

Institut "Jožef Stefan", Ljubljana, Slovenija



FFA

UNIVERZA V LJUBLJANI
Fakulteta za farmacijo

Minisimpozij Znanost za zdravje

Letno srečanje programske skupine P4-0127

Ljubljana, 3. 12. 2024



Javna agencija za znanstvenoraziskovalno
in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije

Minisimpozij Znanost za zdravje
Letno srečanje programske skupine P4-0127

Organizator

Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija
Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Uredniki

Prof. dr. Janko Kos
Doc. dr. Ana Mitrović
Doc. dr. Urša Pečar Fonović

Tehnični uredniki

Doc. dr. Ana Mitrović
Doc. dr. Urša Pečar Fonović

Izdajatelj

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Leto izdaje

2024

Spletna izdaja

Ljubljana, 3. 12. 2024

Brezplačna objava

<https://www.ffa.uni-lj.si/knjiznica/e-knjige>

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

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID 216771075
ISBN 978-961-7231-01-4 (PDF)

Pregled

Naslov: Minisimpozij Znanost za zdravje: Letno srečanje programske skupine P4-0127

Datum: 3.12.2024

Lokacija: Predavalnica B220, Inštitut Jožef Stefan, Jamova 39, 1000 Ljubljana

Financiranje



Javna agencija za znanstvenoraziskovalno
in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije

ARIS programska skupina:

P4-0127: Farmacevtska

biotehnologija: Znanost za zdravje

Spoštovani sodelavci!

Programska skupina *Farmacevtska biotehnologija: znanost za zdravje* predstavlja način stabilnega financiranja, ki ga slovenska družba namenja za izvajanje bazičnih in aplikativnih raziskav na področju farmacije, biomedicine in biotehnologije. V okviru programske skupine preučujemo osnovne molekularne mehanizme delovanja celic in pa motnje, ki pri tem nastanejo in vodijo do razvoja raka, nevrodegenerativnih in imunskih bolezni. Zanimajo nas možnosti vpliva na te procese, odkriti poskušamo nove diagnostične in terapevtske tarče in razviti nove pristope in nove učinkovine za zdravljenje bolezni.

Izboljšana preventiva, zgodnejša diagnoza in učinkovitejše zdravljenje so edini način, da zmanjšamo breme zdravstvene oskrbe in omogočimo kvalitetnejše življenje pacientom.

Biotehnologija, biomedicina in farmacija so vodilne razvojne usmeritve naše družbe, zato naši rezultati omogočajo tudi razvoj novih tehnologij in produktov, ki so tržno zanimivi za farmacevtska in biotehnološka podjetja. Vrhunsko znanje, ki ga ustvarjamo, lahko omogoči razvoj izdelkov z visoko dodano vrednostjo in s tem konkurenčnost podjetij v slovenskem in evropskem prostoru. Nenazadnje je delovanje programske skupine pomembno za vse stopnje univerzitetnega izobraževanja, saj omogoča pridobivanje novih znanj in vključevanje študentov v raziskovalno delo pri pripravi raziskovalnih, diplomskih, magistrskih in doktorskih nalog. Pri tem so zelo pomembne dolgoletne pedagoške izkušnje članov programske skupine, pridobljene pri delu na univerzah doma in v tujini.

Začetki dela naše skupine segajo v leto 1999, ko je bila na Institutu Jožef Stefan ustanovljena programska skupina »Molekularna biologija rastlin« pod vodstvom prof. dr. Igorja Kregarja, nato pa prof. dr. Boruta Štruklja. V letu 2004 se je programska skupina preoblikovala, vključili so se raziskovalci s Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, ki je postala tudi prijaviteljica na takratni Agenciji za raziskovalno dejavnost (ARRS). Takrat sem prevzel vodenje programske skupine, spremenili pa smo tudi njeno ime, ki je bolje povzelo področja našega raziskovalnega dela. Na rezultate našega skoraj četrstoletnega delovanja smo lahko ponosni, saj med drugimi vključujejo preko 900 znanstvenih člankov, 30.000 citatov, 65 doktorskih del in 27 patentov in patentnih prijav.

Od leta 2004 prirejamo tudi letna srečanja članov programske skupine, kjer predstavimo rezultate, spoznamo nove člane in kujemo načrte za nadaljnje delo. Letos smo predstavitev pripravili v obliki simpozija, na ta način bodo naši dosežki lažje dostopni širši javnosti. Veseli nas, da se simpozija udeležujejo tudi bivši člani naše programske skupine, ki so v preteklem obdobju pridobili lastno programsko financiranje. Vsem želim prijetno druženje v prepričanju, da bo vaše raziskovalno delo uspešno tudi v naslednjih letih.

Vodja programske skupine

Prof. dr. Janko Kos

Predavanja

- 12.00 – 12.05 **Janko Kos**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Institut Jožef Stefan
Uvodni nagovor
- 12.05 – 12.15 **Helena Motaln**, Institut Jožef Stefan
Agregacija fosforiliranega proteina FUS pri amiotrofični lateralni sklerozi (ALS)
- 12.15 – 12.25 **Jure Pohleven**, Institut Jožef Stefan
Analiza kodirajočih zaporedij in zamenjav aminokislin pri proteinih, povezanih z nevrodegenerativnimi boleznimi ALS in FTD
- 12.25 – 12.35 **Anja Pišlar**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Proučevanje vloge γ -enolaze in njene regulacije v centralnem živčnem sistemu: pregled dela
- 12.35 – 12.45 **Milica Perišić Nanut**, Institut Jožef Stefan
Spremembe izražanja cistatina F pri bolnikih z melanomom med zdravljenjem z zaviralci imunskih kontrolnih točk
- 12.45 – 12.55 **Emanuela Senior**, Institut Jožef Stefan
Zaviranje katepsina V pri glioblastomu: Vpliv na proliferacijo tumorskih celic in citotoksičnost celic NK
- 12.55 – 13.05 **Ana Mitrović**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Institut Jožef Stefan
Zaviranje katepsinov B in X kot pristop izboljšanja protitumorne terapije
- 13.05 – 13.20 Odmor
- 13.20 – 13.30 **Abida Zahirović**, Institut Jožef Stefan
Vrednotenje neviabilnih rekombinantnih mlečnokislinskih bakterij s protivnetnim delovanjem
- 13.30 – 13.40 **Spase Stojanov**, Institut Jožef Stefan
In vitro vrednotenje vaginalnih laktobacilov kot potencialnih probiotičnih kandidatov in njihova vključitev v nanovlakna
- 13.40 – 13.50 **Jerica Sabotič**, Institut Jožef Stefan
Glivni lektini kot orodje za proučevanje razvoja bakterijskih biofilmov
- 13.50 – 14.00 **Mojca Lunder, Tomaž Bratkovič**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Nitasti bakteriofagi kot orodje pri razvoju peptidnih terapij za zdravljenje avtoimunih in alergijskih bolezni ter platforme za epitopna cepiva
- 14.00 – 14.10 **Nika Lovšin**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Proteini APOBEC igrajo pomembno vlogo pri okužbi s človeškim papilomavirusom in onkogenezi
- 14.10 – 14.25 Odmor

Hitre predstavitve

- 14.25 – 14.30 *Predstavitev poteka*
Ana Mitrović, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Institut Jožef Stefan
Helena Motaln, Institut Jožef Stefan
Urša Pečar Fonovič, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Jure Pohleven, Institut Jožef Stefan
- 14.30 – 14.55 **Jernej Cingl**, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Optimizacija N-benzilpiperidinskih zaviralcev C-končne domene Hsp90 za terapijo raka dojke
Klemen Gnidovec, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Optimizacija modularne predstavitve proteinskih antigenov na površini bakteriofaga
Selena Horvat, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Vloga γ -enolaze in njena regulacija s katepsinom X v celicah centralnega živčnega sistema: od razvoja do degeneracije
Marjeta Lipužič, Institut Jožef Stefan
Tumorsko mikrookolje pod drobnogledom: vloga cisteinskih peptidaz pri napredovanju raka
Nika Mazej, Institut Jožef Stefan
Izboljšanje imunoterapije raka trebušne slinavke z modulacijo aktivnosti cisteinskih peptidaz
Anja Tršek, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Vloga cisteinskih katepsinov pri polarizaciji celic mikroglije
Jerneja Nimac, Institut Jožef Stefan
Dinamično spreminjanje interaktoma proteina TDP-43 v odzivu na stres
Klementina Polanec, Institut Jožef Stefan
Majhne RNA preprečujejo agregacijo proteina TDP-43 in vitro
- 14.55 – 15.00 Odmor
- 15.00 – 15.25 **Petra Štravs**, Institut Jožef Stefan
*Litični proteini bakteriofagov kot orodje za izboljšano sproščanje rekombinantnih proteinov pri mlečnokislinski bakteriji *Lactococcus cremoris**
Vukan Milovanović, Institut Jožef Stefan
Microscale thermophoresis for detecting the binding of phenylalanine-tRNA synthetase to the C9ORF72 repeat expansion antisense transcript
Blaž Videčnik, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani
Vpliv proteinov APOBEC3 na kancerogenezo

Nejka Volarič, Institut Jožef Stefan

Izražanje vezalcev toksina TcdB bakterije Clostridioides difficile v varni bakteriji Lactococcus lactis

Nika Zaveršek, Institut Jožef Stefan

Odstranjevanje biofilma bakterije Listeria innocua z magnetnimi antibakterijskimi nanodelci

Ana Zupančič, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani

Uporaba kratkih peptidov za nevtralizacijo avtoprotiteles pri avtoimunskih boleznih

15.25 – 15.30

Janko Kos, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Institut Jožef Stefan

Sklepne misli in podelitev nagrad

Agregacija fosforiliranega proteina FUS pri amiotrofični lateralni sklerozi (ALS)

Helena Motaln¹, Anand Goswami², Boris Rogelj^{1,3}

¹ Odsek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

² Department of Neurology, Center for Motor Neuron Biology and Disease, Columbia University, New York, NY, USA.

³ Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerze v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Protein FUS (angl. FUsed in Sarcoma) je DNA/RNA vezavni protein, ki se normalno nahaja v jedru celic, saj na C-terminalnem delu nosi zapis za jedrni lokalizacijski signal (NLS). Slednji je ključnega pomena za njegov prenos iz citoplazme v jedro, saj omogoča vezavo proteina FUS z jedrnim importerjem transportinom 1 (TNPO1). Znano je da prekomerno izražanje proteina FUS in njegovih mutiranih oblik na C-terminalnem koncu povzroča kopičenje proteina FUS v citoplazmi celic, njegovo (samo)agregacijo v strupene citoplazemske skupke in smrt celic pri različnih nevrodegenerativnih obolenjih, kot sta frontotemporalna lobularna demenca (FTLD) in amiotrofična lateralna skleroza (ALS). Naši skupini je v preteklosti uspelo potrditi, da fosforilacija zadnjega C-terminalnega tirozina pri FUS inhibira povezavo med FUS in TNPO1, kar poveča akumulacijo proteina FUS v citoplazmi. Uspeli smo potrditi povezavo med predstavnikom kinaz Src družine, kinazo Abl, in povečanjem fosforilacije C-terminalnega Tyr526 FUS (FUS^{p-Y526}) v nevronih FTLD pacientov. Pri FTLD sicer citoplazemski vključki vsebujejo zraven drugih RNA vezavnih proteinov izključno nemutiran protein FUS. Ravno nasprotno pa pri ALS obolenju netopne citoplazemske vključke sestavljajo mutirane oblike proteina FUS. Slednje so sposobne v agregat privzeti oz. agregirati tudi z nemutirano obliko proteina FUS. Koliko in do kakšne mere na samo tvorbo agregatov in dinamiko procesa nastanka netopnih citoplazemskih vključkov pri ALS vpliva in jo morebiti pospešuje tudi fosforilacija C-terminalnega tirozinskega ostanka FUS pa ni znano. V naši študiji smo zato najprej ovrednotili vzorec jedrno citoplazemskega prerazporejanja fosforiliranega FUS v post-mortem rezinah frontalnega korteksa možganov pri ALS pacientih v primerjavo s kontrolami. V nadaljevanju smo ovrednotili stopnjo privzema fosforilirane oblike proteina FUS v agregatih motoričnih nevronov hrbtenjače obolelih z ALS. Vzorec in diferencialno obnašanje mutiranega FUS glede na privzem fosforilirane oblike proteina FUS smo nato ovrednotili tudi v nesmrtnih limfoblastoidnih linijah pripravljenih iz limfoblastov pacientov z ALS mutacijami proteina FUS. Dokončno razlago za razlike v privzemu in agregaciji mutiranih oblik FUS-a in diferencialno vlogo kinaz družine Src pri tem, pa smo dobili z in vitro analizo celičnih modelov s prekomernim izražanjem v kombinaciji z imunocitokemijskim obarvanjem in konfokalno mikroskopijo. Verjamemo, da bodo naši izsledki pomembno pripomogli k boljšemu razumevanju različne dinamike napredovanja ALS obolenja pri ALS pacientih s »počasno« in »hitro« mutirano različico proteina FUS.

Analiza kodirajočih zaporedij in zamenjav aminokislin pri proteinih povezanih z nevrodegenerativnimi boleznimi ALS in FTD

Jure Pohleven¹, Jerneja Nimac¹, Boris Rogelj^{1,2}

¹ Odsek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

² Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) in fronto-temporalna demenca (FTD) sta kompleksni nevrodegenerativni bolezni, za kateri je značilna progresivna degeneracija nevronov in postopno upadanje nevroloških funkcij, kar je praviloma povezano z agregacijo proteinov, kot sta TDP-43 in FUS. K napačnem zvijtu in agregaciji teh proteinov lahko prispevajo spremembe oziroma zamenjave aminokislin v njihovem zaporedju, ki so posledica različnih procesov, kot na primer deamidacija, urejanje RNA, ali motnje v translaciji, ki lahko vodijo do napačne translacije oziroma mistranslacije. Pri slednjih se v nastajajočo polipeptidno verigo v ribosomu vgrajujejo napačne aminokisline, kar je lahko tudi posledica ohlapnosti (ang. wobble) kodonov, pri čemer antikodon tRNA prepozna različne kodone mRNA z ohlapnim tretjim mestom. Ohlapnost omogoča fleksibilnost in regulacijo translacije, in sicer translacijo upočasni, kar lahko olajša pravilno kotranslacijsko zvijanje proteinov, po drugi strani pa hkrati privede do mistranslacij.

Zato smo v bioinformacijski študiji analizirali kodirajoča zaporedja proteinov celotnega človeškega genoma in proteinov, vpletenih v nevrodegenerativne bolezni, za vsebnost ohlapnih kodonov in aminokislin (npr. fenilalanina) ter motiva FG (fenilalanin-glicin) v intrinzično neurejenih regijah in generirali njihove profile. Na ta način smo identificirali proteine z najvišjimi vsebnostmi ohlapnih kodonov in motiva FG ter ugotavljali njihove biološke implikacije. Poleg tega smo v proteomski študiji analizirali podatke masne spektrometrije iz vzorcev bolnikov s proteinopatijami TDP-43, da bi proučili zamenjave aminokislin, ki se pojavijo na ravni translacije. Podatke masne spektrometrije smo pridobili iz ustreznih repozitorijev (PRIDE in MASSIVE znotraj The ProteomeXchange Consortium) in jih analizirali s programom PEAKS Studio 12 (z uporabo algoritmov PEAKS PTM in SPIDER) ter na ta način identificirali številne proteine z mistranslacijami, kot na primer HNRNPA1, AHNK2, Sec24B, α -Actinin-2, 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2, KCC2B kinase, α -Crystallin B, Tropomyosin α -4, Synapsin-1, POTEF, RAB11-binding protein RELCH, KAD4 kinase. Za identificirane proteine smo nadalje ugotavljali biološke implikacije z obogatitveno analizo GO in poti KEGG (spletno orodje DAVID), ki je pokazala, da so identificirani proteini vpleteni v nevrodegenerativne bolezni, kot je ALS.

Nazadnje smo za ugotavljanje mistranslacij *in vitro* proučili vgrajevanje metionina, ki deluje kot lovilec reaktivnih kisikovih spojin, v človeških celicah pri stresu. Z metodo click-kemije smo pokazali, da je stres signifikantno induciral globalno vgrajevanje analoga metionina v HEK293T celicah, ki stabilno izražajo TDP-43, ko so bile le-te izpostavljene stresu s kalcijevimi ioni (CaCl_2).

Proučevaje vloge γ -enolaze in njene regulacije v centralnem živčnem sistemu: pregled dela

Anja Pišlar¹, Selena Horvat¹, Anja Tršek¹, Janko Kos¹

¹ Fakulteta za Farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Funkcija živčnega sistema je odvisna od visokospecifičnih stikov, ki se tvorijo med nevroni med njihovim razvojem, za njihovo pravilno razporeditev v centralnem živčevju pa je odgovorna nevroglija. Pri tem so ključnega pomena proteini z nevrotrofično aktivnostjo, t.i. nevrotrofični dejavniki, ki omogočajo preživetje, diferenciacijo, regeneracijo in vzdrževanje nevronov v centralnem živčnem sistemu. Zaradi svojega delovanja so pomembni pri neurodegenerativnih boleznih, saj zaščitijo poškodovane nevrone pred propadom in spodbujajo njihovo regeneracijo. Nevrotrofičnim dejavnikom podobno delovanje izkazuje tudi glikolitični encim γ -enolaza. V človeških možganih so prisotne tri oblike enolaze, in sicer $\alpha\alpha$, $\alpha\gamma$ in $\gamma\gamma$. Izobliki $\alpha\gamma$ in $\gamma\gamma$ sta poznani tudi kot nevron-specifična enolaza, ki je poznan označevalec nevronov in perifernih neuroendokrinih celic. Poleg vloge označevalca nevronske celice, γ -enolazi pripisujejo nevrotrofično delovanje, saj C-končni del γ -enolaze izkazuje nevrotrofično aktivnost, in sicer spodbuja preživetje in diferenciacijo nevronske celice preko sproženja signalnih poti, ki jih aktivirajo tudi nevrotrofični dejavniki. Nevrotrofična aktivnost γ -enolaze je odvisna od proteolitičnega delovanja cisteinske karboksipeptidaze katepsina X, ki s cepitvijo dveh aminokislin na C-končnem delu γ -enolaze, ohromi njen prenos do plazemske membrane in interakcijo z tirozin-kinaznim receptorjem ter s tem izniči njeno nevrotrofično aktivnost. V nadaljevanju raziskovalnega dela smo proučevali vlogo γ -enolaze v diferenciaciji celic v posamezen nevronske podtip kot tudi v vlogo γ -enolaze v celicah glije, ki so podvržene degenerativnim spremembam. Nadalje smo proučevali uravnavanje ravni izražanja in nevrotrofične aktivnosti γ -enolaze v celicah glije s katepsinom X, za katerega smo pokazali, da ima pomembno vlogo v polarizaciji mikroglije v vnetni fenotip.

Spremembe izražanja cistatina F pri bolnikih z melanomom med zdravljenjem z zaviralci imunskih kontrolnih točk

Milica Perišić Nanut¹, Emanuela Senior¹, Mateja Prunk¹, Janko Kos¹, Tanja Mesti³, Janja Ocvirk³

¹ Odsek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

² Fakulteta za farmacijo, Univerze v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

³ Onkološki inštitut, Ljubljana, Slovenija

Imunoterapija raka je v zadnjem desetletju nedvomno revolucionirala terapijo raka. Najuspešnejša imunoterapija raka je osredotočena na izboljšanje T celičnega imunskega odziva na tumorske celice, bodisi preko osvoboditve T celih zaviralnih signalov z uporabo zaviralcev imunskih kontrolnih točk (ZIKT) ali pa z uporabo T celične terapije. Vendar pa ta dva pristopa ne moreta premagati pomembne ovire, saj T celice lahko postanejo izčrpane in tako izgubijo svojo citotoksično sposobnost. Tako se kljub temu, da ima imunoterapija večjo učinkovitost kot konvencionalno zdravljenje raka, uspešnost imunoterapije zelo razlikuje med posameznimi vrstami raka. Tudi pri vrstah raka, ki se odzivajo na imunoterapijo, kot je melanom, so razlike med posameznimi pacienti, saj se kljub enaki diagnozi, pacienti različno odzovejo na terapijo. Zaradi tega je pomembno razumevanje mehanizmov, ki uravnavajo T-celično izčrpanost.

Imunoterapija raka z ZIKT je odvisna od sposobnosti citotoksičnih limfocitov T (CLT) za ubijanje rakavih celic. CLT ubijejo rakave celice preko sproščanja perforina, ki tvori pore v membrani tarčne celice, ter grancimov, ki sprožijo apoptozo tarčne celice, v imunsko sinapso med CLT in rakavo celico. Perforin in grancimi so sintetizirani v neaktivni obliki in potrebujejo proteolitsko cepitev s cisteinskimi katepsini C, H in L za njihovo aktivacijo. Cistatin F je proteinski zaviralec cisteinskih katepsinov. V endo/lizosome se translocira preko manoza-6-fosfatnega (M6P) odvisne poti, saj je N-glikozilirani. V endo/lizosomih ga katepsin V proteolitično cepi in aktivira. Pokazali smo, da povečano izražanje znotrajceličnega cistatina F sovpada s pojavom zmanjšane funkcionalnosti in izčrpanosti CLT. Poleg tega, dodatek protiteles proti PD-1 na CTL, izoliranih iz periferne krvi zdravih prostovoljcev, povzroči povečano izražanje cistatina F. Izražanje gena za cistatin F in efektorskih molekul perforin/grancimske poti smo določili z metodo PCR v realnem času. Aktivacijski status cistatina F in aktivnost grancimov smo določili z metodo SDS-PAGE in prenosom western. Tako smo postavili hipotezo, da se izražanje cistatina F poveča ob terapiji z ZIKT in pripomore k zmanjšani sposobnosti citotoksičnosti CLT. Z analizo CLT, izoliranih iz periferne krvi pacientov z melanomom, ki kot prvo linijo terapije prejemajo sistemske imunoterapije z ZIKT (nivolumab, ipilimumab/nivolumab, pembrolizumab) v treh časovnih točkah (4 tedni pred, 12 (+2) in 28 (+2) tednov po začetku terapije), z uporabo pretočne citometrije smo pridobili vpogled v izražanje različnih površinskih markerjev, izražanje cistatina F in efektorskih molekul perforin/grancimske poti. Odziv na terapijo je ovrednoten preko standardnih institucionalnih postopkov. Na vzorcih rakavega tkiva bolnikov smo ovrednotili celične vire cistatina F z uporabo fluorescenčne imunohistokemije.

Zaviranje katepsina V pri glioblastomu: Vpliv na proliferacijo tumorskih celic in citotoksičnost celic NK

Emanuela Senior^{1,2}, Ana Mitrović^{1,2}, Marko Jukić², Matic Proj², Anamarija Habič³, Stanislav Gobec², Barbara Breznik³, Janko Kos^{1,2}, Milica Perišić Nanut¹

¹ Odsek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija

³ Odsek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana, Slovenija

Glioblastom je ena najbolj agresivnih oblik možganskih tumorjev, za katerega je značilna prisotnost invazivnih in na terapijo rezistentnih tumorskih matičnih celic ter imunosupresivno mikrokolje. Ker trenutna terapija ni učinkovita, se pospešeno raziskujejo novi pristopi, med katerimi je tudi imunoterapija.

Naravne celice ubijalke (celice NK) sprožijo apoptozo tumorskih celic preko perforin-grancimske poti. Aktivnost te poti uravnavajo katepsini (C, H, L), katerih delovanje zavira cistatin F. Aktivacija cistatina F v monomerno obliko poteka prek katepsina V, ki je pogosto prekomerno izražen pri raku. Katepsin V je pri raku povezan s celično proliferacijo, znižanim izražanjem adhezijskih molekul ter infiltracijo makrofagov.

S pomočjo reševanja virtualnih kemijskih knjižnic smo razvili selektiven in reverzibilen zaviralec katepsina V (spojina 7). Pokazali smo, da spojina 7 učinkovito zavira proliferacijo posamičnih tumorskih matičnih celic glioblastoma (NCH-421k), kot tudi sferoidov, pripravljenih iz NCH-421k celic v statičnih pogojih, ter v primeru, ko smo sferoide gojili v čipih, ki so bili povezani na mikrofluidni sistem. Celice NK, ki so bile izpostavljene spojini 7 (20 μ M, 18h) so imele manj aktivnega monomernega cistatina F v primerjavi s kontrolnimi celicami NK. Posledično so imele izboljšano citotoksično delovanje proti posamičnim NCH-421k celicam ter tumorskim sferoidom v primerjavi s kontrolnimi celicami NK.

Ciljanje katepsina V predstavlja obetavno terapevtsko strategijo za ciljanje tako proliferacije tumorskih celic, kot tudi izboljšanje citotoksičnega potenciala celic NK.

Zaviranje katepsinov B in X kot pristop izboljšanja protitumorne terapije

Ana Mitrović^{1,2}, Damijan Knez², Izidor Sosič², Stanislav Gobec², Janko Kos^{1,2}

¹Odsek za biotehnologijo, Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

²Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Pri učinkovitem zdravljenju raka predstavljata največjo težavo ponovni pojav raka in odpornost tumorskih celic na terapijo. To je predvsem posledica prisotnosti majhne populacije tumorskih matičnih celic (TMC). Razvoj terapevtskih pristopov, ki bi bili učinkoviti tudi proti TMC, tako predstavlja obetaven pristop za izboljšanje učinkovitosti obstoječe protitumorne terapije. Pomembno vlogo pri različnih procesih nastanka in napredovanja raka lahko med drugim pripišemo lizosomskima cisteinskima katepsinoma B in X, ki sta zaradi svoje karboksipeptidazne aktivnosti edinstvena v skupini cisteinskih katepsinov. V tej raziskavi smo pokazali, da sta v TMC, izoliranih iz celičnih linij raka dojke na podlagi tvorbe tumorskih sfer, izražanje in aktivnost katepsinov B in X povečana v primerjavi z diferenciranimi tumorskimi celicami. Nadalje, dobljeni rezultati kažejo, da lahko z zaviranjem aktivnosti katepsinov B in X vplivamo na fenotip TMC in povečamo diferenciacijo TMC. V procesu identifikacije tarč katepsinov B in X v TMC smo ugotovili, da z zaviranjem katepsinov B in X lahko vplivamo tudi na signalne poti in celične procese, ki so spremenjene v TMC in imajo pomembno vlogo pri napredovanju raka. Dobljeni rezultati opredeljujejo katepsina B in X kot primerni tarči za protitumorno terapijo, usmerjeno proti TMC, pri čemer bi lahko z uporabo zaviralcev katepsinov B in X izboljšali učinkovitost obstoječe protitumorne terapije in izboljšali zdravljenje raka.

Vrednotenje neviabilnih rekombinantnih mlečnokislinskih bakterij s protivnetnim delovanjem

Abida Zahirović¹, Špela Zupančič², Andraž Verdir³, Luka Snoj³, Sebastjan Nemec⁴, Slavko Kralj⁴, Aleš Berlec^{1,2}

¹ Odsek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

² Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

³ Odsek za reaktorsko fiziko, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

⁴ Odsek za sintezo materialov, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

Zaradi ugodnih učinkov pri moduliranju imunskega odziva probiotiki predstavljajo potencialno alternativo za zdravljenje vnetnih črevesnih bolezni. Kljub vse večjemu številu dokazov, ki podpirajo uporabo živih probiotikov za podporno zdravljenje različnih obolenj, obstaja tveganje za pojav resnih neželenih učinkov, kot so življenjsko nevarne okužbe, zlasti pri kritično bolnih, imunsko oslabljenih in pediatričnih bolnikih. To je spodbudilo razvoj postbiotikov, ki vsebujejo neviabilne probiotične bakterije ali njihove fragmente in kažejo primerljive koristne učinke kot živi sevi brez tveganj, povezanih z uporabo živih mikroorganizmov. V tej študiji smo pripravili postbiotike (neviabilne bakterije) iz rekombinantnih sevov *L. lactis*, ki na površini predstavljajo vezalce vnetnih citokinov (afibodi specifičen za človeški IL6 oz. TNF, finomer specifičen za IL17 in evazin specifičen za IL8) in ovrednotili njihovo funkcionalnost v primerjavi z viabilnimi sevi.

Bakterije smo tretirali z različnimi metodami (toplota pri 70 °C oz. 100 °C, etanol, soniciranje, obsevanje z UV in gama žarki). Analiza preživetja bakterij je pokazala, da je tretiranje s toploto, etanolom in gama žarki bilo popolnoma učinkovito, medtem ko je pri sonikaciji prišlo do povečanja števila celic. Z elektronsko mikroskopijo smo vizualizirali majhne spremembe površinske strukture in nespremenjeno obliko bakterij. Barvanje s fluorescenčnimi barvili SYTO/PI in analiza metabolne aktivnosti so pokazali da je integriteta celične membrane bila ohranjena pri celicah izpostavljenih soniciranju, obsevanju z UV in gama žarki, medtem ko so bakterije obdelane s toploto in etanolom imele delno poškodovano celično membrano. Obseg površinske predstavitve proteinov (afibodi proti IL6) na neviabilnih bakterijah v primerjavi z živimi bakterijami smo analizirali s pretočno citometrijo in konfokalno fluorescenčno mikroskopijo. Pri celicah, tretiranih z etanolom, smo izmerili 140% povečanje intenzitete fluorescence, medtem ko se je obseg površinske predstavitve po termični obdelavi celic pri 100 stopinjah zmanjšal za 40%. Z etanolom tretirane bakterije so imele najmanjšo disociacijsko vezavno konstanto (Kd), kar nakazuje na povečano izpostavitvev in funkcionalnost afibodija na površini celic. Biološko aktivnost postbiotikov (protivnetno delovanje) smo proučevali na celičnem modelu HEKblue IL6, ki konstitutivno izraža receptor za človeški IL-6, signalni pretvornik in aktivator transkripcije (STAT-3) in reporterski protein embrionalno alkalno fosfatazo (SEAP). Model omogoča spremljanje aktivacije JAK/STAT-3 signalne poti. Bakterije so inhibirale signaliziranje STAT3, pri čemer je učinek bil odvisen od koncentracije. Pri koncentraciji 1×10^9 CFU/mL so neviabilne bakterije (z etanolom tretirane in termično obdelane celice) izkazovale primerljivo sposobnost inhibicije STAT3 kot žive bakterije.

Ta študija je prva na področju, ki vključuje podrobno vrednotenje funkcionalnosti neviabilnih bakterij, pripravljenih iz rekombinantnih sevov in primerjanje njihove aktivnosti z živimi sevi. Predstavlja pomemben prvi korak k poznavanju njihovih lastnosti in možnosti uporabe v terapiji.

In vitro vrednotenje vaginalnih laktobacilov kot potencialnih probiotičnih kandidatov in njihova vključitev v nanovlakna

Spase Stojanov¹, Samo Jeverica², Špela Zupančič³, Aleš Berlec^{1,3}

¹ Odsek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

² Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Maribor, Slovenija

³ Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Vaginalni laktobacili so ključni za zdravo vaginalno mikrobioto in imajo bistveno vlogo pri ohranjanju njenega ravnovesja in splošnega zdravja vagine. Zavirajo prekomerno rast vaginalnih patogenov kot so *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* in *Trichomonas vaginalis*. Proizvajajo protimikrobne metabolite, kot so mlečna kislina, vodikov peroksid in bakteriocini. Sestava in številčnost teh bakterij se lahko med posameznicami razlikujejo glede na dejavnike, kot so zdravstveno stanje, starost, stil življenja in uporaba zdravil. V vaginalni mikrobioti najpogosteje najdemo vrste seve *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* in *Lactobacillus jensenii*, ki se razlikujejo po svojih značilnostih.

V našo raziskavo smo vključili 165 sevov iz rodu *Lactobacillus*, od tega 55 sevov *L. crispatus*, 61 sevov *L. jensenii*, 37 sevov *L. gasseri*, 8 sevov *Limosilactobacillus vaginalis* in 2 seva *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Probiotični potencial 108 sevov smo ovrednotili z oceno njihovih značilnosti rasti, preživetja v hipotoničnem okolju, merjenjem pH gojišča po rasti, sposobnostjo avtoagregacije, hidrofobnostjo in proizvodnjo vodikovega peroksida ter mlečne kisline. Značilnosti rasti in preživetje v hipotoničnem okolju so pomembne za preživetje pod pogoji elektrostatskega sukanja, avtoagregacija in hidrofobnost pa sta pokazatelja adhezijskih lastnosti. Proizvodnja mlečne kisline in vodikovega peroksida kaže na potencialne protimikrobne lastnosti bakterij.

Na podlagi določenih lastnosti smo seve razvrstili v tri kategorije. Seve z največjim potencialom smo vgradili v nanovlakna iz polietilen oksida z metodo elektrostatskega sukanja. Po sprostitvi iz nanovlaken smo ocenili preživetje bakterij in njihovo proizvodnjo mlečne kisline ter vodikovega peroksida. Vsi sevi, ki so bili vgrajeni v nanovlakna, so preživel in so proizvajali mlečno kislino in vodikov peroksid, kar nakazuje, da so nanovlakna obetaven dostavni sistem za vaginalne laktobacile.

Glivni lektini kot orodje za proučevanje razvoja bakterijskih biofilmov

Nika Janež¹, Tjaša Peternel¹, Meta Sterniša², Blaž Jug², Anja Klančnik², Jerica Sabotič¹

¹ Odsek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

² Katedra za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Mikroorganizmi tvorijo kompleksne združbe, imenovane biofilmi, ki jim omogočajo preživetje v neugodnih okoljskih pogojih, vključno z izpostavljenostjo razkužilom ali antibiotikom. Biofilmi so torej ena od ključnih strategij mikroorganizmov za trdovratno prisotnost na različnih površinah in predstavljajo izziv pri zdravljenju okužb in vzdrževanju čistoče v industrijskih procesih. Za nastanek biofilma je ključen prvi korak pritrdjevanja bakterij na površino, ki večinoma poteka preko nespecifičnih interakcij s strukturami, prisotnimi na bakterijski površini. Ker je bakterijska površina prekrita z oligosaharidi in/ali polisaharidi, ti glikani igrajo pomembno, če ne ključno vlogo pri interakcijah bakterij z različnimi površinami. Za nadaljnje interakcije so pomembne tudi zunajcelične polimerne snovi, kot so polisaharidi, proteini in zunajcelična DNA, ki tvorijo matriks biofilma. Lektini (imenovani tudi hemaglutinini ali adhezini) so proteini, ki vežejo glikane z visoko specifičnostjo, ne da bi jih spremenili. Lektini vežejo glikane preko številnih šibkih interakcij, kar jim omogoča selektivno vezavo tudi kompleksnih glikanov. Z uporabo modelnih sevov iz bakterijskih vrst *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* in *Campylobacter jejuni* smo ugotavljali, kako z lektini iz gliv lahko vplivamo na razvoj njihovih biofilmov. Nekateri testirani lektini, ki so se med seboj razlikovali po izvoru, strukturi in znani specifičnosti vezave glikanov, so preprečili adhezijo bakterij, pri čemer je bilo delovanje pogosto tarčno proti eni od testiranih bakterijskih vrst. Pridobljeni rezultati nakazujejo pomen glikanskih struktur bakterijske površine na njene interakcije z okolico in možnost modulacije ter interakcij z glivnimi lektini. Poznavanje teh odnosov nam daje možnosti za usmerjanje razvoja biofilma in kolonizacije površin z mikroorganizmi. Področje mikrobne glikobiologije ponuja pomemben uvid k proučevanju in preprečevanju kontaminacije površin z bakterijami in lahko vodi do novih pristopov za preprečevanje ali razgradnjo biofilmov.

Nitasti bakteriofagi kot orodje pri razvoju peptidnih terapij za zdravljenje avtoimunih in alergijskih bolezni ter platforme za epitopna cepiva

Mojca Lunder¹, Tomaž Bratkovič¹

¹ Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Avtoimunske in alergijske bolezni so različne vrste motenj imunskega sistema. Pri avtoimunske imunski sistem napačno napade telesne lastne celice in tkiva, ker jih prepozna kot tuje. Pri alergijskih boleznih pa pretirano reagira na običajno neškodljive snovi iz okolja (alergene), ki so prisotne npr. v cvetnem prahu, hrani ali pršicah. Pri avtoimunih boleznih se pogosto pojavijo patogeni avtoprotitelesi IgG usmerjena proti telesu lastnim beljakovinam in so neposredno povezana z resnostjo bolezni. Pri alergijskih pa pride do senzibilizacije in preklopa razreda protiteles na IgE, ki po vezavi na efektorske celice ter ob stiku z alergenom sprožijo alergijsko reakcijo. V našem raziskovalnem delu smo se usmerili v avtoimune bolezni z znanimi patogenimi avto-protitelesi, kot sta sistemska skleroza (prisotna Scl-70 protitelesa) in trombotična trombocitopenična purpura (prisotna anti-ADAMTS13 protitelesa), ter alergije, pri katerih kontakt z alergenom sproža silovite alergijske odzive (alergija na proteine iz arašida, strupov kožekrilcev...). S pomočjo bioloških (bakteriofagnih) in kemijskih (peptidnih mikromrež) peptidnih knjižnic identificiramo ligande paratopov avtoprotiteles ali IgE protiteles, ki so mimetiki konformacijskih in linearnih epitopov izbranih antigenov. Vzpostavili smo nov protokol identifikacije epitopov, v katerega smo implementirali tehnologije, kot so NGS in bioinformatična orodja za analizo interakcij peptid-protein in podatkov, pridobljenih iz selekcij bakteriofagnih predstavitev knjižnic. Izbrani konformacijski in linearni peptidni mimetiki zbrani na peptidnih mikromrežah omogočajo serumsko profiliranje bolnikov ter pripravo individualiziranega nabora peptidov, ki preprečijo interakcijo med antigenom in protitelesi ter s tem blokirajo neustrezno reakcijo imunskega sistema in povezane simptome. Učinkovitost peptidnih terapevtikov pri alergijah testiramo *ex vivo*, z določanjem zaviranja aktivacije pacientovih efektorskih celic (bazofilcev ali mastocitov). Učinkovitost peptidnih terapevtikov pri avtoimunih boleznih testiramo *in vitro*, z določanjem inhibicije vezave serumskih avtoprotiteles na avto-antigen v prisotnosti sinteznih peptidov z imunokemijskimi metodami.

Bakteriofagi so pomembno biotehnoško orodje, ki nam omogoča še veliko več kot identifikacijo ligandov iz peptidnih knjižnic. Nitasti kolifagi so strukturno preprosti bakterijski virusi, ki ne predstavljajo grožnje za sesalce. Njihova inherentna imunogenost in adjuvantne lastnosti omogočajo uporabo fagnih delcev kot platforme za epitopna cepiva, pri čemer na kapsidi (tj. v fuziji s strukturnimi proteini) izrazimo antigenske peptide. Takšen sistem ima določene omejitve, saj ne omogoča posnemanja konformacijskih epitopov, veliki in kompleksni proteinski antigeni pa niso združljivi s predstavitvijo na bakteriofagu. To je bodisi posledica njihovega slabega prenosa v bakterijsko periplazmo, kjer poteka sestavljanje virusnih delcev, steričnih ovir pri sestavljanju kapside ali nezmožnosti njihovega izražanja v prokariotskih ekspresijskih sistemih. Razvili smo hibridni fagni vektor, ki omogoča sočasno predstavitev dveh različnih peptidov na proteinskem plašču (t. i. sistem predstavitve »388«). V fuziji s poglavitnim kapsidnim proteinom p8 smo izrazili SpyTag, kratek peptid, ki spontano tvori kovalentno izopeptidno vez s proteinom SpyCatcher. Če fuzijski protein SpyCatcher izrazimo v ločenem ekspresijskem sistemu, lahko učinkovito »okrasimo« fag z več deset (ocenjeno na 50–100) funkcionalnimi kopijami izbranega antigena. Sočasno smo v fuziji s proteinom p3 na konici faga izrazili do pet kopij peptida SnoopTag, ki omogoča ortogonalno označevanje

virusnih delcev z uporabo fuzijskega proteina SnoopCatcher:nanotelo. Nanotelo je specifično usmerjeno proti receptorjem dendritičnih celic, kot sta endocitna receptorja Dec-205 ali Clec-9a, kar spodbuja privzem in procesiranje fagnih delcev. Opisan sistem predstavlja univerzalno modularno platformo za cepiva in ni omejen na proteinske antigene.

Proteini APOBEC igrajo pomembno vlogo pri okužbi s človeškim papilomavirusom in onkogenezi

Nika Lovšin¹, Blaž Videčnik¹, Urša Pečar Fonovič¹, Bhavani Gangupam², Fabio Lapenta², Janko Kos¹, Martina Bergant Marušič²

¹ Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

² Univerza v Novi Gorici, Laboratorij za vede o okolju in življenju, Nova Gorica, Slovenija

Človeški papiloma virusi (HPV) povzročajo skoraj 5% vseh človeških malignomov, vključno z rakom materničnega vratu in rakom glave ter vratu. Urejanje DNK skupine citozinskih deaminaz, APOBEC3 (A3), je del prirojenega imunskega odziva na okužbe z virusi. Kadar je delovanje encimov napačno regulirano, proteini APOBEC povzročijo nastanek mutacij pri gostitelju in razvoj raka med dolgotrajnimi okužbami z virusi. Dva člana družine APOBEC, A3A in A3B, sta še posebej povezana z visokim mutacijskim bremenom pri rakah, povezanih s HPV. Naše raziskave se osredotočajo na vlogo A3 proteinov pri okužbi s HPV in celični transformaciji. Analizirali smo izražajni profil bolnikov z rakom glave in vratu iz baze podatkov Cancer Genome Atlas (TCGA) in identificirali gene, ki so korelirali bodisi z A3A ali A3B. Geni, katerih izražanje je koreliralo z A3A, so bili na splošno zmanjšani pri bolnikih, pozitivnih na HPV. Analiza GO teh genov je pokazala obogatitev genov, povezanih z epidermalno diferenciacijo in prirojeno imunostjo. Geni, ki so korelirali z A3B, so bili povezani s celičnim ciklom, organizacijo kromosomov, replikacijo DNK in popravi DNK ter so bili povečano izraženi pri bolnikih, pozitivnih na HPV. A3A je bolj vključen v protivirusni odziv in je zato večinoma prisoten pri rakah, negativnih na HPV, medtem ko A3B vpliva na izražanje genov, vpletenih v celično transformacijo, in je bolj prisoten pri bolnikih z rakom, povezanim s HPV. Celice gostitelja HPV, HFK (humani predkožni keratinociti), ki jim manjkata proteina A3A ali A3B, so pokazale spremenjeno izražanje izbranih genov, ki so korelirali z izražanjem proteinov A3A ali A3B in onkoproteini HPV. Te celične linije so prav tako pokazale spremenjene vzorce celične proliferacije, migracije in invazije, kar potrjuje vlogo aktivnosti A3 proteinov pri celični transformaciji, še posebej v kontekstu HPV.

Optimizacija *N*-benzilpiperidinskih zaviralcev C-končne domene Hsp90 za terapijo raka dojke

Jernej Cingl¹, Živa Zajec¹, Jaka Dernovšek¹, Dunja Urbančič¹, Urša Pečar Fonovič¹, Tihomir Tomašič¹

¹ *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija*

Trojno negativni rak dojke (TNBC) je eden izmed najpogostejših rakov v zahodnem svetu in predstavlja 15% vseh rakov dojke. Kljub mnogim raziskavam za tarčno terapijo ostajajo klasični citostatiki terapija izbora za TNBC. Ker je Hsp90 prekomerno izražen v rakavih celicah in sodeluje pri stabilizaciji in pravilnem zvijanju mnogih proteinov, tudi onkoproteinov, je zaviranje delovanja Hsp90 obetaven in selektiven terapevtski pristop za zdravljenje mnogih vrst raka. ATP vezavno mesto na N-končni domeni (NTD) proteina je bilo v preteklost že dodobra raziskano, več kot 20 NTD zaviralcev pa je bilo testiranih v kliničnih študijah. Zaradi toksičnih stranskih učinkov in indukcije odziva toplotnega šoka, ki vodi v povečano izražanje Hsp90 in povečanje odmerka zaviralcev NTD, je iskanje novih pristopov ciljanja Hsp90 smiselna strategija zdravljenja raka.

V preteklosti je naša raziskovalna skupina s pomočjo strukturno podprtega molekulskega modeliranja identificirala spojino TVS-21, ki je na celični liniji raka dojke MCF-7 izkazovala razmeroma dobro aktivnost ($IC_{50} = 44,8 \pm 3,6 \mu M$). Optimizacija zadetka je privedla do spojine 89 ki je izkazovala nizko mikromolarno aktivnost na celični liniji MCF-7 in MDA-MB-231. Za potrditev specifične vezave na Hsp90 in izključitev vezave na N-končno domeno smo izvedli različne preiskave, kot so termoforeza na mikroskali (MST), FTSA, STD NMR in trNOESY NMR, ki so nam omogočile boljše razumevanje mehanizma vezave, čeprav nismo imeli ko-kristalne strukture Hsp90-CTD in zaviralca. Spojina 89 je bila testirana tudi na BALB/c nude miših s ksenograftom MDA-MB-468, kjer je pokazal zmanjšanje rasti tumorjev. Trenutno delo obsega nadaljnjo modifikacijo in raziskovanje kemijskega prostora z načrtovanjem analogov spojine 89.

Optimizacija modularne predstavitve proteinskih antigenov na površini bakteriofaga

Klemen Gnidovec¹, Tomaž Bratkovič¹

¹ Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Cepiva na osnovi bakteriofagov zaradi njihovih naravnih adjuvantnih lastnosti in možnosti visoko-valentne predstavitve kratkih peptidnih antigenov na površini kapside predstavljajo obetavno alternativo bolj uveljavljenim platformam cepiv. V skupini razvijamo modularno cepivo na osnovi bakteriofagov, ki omogoča predstavitev heterolognih proteinskih antigenov na površini faga prek sistema razcepljenega proteina SpyCatcher/SpyTag. Peptid SpyTag je izražen na površini faga v obliki fuzije s kapsidnim proteinom p8, medtem ko protein SpyCatcher izrazimo v fuziji z želenim proteinskim antigenom. S spreminjanjem različic peptida SpyTag, ki se med seboj razlikujejo v naboju in dolžini, ter različic signalnega peptida (signalni peptid divjega tipa p8 ali signalni peptid DsbA), ki rekombinantni protein p8 usmerja v periplazmo, smo optimizirali nivo predstavitve peptida na površini fagnih delcev. Učinkovitost predstavitve smo primerjalno ocenili z imunodetekcijo peptida cMyc, ki je v sistemu uporabljen kot distančnik, ter potrdili, da različica SpyTag001 v kombinaciji s signalnim peptidom DsbA omogoča najvišjo valenco predstavitve. Modelni antigen sfGFP smo izrazili v obliki fuzije s proteinom SpyCatcher in z njim "okrasili" fagne delce. S prenosom western smo dokazali, da uporaba različice SpyTag001, ki jo v periplazmo usmerja signalno zaporedje DsbA, vodi tudi v največje število kopij rekombinantnega proteinskega antigena, kovalentno pritrjenega na površino virusa (50-100 kopij/fag). Dodatno smo ugotovitve potrdili s merjenjem relativne intenzitete fluorescence. Ker je peptid cMyc podvržen proteolitični razgradnji, smo stabilnost predstavitve rekombinantnih antigenov na fagni površini izboljšali s spreminjanjem uporabljenega distančnika, prek katerega je SpyTag001 povezan s kapsidnim proteinom p8. S prenosom western smo potrdili izboljšanje proteolitične stabilnosti vzorcev konjugiranih bakteriofagov in pokazali, da se ob uporabi optimiziranega distančnika zmanjša delež modelnega antigena, ki ga proteaze cepijo s površine faga.

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

Selena Horvat¹, Anja Pišlar¹

¹ Fakulteta za Farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Razvoj nevronov je odvisen od nevrotrofičnih dejavnikov, pri čemer podobno delovanje izkazuje tudi glikolitični encim γ -enolaza, vendar njena funkcija in uravnavanje s proteolitičnim delovanjem katepsina X ostajata neraziskani. Pri diferenciaciji nevronske celice v specifične podtipne smo zaznali povišano izražanje γ -enolaze, diferenciacija oligodendrocitov pa je pokazala prehod povišanega izražanja α -enolaze na povišano izražanje γ -enolaze, kar podpira njeno vlogo pri diferenciaciji. Ko-lokalizacija γ -enolaze s katepsinom X kaže na njeno uravnavanje s katepsinom X. Z zaviralcem katepsina X smo zaznali več aktivne oblike γ -enolaze in povečano preživetje celic po njihovi poškodbi, *in vitro* ter *in vivo* modeli pa potrjujejo patogeno vlogo katepsina X pri nevrodegeneraciji in vnetju. Rezultati kažejo, da je γ -enolaza udeležena pri razvoju celic centralnega živčnega sistema, pri čemer katepsin X vpliva na njeno trofično delovanje.

Tumorsko mikrookolje pod drobnogledom: vloga cisteinskih peptidaz pri napredovanju raka

Marjeta Lipužič^{1,2}, Janko Kos^{1,2}, Ana Mitrović^{1,2}

¹ Odsek za biotehnologijo, Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

² Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Rak ostaja eden največjih izzivov sodobne medicine, saj kljub napredku, zdravljenje pogosto ne prinese želenih rezultatov. Med pomembnimi terapevtskimi tarčami pri raku so tudi cisteinske peptidaze, encimi, ki pomembno vplivajo na nastanek, napredovanje tumorjev in odziv na terapijo. Njihovo povečano aktivnost pri raku lahko uravnavamo na več nivojih, vključno z uporabo nizko molekularnih zaviralcev. Moje raziskovalno delo je usmerjeno v preučevanje vloge cisteinskih peptidaz pri procesih diferenciacije in dediferenciacije tumorskih celic ter njihove vloge pri plastičnosti tumorjev. Vključevalo bo pripravo naprednih sferoidnih modelov in vzpostavitev mikrofluidnih sistemov tumorskega mikrookolja (TMO) za spremljanje procesov plastičnosti tumorskih celic in interakcij med različnimi celicami znotraj TMO, ki bodo združevali različne populacije celic, kot so tumorske celice, tumorske matične celice, imunske celice in celice TMO. Hkrati bomo raziskali tudi medsebojno delovanje peptidaz in spremembe v njihovem izražanju ter aktivnosti v različnih populacijah celic znotraj TMO in njihov vpliv na odziv protitumorne terapije s specifičnimi zaviralci cisteinskih peptidaz.

Izboljšanje imunoterapije raka trebušne slinavke z modulacijo aktivnosti cisteinskih peptidaz

Nika Mazej¹

¹ *Odsek za biotehnologijo, Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija*

Microscale thermophoresis for detecting the binding of phenylalanine-tRNA synthetase to the *C9ORF72* repeat expansion antisense transcript

Vukan Milovanović¹, Boris Rogelj^{1,2}

¹*Department of Biotechnology, Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia*

²*Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Ljubljana 1000, Slovenia*

The G₄C₂ repeat expansion in the promoter region of the ***C9ORF72*** gene is the most common genetic cause of two related TDP-43 proteinopathies: amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. According to one hypothesis, this repeat expansion produces sense and antisense transcripts that sequester various RNA-binding proteins, potentially contributing to pathology. One such recently discovered protein is phenylalanine-tRNA synthetase (FARS). To investigate the potential interaction between human phenylalanine-tRNA synthetase (FARS) and the antisense repeat RNA transcript (C₄G₂)₆, we employed microscale thermophoresis (MST). We tested the binding between FARS and antisense repeat RNA in the presence of its ligands—phenylalanine, ATP, and differently expressed and post-transcriptionally modified tRNA—to account for the possibility that the interaction between FARS and RNA might be bridged by tRNA or depend on a specific conformation induced by substrate binding. The results were inconclusive, with no binding interaction confirmed. Recurring issues included protein aggregation, adsorption to the capillaries, and heat-induced changes in the protein or dye, which we were unable to resolve. These challenges rendered measurements irreproducible, leading us to conclude that the interaction should be studied by alternative methods.

Dinamično spreminjanje interaktoma proteina TDP-43 v odzivu na stres

Jerneja Nimac^{1,2}, Helena Motaln¹, Boris Rogelj^{1,3}

¹ Odsek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

² Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana

³ Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana

Protein TDP-43 v fizioloških pogojih v nevronih in celicah glije kroži med jedrom in citoplazmo, kjer opravlja številne funkcije. V patoloških pogojih TDP-43 ireverzibilno potuje v citoplazmo in tvori agregate. Neučinkovit odziv na stres naj bi imel zelo pomembno vlogo pri tvorbi agregatov kot tudi v patogenezi nevrodegenerativnih obolenj ALS in FTD. Zato želimo ugotoviti, kako se v odsotnosti, prisotnosti in po odmiku stresorja spreminja interaktom proteina wtTDP-43, TDP-43dNLS, ki posnema patološke pogoje, in C-končnega fragmenta TDP-43 (CTF-TDP-43), ki se nahaja v patoloških agregatih. V ta namen smo izvedli metodo APEX, ki ji je sledil test »pull-down« in identifikacija interakcijskih partnerjev z masno spektrometrijo. Z bioinformatiko analizo smo preučili, kaj se dogaja s posameznimi interakcijskimi partnerji v odsotnosti stresorja, 90 minut po dodatku natrijevega arzenita, po odstranitvi stresorja, ko je delež stresnih granul v celicah 50-odstoten, in v času, ko stresne granule niso bile več prisotne. Ugotovili smo, da protein stresnih granul G3BP1 interagira le z wtTDP-43, najbolj v prisotnosti stresorja, po njegovi odstranitvi pa je interakcija primerljiva interakciji z interakcijo v odsotnosti stresorja. Poleg tega smo ugotovili, da se krivulje, ki opisujejo relativne spremembe (fold change) interakcije nekaterih proteinov, precej razlikujejo med različnimi variantami TDP-43. Te proteine bomo v nadaljevanju podrobneje preučili in določili njihove vloge v celici, v katerih bioloških procesih sodelujejo, njihovo (napačno) lokalizacijo in molekularne funkcije.

Majhne RNA preprečujejo agregacijo proteina TDP-43 in vitro

Klementina Polanec¹, Jerneja Nimac^{1,2}, Tomaž Žagar¹, Vera Župunski³, Boris Rogelj^{1,3}

¹ *Odsek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija*

² *Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija*

³ *Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija*

TDP-43 je DNA- in RNA-vezavni protein, ki se v fizioloških pogojih nahaja zlasti v jedru in uravnava metabolizem RNA. Pri nevrodegenerativnih boleznih ALS in FTD se v citoplazmi nevronov pojavijo agregati TDP-43, s čimer protein izgubi svoje normalne funkcije in pridobi nove, toksične funkcije. Preučevanje agregacije TDP-43 in dejavnikov, ki vplivajo na njegovo agregacijo, je zato ključnega pomena pri razumevanju vloge TDP-43 pri nevrodegeneraciji. V naših raziskavah smo pokazali, da TDP-43 veže molekule tRNA in YRNA z nanomolarnimi afinitetami. Interakcije bi lahko bile fiziološkega pomena, saj tako tRNA kot YRNA v ekvimolarnih razmerjih inhibirajo agregacijo proteina in ga ohranjajo topnega.

Litični proteini bakteriofagov kot orodje za izboljšano sproščanje rekombinantnih proteinov pri mlečnokislinski bakteriji *Lactococcus cremoris*

Petra Štravs¹, Lara Repar^{1, 2}, Aleš Berlec^{1, 2}

¹ Odsek za Biotehnologijo, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

² Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Izločanje iz celic predstavlja pogosto izbrano strategijo za produkcijo rekombinantnih proteinov, saj omogoča številne prednosti, kot so višji donosi ter enostavnejša izolacija in čiščenje, kar posledično povečuje učinkovitost celotnega proizvodnega procesa. Bakterija *Lactococcus cremoris* s statusom GRAS se izkazuje kot obetaven gostiteljski organizem za zunajcelično produkcijo terapevtskih in ostalih industrijskih rekombinantnih proteinov, saj ima le eno poznano zunajcelično izraženo površinsko proteinazo HtrA. Za zmanjšanje tveganja razgradnje zunajceličnih rekombinantnih proteinov zaradi te proteinaze je bil razvit sev *L. cremoris* z mutacijo gena *htrA*. Kljub temu pa ostaja ena izmed glavnih omejitev nizka učinkovitost izločanja prekomerno izraženih rekombinantnih proteinov. Za izboljšanje sekrecije rekombinantnih proteinov so razvili številne pristope, a so ti izboljšali izločanje zgolj nekaterih proteinov v omejenem obsegu. Z uporabo bakteriofagnih litičnih proteinov, ki povečajo permeabilnost membran in prepustnost celične stene, smo razvili sistem, ki odpira nove možnosti povečanega izločanja rekombinantnih proteinov iz bakterije *L. cremoris*. Učinkovitost sistema smo ovrednotili na treh heteroloških proteinih. Sistem je omogočil tako izboljšano izločanje rekombinantnih proteinov v gojišče, kot tudi njihovo sidranje na površino celic. Poleg tega smo potrdili funkcionalnost proteinov, ki so se s tem sistemom bodisi izločili v gojišče, bodisi pritrdili na celično steno. Ugotovili smo tudi, da sistem ne vpliva bistveno na viabilnost gostiteljskih celic.

Vloga cisteinskih katepsinov pri polarizaciji celic mikroglije

Anja Tršek¹, Anja Pišlar¹

¹ *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija*

Celice mikroglije sodijo med glialne celice centralnega živčnega sistema (CŽS). So prirojene celice imunskega sistema, poleg tega pa so odgovorne za vzdrževanje homeostaze CŽS. Pod vplivom patoloških in imunoloških dražljajev pride do polarizacije celic mikroglije v vnetni fenotip M1, ki spodbuja nevrovnetje, ali protivnetni fenotip M2, ki deluje zaščitno. Nevrovnetje, posredovano z mikroglijo, je bilo prepoznano kot pomemben dejavnik pri patogenezi in napredovanju nevrodegenerativnih bolezni. Pri tem so pomembni cisteinski katepsini, ki ji izloča polarizirana mikroglia M1, saj sprožijo signalne poti, ki vodijo v nevrodegenerativne procese. V okviru raziskave želimo opredeliti vlogo posameznih cisteinskih katepsinov in njihovih tarč pri polarizaciji celic mikroglije v posamezen fenotip ter hkrati pojasniti njihovo uravnavanje v procesu aktivacije mikroglije, ki ima osrednjo vlogo pri nevrodegeneraciji, povezani z nevrovnetjem.

Vpliv proteinov APOBEC3 na kancerogenezo

Blaž Videčnik¹, Janko Kos¹, Urša Pečar Fonović¹, Marija Nika Lovšin¹

¹ *Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija*

Proteini APOBEC3 so del družine citidinskih deaminaz AID/APOBEC, ki katalizirajo deaminacijo citidina v uridin v enoverižnih nukleinskih kislinah (DNA ali RNA) ter s tem povzročijo mutacije C-T ali C-G. APOBEC3 imajo pomembno vlogo v prirojeni imunosti kot zaviralci okužb z virusi in retroelementi. Po enakem mehanizmu lahko citidinske deaminaze povzročajo mutacije v genomu gostitelja in pripomorejo k razvoju raka. Mutacije, značilne za APOBEC3, so z analizami pokazali pri bolnikih z različnimi vrstami raka, pri čemer je pojav mutacij sorazmeren s povišanim izražanjem teh proteinov. Preko mutacij rakavih celic lahko povzročijo razvoj rezistence na zdravljenje raka. Vloga teh proteinov v razvoju in napredovanju različnih rakavih obolenj ter razvoju rezistence na zdravljenje še ni popolnoma pojasnjena.

V našem delu bomo ovrednotili vpliv proteinov APOBEC3 na kancerogenezo. Pri tem bomo uporabili laboratorijske in bioinformatične metode za identifikacijo različnih regulatornih poti in diferencialno izraženih genov, katerih izražanje je odvisno od APOBEC3 in imajo lahko potencialno vlogo v razvoju raka. Analizirali bomo še epitranskriptom celic s povišanim ali znižanim izražanjem proteinov APOBEC3 in iskali povezavo med molekulami RNA in razvojem raka.

Izražanje vezalcev toksina TcdB bakterije *Clostridioides difficile* v varni bakteriji *Lactococcus lactis*

Nejka Volarič¹, Aleš Berlec^{1,2}

¹ Odsek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

² Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Okužba z bakterijo *Clostridioides difficile* prizadene prebavni trakt, povzroča drisko in lahko vodi do življenjsko nevarnih stanj, kot je fulminantni kolitis. Naraščajoče število okužb s *C. difficile* v bolnišničnem okolju in pomanjkanje ustreznega zdravljenja sta opredeljena kot eni od glavnih zdravstvenih težav v razvitem svetu. Patogeneza in napredovanje bolezni sta povezana s toksini TcdA, TcdB in CDT, ki jih bakterija proizvaja. Za blokiranje delovanja toksina TcdB je registrirano monoklonsko protitelo bezlotoksumab, ki pa deluje sistemsko in ga ni možno uporabiti peroralno v prebavnem traktu, kjer bi bila inaktivacija toksina najbolj potrebna. V okviru raziskovalnega dela se osredotočamo na izražanje vezalcev toksina B, ki bi omogočili peroralno dostavo in lokalno preprečili vezavo toksina na receptorje. V bakteriji *Lactococcus lactis*, ki lahko zaradi svojega probiotičnega delovanja dodatno ugodno deluje na prebavni sistem, smo izrazili in na površini predstavili različne majhne proteinske zaviralce, ki so odporni na pogoje v prebavnem traktu in delujejo na različne poti vezave toksinov B na celice prebavnega sistema.

Odstranjevanje biofilma bakterije *Listeria innocua* z magnetnimi antibakterijskimi nanodelci

Nika Zaveršek¹, Maja Caf^{2,3}, Sebastjan Nemec², Nika Janež¹, Stane Pajk³, Slavko Kralj^{2,3}, Jerica Sabotič¹

¹ Odsek za biotehnologijo, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

² Odsek za sintezo materialov, Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

³ Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Biofilmi so skupki mikroorganizmov, obdani z zunajceličnim matriksom polimernih snovi (EPS), ki ga sestavljajo polisaharidi, proteini in zunajcelična DNA. Mikroorganizmi so v biofilmu zaščiteni pred dehidracijo, mehanskimi poškodbami in protimikrobnimi sredstvi, zaradi česar je odstranjevanje biofilmov z površin izjemno zahtevno. Trdovratnost odstranjevanja biofilmov predstavlja velik izziv v zdravstvu, saj jih povezujemo z različnimi boleznimi in ponavljajočimi okužbami, poleg tega pa predstavljajo težavo tudi v živilsko-predelovalni industriji, javni oskrbi za vodo in prezračevalnih sistemih. Zelo problematična patogena bakterija, ki tvori biofilme, je *Listeria monocytogenes*, vendar za raziskave in testiranje protibakterijskih snovi bolj pogosto uporabljamo njej podobno nepatogeno bakterijo *Listeria innocua*.

Preučevali smo novo metodo odstranjevanja biofilmov z uporabo antibakterijskih nanodelcev. Biofilme modelnega seva bakterije *L. innocua* smo gojili na površini polistirena. Sprane biofilme smo nato tretirali s tremi različnimi vrstami in tremi različnimi velikostmi antibakterijskih magnetnih nanodelcev, v prisotnosti in odsotnosti antibiotika. Učinkovitost magnetno-mehanskega odstranjevanja biofilmov je bila določena z merjenjem fluorescence izraženega reporterskega proteina in določanjem števila bakterij (CFU). Rezultati so pokazali, da nanodelci ponujajo obetavne rezultate pri odstranjevanju biofilmov, vendar so učinki raznoliki in omejeni, kar nakazuje potrebo po nadaljnjih raziskavah.

Uporaba kratkih peptidov za nevtralizacijo avtoprotiteles pri avtoimunskih boleznih

Ana Zupančič¹, Mojca Lunder¹

¹ Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Skupna lastnost večine avtoimunskih bolezni je tvorba avtoprotiteles, usmerjenih proti lastnim antigenom. Avtoprotitelesa, usmerjena proti zunajceličnim tarčam, lahko povzročijo številne negativne učinke, zato bi z zaviranjem njihove interakcije s svojimi tarčami lahko potencialno omilili učinke bolezni.

TTP je resna in življenjsko ogrožajoča avtoimunska bolezen, pri kateri je patogena vloga avtoprotiteles dobro poznana.

Z reševanjem fagnih knjižnic peptidov (bakteriofagne knjižnice z linearnimi ali cikličnimi peptidi) proti protitelesom, usmerjenim proti izbranemu avtoantigenu, smo identificirali kratke sekvence peptidov. Ti se konformacijsko vežejo na paratope protiteles in tako posnemajo epitope na avtoantigenih.

Z metodo ELISA smo identificirali tiste bakteriofagne klone, ki so se močno vezali na protitelesa in nato določili njihovo aminokislinsko zaporedje s Sangerjevim sekvenciranjem. Izvedli smo sekvenciranje z metodo naslednje generacije za globlji vpogled nabor in pogostost peptidnih sekvenc, ki se vežejo na avtoprotitelesa. Na ta način smo lahko identificirali aminokislinske motive, ki se pogosto ponavljajo znotraj nabora več peptidov, kar nakazuje, da imajo te aminokisline verjetno pomembno vlogo pri vezavi na protitelesa.

Sledi izbor peptidov, njihova sinteza in ovrednotenje njihove interakcije z avtoprotitelesi iz seruma pacientov. Na vzorcih pacientov bomo s pomočjo mikromreže določili tudi tarčne regije, na katere se avtoprotitelesa vežejo najpogosteje. Na osnovi rezultatov bomo izbrali, sintetizirali in ovrednotili še sklop peptidov z linearnim prileganjem na tarčo.