanti so zaščitne snovi, ki reagirajo z ROS, preprečijo njihove verižne reakcije in s tem zavarujejo celico pred oksidativnimi poškodbami. Poznamo encimske in neencimske antioksidante. V naši raziskavi smo spremljali aktivnost dveh antioksidativnih encimov: katalaze (CAT) in guaiakol peroksidaze (G-POD). Poleg tega smo določali vsebnost neencimskih antioksidantov (TAC) - to so predvsem vitamini z antioksidativnim delovanjem (na primer:  $\alpha$ -tokoferol, askorbat, karotenoidi, flavonoidi). Na zunaj so se učinki oksidativnega stresa odražali kot zavrta rast korenin testnih rastlin.

## Prehransko dopolnilo iz soka granatnega jabolka

Sara Jamnik<sup>1</sup>, Helena Perić<sup>1</sup>, Alenka Mozer<sup>1</sup>, Mihaela Skrt<sup>2</sup>, Nataša Poklar Ulrih<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gimnazija Vič

<sup>2</sup> Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

mentorji: Alenka Mozer, Mihaela Skrt, Nataša Poklar Ulrih

Cilj najine raziskovalne naloge je bila priprava prehranskega dopolnila s sokom granatnega jabolka. Prehranska dopolnila niso nadomestilo za zdravo in uravnoteženo prehrano, vendar pa imajo stabilno sestavo in so koristna v času bolezni, oslabiljenega imunskega sistema in takrat, ko sveže sadje ni dostopno. Mikrokapsulirali smo antioksidante, antocianine in katehine v soku granatnega jabolka, da bi preprečili njihov razpad. Uporabili smo metodi liofilizacije in mikrokapsulacije. Z liofilizacijo smo dobili suh ekstrakt soka z ohranjenimi antioksidanti, antocianini in katehini, ki smo ga mikrokapsulirali v polisaharidni ovoj skupaj z inulinom, da bi dosegli dolgoročno stabilnost. Za inulin smo se odločili zaradi njegovih probiotičnih lastnosti, tako da bi imelo prehransko dopolnilo še dodatne pozitivne učinke na naše zdravje. Rezultati so pokazali, da velikost mikrokapsul znatno vpliva na hitrost in količino sproščenih komponent iz kapsul. Uspešno smo mikrokapsulirali sok granatnega jabolka, vendar pa je potrebno nadaljnje optimizirati postopek, da bi dosegli najvišjo možno učinkovitost.

## Vpliv treh pesticidov na heterotrofne talne mikroorganizme

Gabriela Štumberger, Katja Holnthaner Zorec

*II. gimnazija Maribor*

mentor: Katja Holnthaner Zorec

Talni mikroorganizmi igrajo pomembno vlogo v rodovitnosti prsti, ta pa je pomembna pri kmetijstvu v proizvodnji hrane. Da bi izboljšali svoj pridelek, veliko kmetov uporablja pesticide, vendar pa imajo lahko ti negativne učinke na netarčne organizme, med katerimi so tudi talni mikroorganizmi. Namen raziskovalne naloge je bil ugotoviti kako trije različni pesticidi: herbicid Boom Efekt na osnovi glifosata, fungicid Previcur Energy na osnovi propamocarba in fosetila, ter insekticid Reldan 22 EC vplivajo na rast ter bazalno respiracijo heterotrofnih talnih mikroorganizmov. Proučevali smo antimikrobni učinek na *Bacillus cereus*, učinek na rast mešane kulture talnih mikroorganizmov ter vpliv na bazalno respiracijo. Vsi trije pesticidi so izkazali antimikrobni učinek na *Bacillus cereus*, tako v priporočenih koncentracijah kot tudi v koncentrirani obliki. Med tem, ko med učinkom priporočenih koncentracij ni bilo pomembnih razlik, je izmed koncentriranih pesticidov največji antimikrobni učinek izkazal Reldan 22 EC, najmanjši pa Previcur Energy. Rast mešane kulture talnih mikroorganizmov je najbolj zavrl Boom Efekt, sledil je Previcur Energy, Reldan 22 EC pa je rast pospešil. Vsi trije pesticidi so pospešili bazalno respiracijo, najbolj Reldan 22 EC, kar je indikator znižane mineralizacije z ogljikom. Ti rezultati nakazujejo na strukturne spremembe v talni mikrobioti, za kar pa je znano, da vpliva na kvaliteto prsti. Vsekakor so potrebne še nadaljne raziskave v smislu vpliva na specifične mikroorganizme ter na druge vrste mineralizacije (z dušikom, fosforjem, kalijem,...).



# **OSTALI POVZETKI**





## Uporaba različnih metod za dokazovanje prisotnosti reaktivnih kisikovih zvrsti v živih celicah

Ana Krišelj<sup>1</sup>, Nežka Kavčič<sup>2,3</sup>, Katarina Pegan<sup>2</sup>, Boris Turk<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani*

<sup>2</sup> *Oddelek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo, Institut Jožef Stefan*

<sup>3</sup> *Mednarodna podiplomska šola Jožef Stefan*

<sup>4</sup> *Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov*

mentor: Boris Turk

Reaktivne kisikove spojine (ROS) so prosti kisikovi in peroksidni radikali, ki se med seboj razlikujejo v polarnosti, reaktivnosti, specifičnosti ter mestu in načinu nastanka v celici. Predvsem v mitohondrijih in peroksisomih nastajajo neprestano kot stranski produkti celičnega metabolizma. Prav tako imajo pomembno vlogo pri celični signalizaciji in uravnavanju celičnega cikla, uporabljajo pa jih tudi levkociti v boju proti patogenim organizmom. Če so celice izpostavljene različnim okoljskim stresnim dejavnikom, kot so povišana temperatura, UV žarki, ionizirajoče sevanje ali različne kemikalije, količina ROS naraste. Posledično pride do poškodb v številnih celičnih komponentah, kar imenujemo oksidativni stres. Tekom evolucije so se v živih organizmih razvili številni mehanizmi, ki zmanjšujejo nastajanje ROS in v celicah popravljajo že nastalo škodo. V kolikor so poškodbe nepopravljive, celica propade.

Ker so ROS vpleteni v številne bolezni sodobnega sveta (rak, avtoimunske, nevrodegenerativne bolezni ...) je zelo pomembno, da jih znamo opazovati. To pa je zaradi njihove nestabilnosti in nagnjenosti k interakcijam z drugimi molekulami lahko zelo problematično. Težavo pri opazovanju nam predstavljajo predvsem nespecifična barvila, ki ob propadu celice obarvajo tudi druge celične komponente, kot je na primer DNA. Ker zaenkrat še ne obstaja univerzalna metoda za določevanje produkcije ROS v živih celicah, je za določitev oksidativnega stresa potrebna kombinacija različnih metod. V okviru svojega magistrskega dela sledim kopičenju ROS v živih celicah in preučujem vpliv antioksidantov na oksidativni stres s kombinacijo pretočne citometrije in fluorescentne mikroskopije.

## Mutacijska analiza genov za *EPO* in *EPOR* pri družinski eritrocitozi: klinični primer

Danijela Vočanec<sup>1</sup>, Tinkara Prijatelj<sup>1</sup>, Nataša Debeljak<sup>2</sup>, Tanja Kunej<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani*

<sup>2</sup> *Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani*

<sup>3</sup> *Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani*

mentorici: Nataša Debeljak, Tanja Kunej

Družinska eritrocitoza (angl. familial erythrocytosis, FE) je redka genetska bolezen krvotvornega tkiva, za katero je značilno povečanje števila rdečih krvnih teles, povišan hematokrit in povišane vrednosti hemoglobina v krvi. Trenuten diagnostični pristop omogoča izključitev mutacij v genu *JAK2*, značilnih za pravo policitemijo (angl. polycythemia vera, PV). Za bolnike z *JAK2* negativnimi eritrocitozami še ni ustrezne diagnostične preiskave, ki bi potrdila diagnozo FE in pripomogla k optimalnemu zdravljenju bolnikov. Cilj naše naloge je vpeljava novega molekularno-genetskega diagnostičnega testa za določitev mutacij v genih za eritropoetin (*EPO*) in njegov receptor (*EPOR*).

Pri zbiranju doslej opisanih mutacij v genih za *EPO* in *EPOR*, smo uporabili genomski brskalnik Ensembl in literaturo v podatkovni zbirki PubMed. Analizirali smo krvna vzorca dveh bolnikov (oče in sin), pri katerima so bili izključeni sekundarni vzroki eritrocitoz in prisotnost mutacij v genu *JAK2*; mutacijo V617F, ki se nahaja v eksonu 14 in mutacije v eksonu 12. Genomsko DNA gena *EPO* in kodirajočo DNA gena *EPOR* smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). S sekvenciranjem po Sangerju smo analizirali nukleotidno zaporedje dveh regulatornih regij (promotor in ojačevalac) gena *EPO*, ter nukleotidno zaporedje eksona 8 gena *EPOR*. Primerjavo nukleotidnega zaporedja med bolnikoma in referenčnim zaporedjem (RefSeq NG\_021471.1) smo izvedli z BLAST® (NCBI) in Sequence Scanner Software 2. Ugotovili smo, da sta oba bolnika heterozigota za mutacijo rs551238 G>T v ojačevalcu gena *EPO*, ki je predhodno že bila povezana s povišanim hematokritom pri krvodajalcih. Analiza eksona 8 gena *EPOR* ni pokazala razlik v nukleotidnem zaporedju med bolnikoma in referenčnim zaporedjem (RefSeq NM\_000121.3).

Uspešno smo vpeljali nov molekularno-genetski diagnostični test za določanje mutacij v regulatornih regijah gena *EPO* in eksonu 8 gena *EPOR*, ki se uporablja kot nadaljnji diagnostični korak pri bolnikih z *JAK2* negativnimi eritrocitozami. V prihodnje bomo diagnostični algoritem FE dopolnili z mutacijsko analizo vseh 13 genov povezanih z boleznijo.

---

## **Analiza potencialnih alosteričnih efektorjev katepsinov V in S na podlagi homologije alosteričnih mest s katepsinom K**

Erik Mršnik, Marko Novinec

*Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani*

mentor: Marko Novinec

Katepsina V in S sta predstavnika papainu podobnih peptidaz. Oba encima sta lizosomski cisteinski endopeptidazi, ki izkazujeta veliko elastazno učinkovitost. Glede na aminokislinsko zaporedje ju uvrščamo med katepsinu L podobne peptidaze, kjer najdemo še katepsina L in K. Katepsini so udeleženi v različnih patoloških procesih in so kot taki potencialne tarče za razvoj učinkovin, ki bi modulirale njihovo aktivnost. V zadnjem obdobju se vse bolj uveljavlja koncept fine regulacije encimske aktivnosti, ki jo omogočajo alosterična mesta. Vežava efektorjev na ta mesta navadno ne povzroči popolne inhibicije, kar je pomembno z vidika fizioloških funkcij, ki jih ima posamezen encim. Znano je, da aminokislinski ostanki v alosteričnih mestih sorodnih proteinov koevolvirajo. Raziskovalcem je uspelo dokazati mehanizme alosterije na katepsinu K in kristalografsko potrditi vežavo efektorja na alosterično mesto, ki so ga predvideli z uporabo statistične metode analize sklopitev.

Namen našega dela je bila identifikacija alosteričnih efektorjev katepsinov V in S na podlagi že znanih in ovrednotenih alosteričnih mehanizmov katepsina K. Naša hipoteza je bila, da so alosterična mesta slednjega ohranjena tudi pri ostalih dveh ter da lahko efektorji katepsina K po istem mehanizmu delujejo tudi na katepsina V in S.

Rezultati eksperimentov so pokazali, da široka specifičnost efektorjev ni redek pojav. Odkrili smo nekaj spojin, ki delujejo na vse tri encime. Primerjalno smo testirali več efektorjev katepsinov V in S. Vplive spojin smo primerjali tako na malih sintetičnih kot makromolekularnih substratih. Odkrili smo štiri spojine, ki so aktivnost obeh encimov na razgradnjo elastina močno znižale. S titracijskimi krivuljami, ki smo jih pridobili z uporabo sintetičnih substratov, smo ugotovili, da se afinitete učinkovin za vežavo na posamezen encim pogosto razlikujejo, čeprav je učinek na aktivnost primerljiv. Odkrili smo tudi spojino, ki na vse primerjane encime deluje preko enakega mehanizma. Po kemijski modifikaciji spojine pride do znatnega povišanja afinitete za katepsin K ter zmanjšanja za katepsina V in S. Za končno potrditev postavljene hipoteze bo potrebno kristalografsko preveriti obstoj predpostavljenih alosteričnih mest.

## **Načrtovanje in priprava konstruktov za analizo dimerizacije proteinov EpCAM in Trop2**

Jernej Vidmar, Tomaž Žagar, Živa Moravec, Aljaž Gaber, Miha Pavšič, Brigita Lenarčič

*Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani*

mentorji: Aljaž Gaber, Miha Pavšič, Brigita Lenarčič

Homologna proteina EpCAM in Trop2 sta edina do sedaj znana predstavnika družine transmembranskih glikoproteinov tipa I, imenovane GA773. Izražata se na površini večine epitelijskih celic in imata pomembno vlogo pri pravilnem razvoju epitelijskih tkiv, njuno izražanje pa je prav tako povečano pri številnih karcinomih. Slednje je tudi razlog, da je preučevanje njunega delovanja zanimivo z vidika načrtovanja novih pristopov za odkrivanje in zdravljenje tumorskih obolenj.

Oba proteina sta sestavljena iz treh delov: zunajcelične domene, ki predstavlja glavino proteina, transmembranske  $\alpha$ -vijačnice, preko katere sta vsidrana v celično membrano, in citosolnega dela, s katerim se vežeta na citoskelet. V membrani se najverjetneje nahajata v obliki homodimerov, kar potrjujejo podatki kristalnih struktur in simulacij molekulske dinamike. EpCAM preko interakcij dveh dimerov na sosednjih celicah predvidoma tvori homofilne, od kalcija neodvisne celične stike, kar pa za TROP 2 do sedaj še ni bilo pokazano. Oba proteina sta podvržena različnim oblikam regulirane proteolitske razgradnje, ki igra ključno vlogo pri sprostitvi znotrajceličnih delov, le-ti pa po transportu v celično jedro sodelujejo pri povečanem izražanju številnih proto-onkogenov.

Modeli kažejo, da je vsaj za nekatere stopnje proteolitske razgradnje nujno potrebno, da se protein nahaja v monomerni obliki, ker so cepitvena mesta sicer nedostopna. Da bi lažje pojasnili vlogo oligomerizacije v razgradnji smo pripravili tako monomerne mutante obeh proteinov, kot tudi konstrukte, ki bi še dodatno stabilizirali dimer. Dodatno smo pripravili še nekaj konstruktov, ki bodo omogočali lažje pripenjaje proteinov na različne površine, kar bo olajšalo nadaljnje raziskave. Ker se pri delu s transmembranskimi proteini pojavljajo številne ovire, smo se na začetku osredotočili zgolj na zunajcelična dela obeh molekul.

Raziskave na naših novih oblikah obeh proteinov bodo omogočile, da bolje opišemo vlogo oligomernega stanja obeh proteinov pri proteolitski razgradnji. Ker je slednja neposredno povezana s signalizacijo, bo to vodilo tudi do boljšega razumevanja epitelijskih tkiv in nastanka ter razvoja tumorskih obolenj. Delo bomo v nadaljevanju nadgradili še s študijami na epitelijskih in rakastih celicah.

## Ortokaspaze - kaspazam podobni encimi pri bakterijah

Jure Zabret, Marina Klemenčič, Marko Dolinar

*Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani*

mentorja: Marina Klemenčič, Marko Dolinar

Programirana celična smrt (PCS) je ena izmed značilnosti mnogoceličnih organizmov, ki so jo raziskovalci šele pred kratkim opazili tudi pri ostalih oblikah življenja. Proteini, ki so pri živalih odgovorni za izvajanje tega procesa, so encimi, ki se imenujejo kaspaze. Zanimivo, kaspaz ne najdemo pri rastlinah in glivah, pri teh organizmih enako funkcijo namreč opravljajo kaspazam podobni proteini, metakaspaze. Le-te so vključene v PCS, ko je celica izpostavljena oksidativnemu stresu, virusnim toksinom in antibiotikom.

Kljub temu, da so prokarioti enocelični organizmi, so raziskovalci pred kratkim ugotovili, da tudi pri bakterijah najdemo kaspazam podobne encime, kar nakazuje na to, da bi tudi bakterije mogoče za preživetje vrste lahko uporabljale podobne mehanizme kot večcelični organizmi kot so živali ali rastline. Klemenčič in sod. so pred kratkim objavili raziskavo, ki so jo izvajali na cianobakteriji *Microcystis aeruginosa*, ki je ena izmed cianobakterij, ki lahko povzroča škodljiva cvetenja vod v poletnem času. V tej raziskavi so prvi pokazali, da zapisi v DNA te cianobakterije zapisujejo za encime, ki so po svojih lastnostih zelo podobni rastlinskim in bakterijskim sorodnikom kaspaz, saj cepijo proteine za pozitivno nabitimi aminokislinskimi ostanki, prav tako kot metakaspaze. Glede na opažene lastnosti so te novoodkrite bakterijske encime poimenovali *ortokaspaze*.

V genomu enega izmed sevov *Microcystis aeruginosa*, NIES843, so tri zaporedja DNA, ki zelo verjetno zapisujejo za ortokaspaze. Da bi to hipotezo preverili, smo zaporedja pomnožili in rekombinantne proteine pripravili v bakteriji *E. coli*. Proteine smo poimenovali MaOC1, MaOC2 in MaOC3. Primerjava aminokislinskih zaporedij je pokazala, da samo proteina MaOC1 in MaOC3 vsebujeta aminokislino, ki omogočajo encimsko aktivnost, MaOC2 pa verjetno v celici opravlja kakšno drugo funkcijo. Za razliko od ortokaspaze, ki so jo opisali Klemenčič in sod., ki se aktivira tako, da se cepi na točno določenem mestu, MaOC3 za svojo aktivacijo ne potrebuje cepitve. Kljub različnemu načinu aktivacije, pa podobna afiniteta do substrata nakazuje na to, da imajo ortokaspaze različnih sevov cianobakterije *Microcystis aeruginosa* po vsej verjetnosti enake naloge v celici.

## Vloga malih RNA pri obrambnem odgovoru krompirja na okužbo z virusom Y krompirja

Maja Križnik<sup>1,2</sup>, David Dobnik<sup>1</sup>, Špela Baebler<sup>1</sup>, Marko Petek<sup>1</sup>, Jana Žel<sup>1</sup>, Kristina Gruden<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo

<sup>2</sup> Mednarodna podiplomska šola Jožef Stefan

mentorji: Kristina Gruden, Špela Baebler, David Dobnik

Krompirjev virus Y je (PVY) eden najpomembnejših povzročiteljev bolezni krompirja, ki na občutljivih sortah krompirja povzroča obročkasto nekrozo gomoljev krompirja, bolezen, ki močno vpliva na zmanjšanje kakovosti in količine krompirja ter posledično vodi v hude ekonomske izgube. Znano je, da imajo pri odgovoru na okužbo z virusi pomembno vlogo hormoni, eden ključnih je salicilna kislina (SA), ki povzroči kopičenje inhibitorjev virusnega pomnoževanja in zavira razširjanje virusa po rastlini. Ker so v zadnjem času številne raziskave dokazale pomembno vlogo malih nekodirajočih zaporedij RNA (miRNA, siRNA) pri modulaciji obrambnega odgovora rastline na mnoge povzročitelje bolezni, smo želeli ugotoviti kakšna je njihova vloga pri interakciji krompir - PVY.

V okviru raziskave smo uporabili tolerantno sorto krompirja Désirée in transgene rastline NahG-Désirée, slednje zaradi vstavljenega gena *nahg*, ki kodira salicilat hidrosilazo niso sposobne akumulirati SA. Rastline NahG-Désirée zaradi pomanjkanja SA razvijejo močna bolezenska znamenja in vsebujejo večje koncentracije virusa v primerjavi s tolerantnimi netransgenimi rastlinami Désirée. Z uporabo teh rastlin smo želeli ugotoviti vpliv pomanjkanja SA na regulatorni nivo malih RNA in poiskati povezave v regulaciji, ki bi lahko prispevale k pojavu simptomov in/ali k povečani koncentraciji virusa.

Z uporabo sekvenciranja naslednje generacije in metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo v realnem času (RT-qPCR) smo našli številne virusno regulirane male RNA, katerih količina se je spremenila po virusni okužbi pri obeh genotipih krompirja. Poleg tega smo našli mnoge male RNA s spremenjeno količino le v z virusom okuženih rastlinah Désirée. Dodatno smo z uporabo sekvenciranja naslednje generacije in bioinformatičnih analiz identificirali več kot 100 novih zaporedij miRNA ter več kot 1000 zaporedij siRNA.

Da bi določili njihovo funkcionalno vlogo smo za vse male RNA poiskali tarčne mRNA z uporabo *in silico* pristopa in sekvenciranja degradoma. Regulacijo na nivoju malih RNA smo primerjali tudi s podatki o izražanju njihovih tarčnih genov in odkrili kar nekaj negativnih korelacij. Pokazali smo, da male RNA povezane s tolerantnim odgovorom krompirja negativno regulirajo številne mRNA, ki kodirajo imunske receptorje, ključne biosintezne encime in transkripcijske faktorje iz številnih hormonskih signalizacijskih poti.

## Učinek metformina na celice raka dojke v razmerah *in vitro* je odvisen od koncentracije glukoze v gojišču

Maruša Rajh<sup>1</sup>, Klemen Dolinar<sup>1,2</sup>, Katarina Miš<sup>2</sup>, Mojca Pavlin<sup>1</sup>, Sergej Pirkmajer<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Fakulteta za elektrotehniko Univerze v Ljubljani*

<sup>2</sup> *Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani*

mentor: Sergej Pirkmajer

Metformin se več kot 50 let uporablja za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2. Rezultati nekaterih raziskav kažejo, da metformin preprečuje in upočasni rakava obolenja pri bolnikih, ki imajo sladkorno bolezen. Metformin lahko deluje na rakave celice zaradi sistemskega vpliva na telo, saj zniža koncentracijo glukoze (krvnega sladkorja) in inzulina v krvi sladkornih bolnikov. Lahko pa vpliva na rakave celice tudi neposredno preko zaviranja celičnega dihanja v mitohondrijih. Celice raka dojke MDA-MB-231 so široko uporabljen model za preučevanje raka dojke. Nekateri raziskave so pokazale, da metformin zavira rast celic MDA-MB-231, medtem ko druge raziskave nakazujejo, da metformin na te celice nima takšnega učinka. Da bi razrešili nekonsistentnost rezultatov, smo proučevali vpliv menjave celičnega gojišča na učinek metformina na celice MDA-MB-231. Celice MDA-MB-231 smo gojili v prisotnosti različnih koncentracij glukoze. Ugotovili smo, da je v razmerah, kjer smo vzdrževali stalno koncentracijo glukoze z redno menjavo gojišča, metformin upočasnil rast celic MDA-MB-231 le v odsotnosti glukoze. Če je bila glukoza prisotna v fizioloških koncentracijah in smo redno menjavali gojišče, pa metformin ni imel nobenega učinka na rast celic MDA-MB-231. Prav nasprotno pa je metformin zavrl rast teh celic, če gojišča več dni nismo zamenjali. V tem primeru so namreč celice MDA-MB-231 porabile skoraj vso glukozo v gojišču, kar pojasni njihovo večjo občutljivost na metformin. Da bi posnemali pomanjkanje glukoze v gojišču smo zavirali glikolizo z 2-deoksi-D-glukozo (2-DG). Kombinacija metformina in 2-DG je upočasnila rast celic MDA-MB-231 v prisotnosti glukoze. Naši rezultati nakazujejo, da bi bila kombinacija metformina in 2-DG morda lahko učinkovita pri zdravljenju nekaterih oblik raka dojke, ki so odporne na druge oblike zdravljenja. Za natančnejšo opredelitev teh učinkov bodo potrebne nadaljnje raziskave. Predstavili bomo, zakaj pomanjkanje glukoze poveča občutljivost celic raka dojke na metformin. Poleg tega bomo poudarili pomen poznavanja temeljnih fizioloških in biokemičnih procesov v celicah pri raziskovanju potencialnih učinkovin za zdravljenje raka.

## Vpliv cistatina F na delovanje citotoksičnih limfocitov T

Mateja Prunk<sup>1</sup>, Milica Perišić Nanut<sup>1</sup>, Jerica Sabotič<sup>1</sup>, Janko Kos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Odsek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan*

<sup>2</sup> *Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani*

mentor: Janko Kos

Naš imunski sistem se proti rakavim celicam bojuje s pomočjo citotoksičnih imunskih celic, ki rakave celice ubijejo. Eden izmed načinov, kako to naredijo, je sproščanje molekul, imenovanih perforin in grancimi. Perforin omogoči vstop grancimov v rakavo celico, kjer nato grancimi sprožijo smrt celice. Grancimi bi lahko bili nevarni tudi za same citotoksične imunske celice, zato se v njih nahajajo v neaktivni obliki, aktivirajo pa jih druge molekule in sicer katepsina C in H. Cistatin F lahko zavira delovanje katepsinov C in H, zato menimo, da vpliva tudi na delovanje citotoksičnih imunskih celic. Namreč, če prepreči aktivacijo molekul, ki so ključne za sprožitev smrti rakavih celic, s tem prepreči ali vsaj omeji sposobnost ubijanja takih celic.

Zanimivo je, da lahko rakave celice uidejo ubijanju s strani citotoksičnih imunskih celic. Eden izmed načinov je, da v imunskih celicah sprožijo neodzivno stanje, imenovano anergija, ko imajo citotoksične celice vse potrebne mehanizme za ubijanje rakavih celic, vendar tega kljub temu ne storijo. Kaj se zgodi v takih neodzivnih citotoksičnih celicah na molekularnem nivoju, še ni znano, v naši skupini pa smo pokazali, da je ena izmed ključnih molekul pri tem procesu ravno cistatin F. Razumevanje delovanja citotoksičnih imunskih celic je lahko v veliko pomoč pri razvoju novih pristopov tako pri zdravljenju raka kot tudi ostalih bolezni, pri katerih je spremenjeno delovanje citotoksičnih imunskih celic, kot so kronične okužbe, alergije in avtoimunske bolezni.



---

**Vpliv butilhidroksianizola na signalne poti, sprožene s citokinom TNF- $\alpha$ , na celični liniji  
človeškega adenokarcinoma debelega črevesa**

Nina Strah<sup>1</sup>, Nežka Kavčič<sup>2,3</sup>, Katarina Pegan<sup>4</sup>, Boris Turk<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup> *Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani*

<sup>2</sup> *Oddelek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo, Institut Jožef Stefan*

<sup>3</sup> *Mednarodna podiplomska šola Jožef Stefan*

<sup>4</sup> *Lek d.d., Ljubljana*

<sup>5</sup> *Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov, Ljubljana*

mentor: Boris Turk

Programirana celična smrt je proces, s katerim večcelični organizmi odstranijo odvečne ali škodljive celice, kar je potrebno za normalen razvoj organizma. Poznanih je več oblik programirane celične smrti, ki se med seboj ločijo na podlagi morfoloških, biokemijskih in imunoloških značilnosti. Pri našem delu smo se osredotočili na apoptozo in nekroptozo. Obe obliki celične smrti lahko sprožimo s citokinom tumorske nekroze alfa (TNF $\alpha$ ) v kombinaciji z različnimi inhibitorji. Sam TNF $\alpha$  ne sproži celične smrti spontano, ampak primarno aktivira preživetveno pot. Pri vseh treh poteh naj bi pomembno vlogo kot signalne molekule igrale tudi reaktivne kisikove spojine (ROS). Zato smo tekom magistrskega dela želeli natančneje raziskati, ali lahko z uporabo antioksidanta zaviralno vplivamo na apoptozo, nekroptozo in preživetveno pot pri človeških celicah adenokarcinoma debelega črevesa (HT-29). Kot antioksidant smo si izbrali butilhidroksianizol (BHA), ki se pogosto uporablja kot konzervans v kozmetični in prehrabeni industriji.

## Vpliv metformina na energijsko presnovo v celicah raka dojke in raka prostate

Nives Škorja<sup>1,2</sup>, Maruša Rajh<sup>2</sup>, Klemen Dolinar<sup>1,2</sup>, Katarina Miš<sup>1</sup>, Mojca Pavlin<sup>2</sup>, Sergej Pirkmajer<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> *Fakulteta za elektrotehniko Univerze v Ljubljani*

mentor: Sergej Pirkmajer

Metformin se že desetletja uporablja kot zdravilo za sladkorno bolezen tipa 2. S primerjalnimi in retrospektivnimi študijami je bilo ugotovljeno, da ima metformin po vsej verjetnosti protitumorni učinek. Pri sladkornih bolnikih, ki redno jemljejo metformin, bi naj preprečeval nastanek raka, pri bolnikih z rakom pa izboljšal odziv na zdravljenje ter zmanjšal smrtnost zaradi raka. Mehanizem, prek katerega naj bi metformin zaviral razvoj raka ni povsem jasen.

V naši študiji smo preučili, kako metformin vpliva na energijsko presnovo celic raka dojke MDA-MB-231 in celic raka prostate PC-3. Z uporabo barvila TMRM, ki se kopiči v delujočih mitohondrijih in kolorimetričnega testa za meritev aktivnosti fumaraze, smo ugotovili, da metformin zavira celično dihanje v celicah raka dojke. Z encimskim testom za določanje koncentracije laktata (mlečne kisline) v mediju, smo ugotovili tudi, da metformin spodbudi nastajanje laktata v celicah raka dojke in raka prostate, kar posredno kaže na to, da metformin spodbuja aerobno glikolizo. To bi lahko bila posledica zaviranja celičnega dihanja z metforminom. Zaradi zmanjšanega pridobivanja ATP v mitohondrijih morajo namreč rakave celice pridobiti več ATP z glikolizo. Lahko pa bi bila z metforminom spodbujena glikoliza povezana z aktivacijo z AMP aktivirane protein-kinaze (AMPK). AMPK je namreč glavni celični energijski senzor, ki se aktivira ob pomanjkanju energije in sproži prilagoditvene procese, ki pomagajo celicam preživeti takšne neugodne razmere. Z uporabo nekaterih drugih modulatorjev energijske presnove smo ugotovili tudi, da se celice raka dojke in raka prostate razlikujejo v presnovnih značilnostih. V referatu bomo predstavili podobnosti in razlike v presnovnih odzivih celic raka dojke in raka prostate pri tretiranju. Poznavanje presnovnih značilnost rakavih celic je pomembno, ker bi učinkovine, ki modulirajo delovanje energijske presnove, lahko predstavljale podlago za razvoj novih pristopov k zdravljenju raka.

## Filogenija mutacij virusa Ebola

Petra Vivod, Irena Oven, Nejc Bravničar

*Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani*

mentorja: Irena Oven, Nejc Bravničar

V raziskavi, ki smo jo naredili, smo spremljali mutacije in filogenetsko evolucijo virusa Ebola. Ebola je nitast virus, z enoverižno linearno RNA, ki jo sestavlja blizu 19000 baznih parov. Virusna RNA nosi zapis za sedem genov, ki kodirajo nukleoprotein (NP), proteine VP35, VP40, VP30, VP24, polimerazo L in glikoprotein (GP). Geni za GP, NP in polimerazo L so variabilni, medtem ko imajo VP24, VP30, VP35 in VP40 ohranjeno zaporedje. Iz baze podatkov NCBI sem zbrala nukleotidna zaporedja gena za GP in s pomočjo računalniških orodij naredila primerjavo in izrisala filogenetsko drevo virusa Ebola.

Znotraj enega izbruha je stopnja mutacij virusa relativno nizka, medtem ko se med izbruhi v naravnih prenašalcih netopirjih, že znotraj ene geografske lokacije in v kratkem časovnem obdobju pojavlja visoka genetska raznolikost, v največji meri kot posledica rekombinacije genetskega materiala virusa. Filogenetska raziskava je pokazala, da se je sev, ki je povzročil izbruh v zahodni Afriki 2014 od ostalih sevov osrednje Afrike ločil že nekaj let nazaj in se nato razvijal ločeno. Zanimiva je tudi pozicija seva, ki je povzročil izbruh v Demokratični republiki Kongo (DRK) leta 2014. Tudi ta sev se je sev razvijal popolnoma ločeno od sevov, ki so kot zadnji izbruhnili v DRK leta 2008, in si od analiziranih vzorcev najbližjega skupnega prednika deli s sevi, ki so izbruhnili v Gabonu leta 1994. Stopnja mutacij te vrste virusa je  $7,06 \cdot 10^{-4}$  nukleotidnih substitucij/mesto/leto, kar je sicer manj v primerjavi z virusom gripe, pa vendar še vedno dovolj, da morajo biti cepiva specifična za vsak izbruh posebej. Za ebolo še vedno ni učinkovitega zdravila. Razlog je ta, da virus najprej napade celice imunskega odziva, ki zato ne nudi prave obrambe. Verjetno pa je tudi, da na virus deluje selekcijski pritisk, kot posledica človeške odpornosti in delovanja protiteles v zdravilih. Zaporedje virusa, ki je povzročil zadnji izbruh, se na ravni nukleotidov približno za 3 % razlikuje od virusov, ki so povzročili prejšnje izbruhe. Za enkrat vpliv teh sprememb še ni znan, bi bil pa lahko odgovor ključnega pomena pri hitrejšem razvoju učinkovitejših zdravil.

## Funkcijska analiza nekaterih mutant katepsina K

Tadej Ulčnik, Marko Novinec

*Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani*

mentor: Marko Novinec

Katepsin K je cisteinska proteaza, ki se v celici nahaja v lizosomih, ali pa se izloča v zunajcelični matriks. Zaradi svoje sposobnosti razgradnje kolagena, elastina in drugih komponent matriksa, je pomemben pri presnavljanju kostnine, nepravilnosti v delovanju pa lahko vodijo v nastanek bolezenskih stanj, med drugim tudi osteoporoze. Za nekatere komponente zunajceličnega matriksa je bilo ugotovljeno, da alosterično, tj. z vezavo izven aktivnega mesta, vplivajo na aktivnost encima. Pretekle raziskave so bile osredotočene na vpliv mehanizma alosterije na samo aktivnost encima. Z uporabo računalniških metod je bilo določeno alosterično omrežje, tj. ključni aminokislinski ostanki za prenos informacije do aktivnega mesta. Identificirane so bile nekatere spojine, ki delujejo kot alosterični modulatorji tega encima, ter preučen je bil njihov vpliv na samo delovanje encima.

Naše delo je zajemalo pripravo nekaterih alaninskih mutant posameznih ostankov alosteričnega omrežja katepsina K (mutante R8A, D55A, V164A in V167A), njihovo karakterizacijo, ter preučevanje njihove sposobnosti razgradnje kolagena. Namen je bil preučiti kako zamenjava posameznih aminokislin, ki tvorijo alosterično omrežje, vpliva na samo delovanje encima. Pričakovano je bilo, da bo aktivnost mutant manjša, vendar pa bi določena menjava aminokislin lahko povzročila spremembo strukture tudi na tak način, da bi postal encim bolj aktiven. Mutante smo okarakterizirali z uporabo substrata Z-Phe-Arg-AMC. Pri D55A je bila afiniteta do substrata ( $K_m$ ) dvakrat nižja, pri ostalih mutantah je bila podobna divjem tipu. Katalitična konstanta ( $k_{cat}$ ) se je pri mutantah R8A in D55A znižala okoli trikrat, pri V164A in V167A pa šestkrat. Test razgradnje topnega kolagena je pokazal, da se sama sposobnost razgradnje med mutantami razlikuje, saj pri R8A mutacija ni imela vpliva, med tem ko je bila mutanta V167A manj sposobna razgraditi kolagen, V167A pa ga sploh ni razgradila. Podobni rezultati so bili pri testu razgradnje kolagena z vezanim fluorescein izotiocianatom (FITC). V splošnem so vse mutante imele manjšo aktivnost kot divji tip.

## **Analiza promotorskih zaporedij genov signalizacijskega omrežja v interakciji med krompirjem in virusom PVY**

Tjaša Lukan, Anna Coll, Špela Baebler, Kristina Gruden

*Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo*

mentorica: Kristina Gruden

Rastlinski hormoni so ključne signalne molekule, ki poleg rasti, razvoja in razmnoževanja uravnavajo tudi obrambo rastlin. Trije najpomembnejši hormoni, ki sodelujejo v rastlinskem imunskem odgovoru in predstavljajo ogrodje obrambnega signalizacijskega omrežja, so salicilna kislina (SA), jasmonska kislina (JA) in etilen (ET). Vloga teh hormonov kot ključnih primarnih signalov pri lokalnem in sistemskem odzivu je dobro poznana, medtem ko je mehanizem delovanja slabše poznan. Namen dela je nadgraditi razumevanje vloge SA, JA in ET v rastlinskem imunskem odgovoru s poudarkom na analizi promotorjev izbranih genov, ki sodelujejo v obrambni signalizaciji krompirja po okužbi s krompirjevim virusom Y (PVY).

Z namenom razumeti transkripcijsko omrežje signalizacijskih komponent v krompirju po okužbi s PVY, smo analizirali promotorje šestih genov, ki sodelujejo v imunskem odgovoru. Promotorska zaporedja, ki smo jih pomnožili iz treh sort krompirja, smo po sekvenciranju primerjali z znanimi promotorskimi zaporedji modelnega organizma *Solanum tuberosum* Pureja in analizirali z različnimi bioinformatскими orodji za določanje regulatornih zaporedij in transkripcijskih faktorjev, specifičnih za vezavo na regulatorna zaporedja izbranih promotorjev. Rezultati so pokazali razlike v zaporedjih promotorjev med različnimi sortami krompirja, poleg tega pa presenetljivo tudi razlike v zaporedjih promotorjev znotraj ene sorte za posamezen gen. Z uporabo orodij TRANSFAC, PlantCARE in PLACE smo določili mesta vezave transkripcijskih faktorjev in ugotovili razlike v sposobnosti promotorjev za vezavo transkripcijskih faktorjev, ključnih v rastlinski obrambni signalizaciji, znotraj enega kultivarja in med različnimi kultivarji.

## Človeške mišične celice kot model za sodobne biomolekularne raziskave živčno-mišičnih obolenj

Vid Jan<sup>1</sup>, Katarina Miš<sup>1</sup>, Urška Matkovič<sup>1</sup>, Zoran Grubič<sup>1</sup>, Matej Podbregar<sup>1,2</sup>, Sergej Pirkmajer<sup>1</sup>,  
Tomaž Marš<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> *Univerzitetni klinični center, Ljubljana*

mentor: Tomaž Marš

Skeletne mišice, največje telesno tkivo, omogočajo gibanje, dihanje, vzdrževanje telesne drže, govor in številne nemotorične funkcije, kot sta presnova krvnega sladkorja in kalija. Mišice predstavljajo tudi zalogo beljakovin, ki jih lahko telo porabi med stresnim odzivom v različnih bolezenskih stanjih, kot so težke okužbe in poškodbe. Delovanje mišic je lahko okrnjeno neposredno zaradi prizadetosti mišičnih vlaken ali posredno zaradi prizadetosti motoričnega nevrona ali živčno-mišičnega stika (motorične ploščice). Primera tovrstnih živčno-mišičnih obolenj sta na primer miastenija gravis in miopatija kritično bolnih.

Čeprav je bilo v preteklih letih odkritih že mnogo podrobnosti o razvoju tovrstnih obolenj in njihovem vplivu na mišice, pa lahko večinoma še vedno le zdravimo simptome in upočasnimo napredovanje bolezni. Za nadaljnji napredek pri zdravljenju živčno-mišičnih obolenj potrebujemo zanesljiv model za preučevanje regeneracije (obnavljanja) mišic, ki bi tudi v laboratorijskih razmerah omogočal, da regeneracija mišice poteka tako kot v telesu. Regeneracija skeletne mišice se prične z aktivacijo satelitskih celic, ki se spremenijo v mioblaste. Mioblasti se najprej aktivno delijo, nato pa se prične proces zorenja in fuzije mioblastov v večjedrne mišične cevčice. V laboratoriju lahko do te stopnje regeneracijo mišice spremljamo v neoživčeni kulturi človeških mioblastov oziroma mišičnih cevčic. Slabost takšnega pristopa je, da neoživčene človeške mišične cevčice niso sposobne krčenja, kar je v telesu temeljna lastnost mišičnih vlaken. Da postanejo človeške mišične cevčice v kulturi sposobne krčenja, je potrebno oživčenje ali stimulacija z električnim tokom. V našem laboratoriju mišične cevčice oživčimo tako, da na kulturo mišičnih cevčic položimo eskplante podganje embrionalne hrbtenjače. Iz eksplantov hrbtenjače nato zrastejo motorični nevroni, ki oživčijo mišične cevčice. Po vzpostavitvi živčno-mišičnih stikov mišične cevčice dozori in se prične spontano krčiti.

S pomočjo opisanega *in vitro* modela lahko preučujemo številne biomolekularne vidike delovanja skeletnih mišic in živčno-mišičnega stika. Z metodo qPCR merimo izražanje mRNA, z metodo odtis western pa izražanje beljakovin. Poleg tega lahko z uporabo interferenčne RNA utišamo specifične gene in tako opredelimo njihov pomen za delovanje mišičnih celic. V predavanju bomo predstavili, kako pripravimo in oživčimo mišične celice ter pokazali, kako lahko oživčene mišične cevčice uporabimo za preučevanje delovanja zdravil.

**Vpliv različnih pogojev skladiščenja na ekspresijo antioksidativnih genov v jabolkah**Vito Mihael Savinek<sup>1,2</sup>, Benedetto Ruperti<sup>2</sup><sup>1</sup> *Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani*<sup>2</sup> *Oddelek za agronomijo, hrano, naravne surovine, živali in okolje Univerze v Padovi, Italija*

mentor: Benedetto Ruperti

V študiji smo preiskovali ekspresijo genov, ki kodirajo encime v metabolizmu antioksidantov v jabolkih, ki so bila skladiščena v kontrolni atmosferi in v okolju z zmanjšanim kisikom. Raziskovali smo vpliv različnih pogojev skladiščenja na regulacijo oksidativnega stresa, in sicer: (1) shranjevanje v atmosferi z zmanjšanim kisikom (kontrolna atmosfera, 1 % O<sub>2</sub> in 1 % CO<sub>2</sub>) ter (2) začetni nizek oksidacijski stres (ILOS, 0,4 % kisika) in normoksijo (Nox, 20 % O<sub>2</sub>). Rezultati so pokazali, da ima koncentracija kisika močan vpliv na metabolizma askorbinske kisline in glutaciona v primerjavi s skladiščenjem pod atmosferskim pritiskom. Z uporabo semikvantitativnega RT-PCR smo ugotovili, da je gen, ki je vključen v metabolizem glutaciona in kodira glutation reduktazo (GR) prehodno pozitivno reguliran v ILOS in negativno reguliran v normoksiji in kontrolirani atmosferi. V ILOS pogojih smo prepričani, da obstaja zmanjšani metabolizem glutaciona. Analiza ekspresije ostalih genov, vključenih v metabolizem glutaciona in askorbata je v teku.

**Biološko aktivne snovi v plodovih aronije (*Aronia melanocepa*) in njihov vpliv na rast kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*)**

Klavdija Bastl, Rok Gorenšek, Jožica Kovač, Majda Kamenšek Gajšek

*Gimnazija Celje-Center*

mentorici: Jožica Kovač, Majda Kamenšek Gajšek

V okviru raziskovalne naloge sva želela ugotoviti vsebnost antioksidantov, natančneje antocianinov v plodovih aronije (*Aronia melanocarpa*). Prav tako sva ugotavljala, kako vplivajo te biološko aktivne snovi na rast kvasnih celic (*Saccharomyces cerevisiae*) v gojišču.

Za analizo smo iz zamrznjenih plodov aronije pripravili sok, kateremu smo v nadaljnjih poskusih izmerili količino prisotnih sladkorjev, določili pH in na podlagi rezultatov raziskav izračunali masno koncentracijo antocianinov v aroniji.

Za ugotavljanje vplivov aktivnih snovi iz aronije na žive organizme smo izbrali kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, saj so evkarionti, ki imajo precej podobnosti s človeškimi celicami. Prav tako je znana zgradba njihovega genoma.

Najprej smo ugotovili ustrezno koncentracijo glukoze, ki jo suhe kvasovke potrebujejo za aktivacijo in rast v gojišču. Nato smo izvedli poskus, kjer smo jim dodali sok aronije in hkrati izvedli kontrolne poskuse. S spektrofometrijo smo skušali potrditi rezultate o številu kvasnih celic, ki smo jih dobili s štetjem s hemicitometrom.

Aronijin sok, ki smo ga dodali kvasnim celicam v gojišču, je povečal njihovo število v primerjavi s kontrolnimi poskusi. Skupek antioksidantov v soku aronije je povečal število kvasnih celic, vendar nismo mogli ugotoviti, kako na rast in delitev kvasnih celic vpliva posamezen antocianin.



## **Nastanek kemiluminiscenčne svetlobe in njen prehod skozi celično membrano evkariontov**

Luka Gajšt<sup>1</sup>, Kaja Ivanc<sup>1</sup>, Alma Kapun Dolinar<sup>1</sup>, Marko Jeran<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> *Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola*

<sup>2</sup> *Kemijski inštitut*

<sup>3</sup> *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani*

mentorja: Alma Kapun Dolinar, Marko Jeran

V prispevku predstavljamo katalitsko učinkovitost kovin prehoda ter kvarternih amonijevih soli na sproščanje emisije svetlobe ob reakciji kemiluminiscence modelnega organskega hidrazida v vodnem mediju. Kemiluminiscenco, tvorbo emisije svetlobe kot posledico kemijske reakcije, smo uporabili za opazovanje modelnega prenosa organskega hidrazida v membrano evkariontov. Ob pomoči termošoka in rasti mikroorganizmov v raztopini organskega hidrazida, prikažemo uspešnost prenosa. Prenos inertne luminiscenčne snovi v celice je dandanes pomemben predmet raziskav, predvsem na področju celične biologije.

## Proučevanje inhibitorjev katepsina X *in vitro* z merjenjem fluorescence

Krištof Fortuna<sup>1</sup>, Tončka Požek-Novak<sup>1</sup>, Bojan Doljak<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gimnazija Bežigrad

<sup>2</sup> Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani

mentorja: Tončka Požek-Novak, Bojan Doljak

Katepsin X je lizosomska cisteinska proteaza, ki je bila v zadnjem času vključena v številne raziskave. V povečanih koncentracijah je katepsin X prisoten pri mnogih bolezenskih stanjih in vpliva zlasti na rast in napredovanje tumorjev. Glavni cilj terapije teh bolezni je zmanjšati aktivnost katepsina X z inhibitorji. Za iskanje in razvoj novih inhibitorjev je treba najprej vzpostaviti primerne *in vitro* metode za določanje njihove inhibitorne aktivnosti. Prvi namen raziskovalne naloge je bila optimizacija encimske metode za preizkušanje inhibitorjev s spreminjanjem koncentracij in razmerij encima in substrata. Optimizirano metodo, ki temelji na merjenju fluorescence nastalega produkta, smo nato uporabili za potrditev inhibitornih aktivnosti dveh že znanih ireverzibilnih inhibitorjev, AMS36 in E64. Kot smo pričakovali, je E64 takoj pokazal popolno inhibicijo (99,9 %), medtem ko je AMS36 visoko inhibitorno aktivnost (81,1 %) pokazal šele po predinkubaciji brez L-cisteina. Z optimizirano metodo smo preizkusili tudi dva nova potencialna reverzibilna inhibitorja, tripeptida TCS in TCT, ki sta pokazala obetavni inhibitorni aktivnosti (29,2 % in 24,0 %) po predinkubaciji brez L-cisteina. Oba tripeptida, katerih mehanizem inhibicije je najverjetneje tvorba disulfidne vezi s Cys31 v aktivnem mestu katepsina X, predstavljata dobro izhodišče za razvoj novih specifičnih in reverzibilnih inhibitorjev katepsina X, uporabnih tudi v terapiji. Ker je pot iskanja novih zdravilnih učinkovin zelo kompleksna tako s stališča ekonomičnosti kot časovne sprejemljivosti, mora biti pristop k iskanju novih inhibitorjev dobro preišljen in dosleden. Zato v našem pristopu vidimo širok potencial uporabnosti za farmacevtsko industrijo.

## Računalniške simulacije karcinogeneze $\beta$ -propiolaktona

Ana Štuhec<sup>1</sup>, Zdenka Keuc<sup>1</sup>, Urban Bren<sup>2</sup>, Eva Brglez Mojzer<sup>2</sup>

<sup>1</sup> II. gimnazija Maribor

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

mentorji: Zdenka Keuc, Urban Bren, Eva Brglez Mojzer

$\beta$ -propiolakton je ciklični organski ester, ki se uporablja kot standardna referenčna kemikalija v *in vitro* raziskavah mutageneze. Ugotovljeno je bilo, da v živalskih celicah povzroča raka - zato se upravičeno predvideva, da je karcinogen tudi za ljudi. Kljub temu se še dandanes uporablja v medicini za sterilizacijo instrumentov in deaktivacijo virusov v cepivih.

V okviru naloge smo s kvantnomehanskimi in semiempiričnimi metodami izvedli računalniške simulacije reakcij acilacije in alkilacije  $\beta$ -propiolaktona na metilirane molekule adenina, citozina, gvanina in timina ter na anionsko obliko glutationa. Simulacije reakcijskih mehanizmov in izračuni Gibbsovih prostih energij so bili izvedeni po metodah HF, DFT, ter različnih semiempiričnih in hibridnih metodah. Vpliv topila je bil izračunan po modelih PCM, LG in po modelu AMSOL. S primerjavo aktivacijskih prostih energij izračunanih z različnimi metodami za posamezno reakcijo je bilo potrjeno, da je v splošnem mehanizmu alkilacije  $\beta$ -propiolaktona na nukleobaze ugodnejši od acilacije. Potrdili smo, da je najverjetnejše vezavno mesto  $\beta$ -propiolaktona na DNA gvanin (N7) in da so adukti z adeninom, citozinom in timinom bistveno manj verjetni. Korelacija med izsledki podobnih *in vitro* raziskav in izvedeno kvantnomehansko študijo je zelo visoka, kar dodatno potrjuje naše rezultate.

V nadaljevanju je bilo ugotovljeno, da je mutageno spremembo na DNA mogoče preprečiti z glutationom. Kvantnomehanski računi nakazujejo, da lahko glutation molekuli  $\beta$ -propiolaktona prepreči 'dostop' do dednega materiala tako, da z  $\beta$ -propiolaktonom, preden le-ta doseže molekulo DNA, reagira po energijsko ugodnejšem mehanizmu. Na tak način glutation učinkuje kot inhibitor karcinogenega delovanja  $\beta$ -propiolaktona.

## Vpliv resveratrola na rast in razvoj rakavih celic

Tiana Karmen Kokalj<sup>1</sup>, Ana Menegalija<sup>1</sup>, Sonja Artač<sup>1</sup>, Maja Gerden<sup>1</sup>, Nežka Kavčič<sup>2</sup>, Boris Turk<sup>2</sup>,  
Katarina Pegan<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Gimnazija Vič*

<sup>2</sup> *Institut Jožef Stefan*

<sup>3</sup> *Lek, Ljubljana*

mentorji: Sonja Artač, Maja Gerden, Nežka Kavčič, Boris Turk, Katarina Pegan

Rak je bolezen sodobnega časa, pri kateri se celice kopičijo kot posledica nenadzorovane delitve in se lahko razširijo na oddaljena mesta po telesu, saj jih imunski sistem ne odstrani dovolj hitro ali pa jih ni sposoben odstraniti. Kljub naprednemu zdravljenju raka izzivi na tem področju ostajajo. Za zdravljenje raka se namreč uporabljajo kemoterapevtiki, ki so pogosto toksični tako za rakave kot za zdrave celice, kar povzroča hude stranske učinke. Tekom iskanja novih učinkovin so znanstveniki odkrili antioksidant resveratrol, ki vpliva na hitrost celičnega cikla.

V sklopu raziskovalne naloge smo želeli oceniti vpliv resveratrola na preživetje rakavih in ne-rakavih celic. Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da dodajanje resveratrola zvišuje delež celične smrti v odvisnosti od časa inkubacije, kar se kaže kot morfološke in biokemične spremembe. Nismo pa opazili nobene razlike med rakavimi in ne-rakavimi celicami. Zaključimo lahko, da resveratrol kljub velikemu potencialu še ni popolno zdravilo za rakava obolenja, saj njegov vpliv na celotni organizem še ni v celoti raziskan.

# **LAPANJETOVI NAGRAJENCI**

za leto 2016 so

prof. dr. Peter Maček

dr. Mojca Mattiazzi Ušaj

prof. dr. Marija Žakelj Mavrič



## Kaj imajo skupnega aktinoporini in egerolizini?

Peter Maček

*Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani*

Prejemnik Lapanjetove nagrade za leto 2016

Aktinoporini so proteini, ki tvorijo kationsko-selektivne pore v umetnih in celičnih membranah. Prvič so jih izolirali iz morskih vetrnic v 70-letih prejšnjega stoletja. Sprva so domnevali, da so tipični za morske vetrnice, vendar jih zasledimo tudi pri drugih ožigalkarjih, nekaterih mehkužcih in celo mahovih, ne pa pri bakterijah. Podobno kot aktinoporine so prvič opisali tudi egerolizine v 70-tih, sprva zgolj glivne, pozneje pa tudi bakterijske in rastlinske, znan pa je le en živalski predstavnik iz nočnega metulja. Predstavniki obeh skupin proteinov so vpleteni v tvorbo trans-membranskih por, vendar domnevamo, da vse funkcije ne biološke vloge teh dokaj razširjenih proteinov še niso povsem pojasnjene.

Čeprav se aktinoporini in egerolizini sekvenčno precej razlikujejo, pa kristalna zgradba pokaže na precejšnjo podobnost. Pri obeh je jedro molekule  $\beta$ -sendvič, ki je pri aktinoporinih opremljen dodatno še z N-končno  $\alpha$ -vijačnico in še eno  $\alpha$ -vijačnico sredi polipeptidne verige. Kljub velikim sekvenčnim razlikam pa se oboji vežejo s pomočjo aminokislinskih ostankov na zankah  $\beta$ -sendviča na membranski sfingomielin, nekateri egerolizini pa tudi na nevretenčarski analog sfingomielina, to je ceramid fosfoetanolamin. Od vezave dalje pa se mehanizem tvorbe trans-membranskih por teh dveh skupin proteinov precej razlikuje. Oligomerni aktinoporini na membrani uporabijo svoje N-končne vijačnice za tvorbo manjše transmembranske pore tipa  $\alpha$ , med tem ko nekateri egerolizini, potem ko so že na membrani, pritegnejo na membrano še dodatni protein z domeno MACPF in skupaj z njim nato oligomerizirajo v 13-merno transmembransko poro tipa  $\beta$ . Kaže pa da, nekateri insekticidni bakterijski egerolizinom-podobni proteini sodelujejo pri poškodbah membran tudi z več proteini, med drugim tudi kristalnim proteinom, ki je podoben aerolizinu.

