

»Mladi za napredek Maribora 2024«

41. srečanje

VPLIV NUKLEOTIDNEGA POLIMORFIZMA NA STRUKTURO PROTEINA TLR2 IN POTENCIALNA POSLEDICA NA POTEK MULTIPLE SKLEROZE

Raziskovalno področje: kemija in kemijska tehnologija

Raziskovalna naloga

Avtor:	Jurij Petek
Mentor:	Denis Čuček, Urban Bren, Katarina Kores
Šola:	Prva gimnazija Maribor
Število točk:	162 / 170

Maribor, februar 2024

Kazalo vsebine

POVZETEK	6
ZAHVALA.....	7
1 UVOD	8
1.1 Namen, hipoteze in cilji	8
2 TEORETIČNO OZADJE	9
2.1 Multipla skleroza.....	9
2.1.1 Oblike bolezni	9
2.2 Od DNK do proteina	10
2.2.1 Nastanek proteina	14
2.3 Tollu podoben receptor 2 (TLR2)	14
2.3.1 Mutacija Thr411Ile – polimorfizem enega nukleotida (SNP).....	15
3 METODE DELA	16
3.1 Priprava sistemov s spletnim strežnikom CHARMM-GUI	16
3.2 Izvedba simulacij molekulske dinamike s programom NAMD.....	17
3.3 Analiza simulacij molekulske dinamike s programom VMD.....	18
3.3.1 Premik korena povprečnih kvadratov (RMSD)	18
3.3.2 Analiza vodikovih vezi.....	19
4 REZULTATI IN DISKUSIJA	19
5 ZAKLJUČEK	29
6 DRUŽBENA ODGOVORNOST, TRAJNOST, NAPREDEK	30
7 VIRI IN LITERATURA	31

Kazalo slik

Slika 1. Struktura proteina TLR2 (lastna slika).....	10
Slika 2. Prikaz vseh štirih struktur proteina, z začetkom pri spajanju aminokislin v verige, in koncem pri spajanju polipeptidnih verig v funkcionalen protein (Latham 2021)	13
Slika 3. Struktura nukleotidov citozin (levo) in timin (desno) (lastna slika)	15
Slika 4. Struktura aminokislin treonin (levo) in izolevcin (desno) (lastna slika).....	15
Slika 5. Sistem, pripravljen za simulacije molekulske dinamike. Z modro je predstavljen protein, zeleno so kloridni ioni, vijolično kalijeve ioni, rjavi pa so naravno prisotni kofaktorji. Levo je predstavljena vodna kocka s proteinom in protioni. (lastna slika)....	17
Slika 6. Prikaz RMSD vrednosti za divji tip proteina, prva paralelka. Frames predstavlja število posameznih položajev sistema tekom simulacije. 200 slik (frames) sovpada s 100 ns simulacije. (lastna slika).....	20
Slika 7. Prikaz RMSD vrednosti za divji tip proteina, druga paralelka. Frames predstavlja število posameznih položajev sistema tekom simulacije. 200 slik (frames) sovpada s 100 ns simulacije. (lastna slika)	21
Slika 8. Prikaz RMSD vrednosti za mutiran protein, prva paralelka. Frames predstavlja število posameznih položajev sistema tekom simulacije. 200 slik (frames) sovpada s 100 ns simulacije. (lastna slika).....	22
Slika 9. Prikaz RMSD vrednosti za mutiran protein, druga paralelka. Frames predstavlja število posameznih položajev sistema tekom simulacije. 200 slik (frames) sovpada s 100 ns simulacije. (lastna slika).....	23
Slika 10. Prikaz števila vodikovih vezi za divji tip proteina, prva paralelka. Frames predstavlja število posameznih položajev sistema tekom simulacije. 200 slik (frames) sovpada s 100 ns simulacije. (lastna slika)	24
Slika 11. Prikaz števila vodikovih vezi za divji tip proteina, druga paralelka. Frames predstavlja število posameznih položajev sistema tekom simulacije. 200 slik (frames) sovpada s 100 ns simulacije. (lastna slika)	25
Slika 12. Prikaz števila vodikovih vezi za mutiran protein, prva paralelka. Frames predstavlja število posameznih položajev sistema tekom simulacije. 200 slik (frames) sovpada s 100 ns simulacije. (lastna slika)	26

Slika 13. Prikaz števila vodikovih vezi za mutiran protein, druga paralelka. Frames predstavlja število posameznih položajev sistema tekom simulacije. 200 slik (frames) sovpada s 100 ns simulacije. (lastna slika) 27

Uporabljeni simboli in kratice

TLR2 – Tollu podoben receptor 2 (*ang.* Toll Like Receptor 2)

MS – Multipla skleroza

DNK – Deoksiribonukleinska kislina

RNK – Ribonukleinska kislina

mRNK – Sporočilna ribonukleinska kislina (*ang.* Messenger RNA)

SNP – Polimorfizem enega nukleotida (*ang.* Single Nucleotide Polimorphism)

VMD – Računalniški program za prikaz molekulske dinamike (*ang.* Visual Molecular Dynamics)

NAMD – Računalniški program za vizualizacijo dinamike večjih sistemov na nano ravni

RMSD – *ang.* Root-Mean-Square Deviation

Thr – Aminokislina treonin

Ile – Aminokislina izolevcin

IL – Interleukin

POVZETEK

Multipla skleroza je neozdravljiva avtoimunska bolezen. Pojavi se zaradi napake v delovanju proteinov v imunskih celicah, med temi tudi proteina TLR2. Raziskovali smo vpliv mutacije enega nukleotida na dvojni vijačnici DNA, ki povzroči spremembo aminokisline v zaporedju proteina, ter raziskovali, kako mutacija vpliva na strukturo proteina. Pri tem smo si pomagali z računalniškimi simulacijami molekularne dinamike ter računalniškimi izračuni. Pripravili smo dva sistema ter zagnali štiri simulacije, dve za osnovni protein (divji tip) in dve za mutiran protein. Na podlagi primerjave spremembe položaja atomov med simulacijo (RMSD) smo ugotavljali stabilnost proteina, opazovali smo spremembo v številu vodikovih vezi skozi simulacijo in ugotavljali, kako le-to vpliva na strukturo in stabilnost proteina. Ugotovili smo, da je protein z mutacijo bolj fleksibilen kot protein brez mutacije, prav tako se tvori manj vodikovih vezi, kar lahko povzroči destabilizacijo celotne strukture.

Ključne besede: mutacija, SNP, beljakovina, TLR2, simulacije molekulske dinamike, multipla skleroza

ZAHVALA

Iskreno bi se rad zahvalil vsem, ki so sodelovali pri pripravi raziskovalne naloge. Zahvala gre Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Maribor za omogočeno raziskovanje pod odličnimi pogoji. Najlepša hvala raziskovalni mentorici, ki mi je skozi raziskovanje zagotavljala zanesljive vire in informacije, me usmerjala ter mi pomagala z računalniškim delom. Zahvala gre tudi mojemu šolskemu mentorju, ki mi je dal možnost za raziskovanje na fakulteti. Hvala vsem za vaš vložen trud in čas.

1 UVOD

Multipla skleroza je kronična avotimunska bolezen, za katero še vedno ne vemo, zakaj točno se pojavi, povezujemo pa jo s pomanjkanjem vitamina D in določenimi genskimi spremembami, ki vplivajo na delovanje proteinov. Avtoimunost pomeni, da telo napade samega sebe. Ključno vlogo pri razvoju takih bolezni pa imajo beljakovine oziroma proteini, ki lahko razvoj bolezni bodisi pospešujejo bodisi zavirajo. Pri multipli sklerozi je tak protein Tollu – podoben receptor 2 (ang. Toll – Like Receptor 2). Potek multiple skleroze se lahko spremeni glede na mutacijo tega proteina. Mutacija je sprememba genskega zapisa na DNK, ki je ključnega pomena za izdelavo proteinov. Ko se na DNK verigi menja eden izmed nukleotidov, je možna sprememba zaporedja aminokislin v polipeptidni verigi. TLR2 je protein, ki zaznava grožnje imunskemu sistemu, od mutacije pa je odvisno, kako dobro to delo opravlja. Ugotavljali bomo, kako mutacija Thr411Ile vpliva na stabilnost TLR2, in določili vpliv novega mutiranega proteina na potek multiple skleroze (Tomažič et al. 2018; Smrdu 2009; Fujiwara et al. 2007; Merx et al. 2007).

1.1 Namen, hipoteze in cilji

V raziskovalni nalogi smo raziskovali vpliv spremembe enega nukleotida na genu v DNK, ki se prepiše v beljakovino TLR2. Izbrali smo si mutacijo, kjer timin zamenja citozin, v beljakovini pa se to izraža kot mutacija Thr411Ile. Raziskovali smo vpliv mutacije na stabilnost TLR2 in poskušali povezati vpliv novega mutiranega proteina na potek multiple skleroze. Glavni cilj naloge je, uspešno pripraviti in izvesti simulacije molekulske dinamike za dva sistema:

1. Sistem za divji tip proteina – nemutirana oblika, ki je prisotna pri večini populacije. Predstavlja nam osnovo za kasnejšo primerjavo.
2. Sistem za mutiran protein – specifična mutacija na proteinu. Po opravljenih simulacijah bomo opazovali ključne razlike med mutiranim in nemutiranim proteinom.

Želimo predstaviti, kako mutacija aminokislone vpliva na strukturo in obnašanje proteina ter posledično na potek bolezni.

Postavili smo si naslednje hipoteze:

Hipoteza 1: S pomočjo simulacij molekulske dinamike bomo uspešno določili razlike v strukturi proteina, ki nastanejo zaradi mutacije. Vrednosti RMSD v posameznem sistemu bodo pokazale razlike v strukturi med nemutiranim in mutiranim proteinom.

Hipoteza 2: S pomočjo simulacij molekulske dinamike bomo uspešno določili razlike v stabilnosti proteina, ki nastanejo zaradi mutacije. Analiza vodikovih vezi v posameznem sistemu bo pokazala razlike med stabilnostjo nemutiranega in mutiranega proteina.

Hipoteza 3: Dobljene rezultate bomo uspešno povezali z že znanimi podatki o mutaciji in potencialnem vplivu na potek multiple skleroze. S pomočjo rezultatov bomo prikazali, zakaj mutacija vpliva na protein in posledično na potek bolezni.

Z našimi rezultati lahko ponudimo unikaten vpogled v obnašanje proteina, ki ga narekuje mutacija aminokisline, ter pomagamo razložiti, zakaj ima mutacija takšen ali drugačen vpliv na sam protein in posledično na potek bolezni. To je razmeroma nov pristop – na ta način lahko raziskujemo in določujemo vpliv tudi še neraziskanih mutacij.

2 TEORETIČNO OZADJE

2.1 Multipla skleroza

Multipla skleroza je ena izmed najbolj znanih avtoimunih bolezni. Da je bolezen avtoimuna, pomeni, da se telo bori proti samemu sebi. Lastna protitelesa napadajo strukture v telesu, v primeru multiple skleroze so žrtve oligodendrociti. Te strukture sintetizirajo mielin, ki pa je ključen za hiter prenos informacij po nevronih. To posledično povzroči otrdelost na različnih delih telesa, odvisno, kje se pojavi demielinizacija. Zdravila za multiplo sklerozo še vedno ni, pomagajo pa zaviralci imunskega sistema. Takšno zdravljenje pa ima svoje slabosti – glede na to, da se zavira celoten imunski sistem, je veliko večja verjetnost, da bo posameznik imel hujše posledice pri za ostale ljudi neškodljivih boleznih, kot je na primer prehlad. Najpogosteje se pojavlja v skupini ljudi, starih med 20 in 40 let, med katerimi imajo ženske več možnosti za obolenje, kar pa ne pomeni, da moški ne zbolevali za multiplo sklerozo ("Moja MS", spletna stran).

2.1.1 Oblike bolezni

Poznamo štiri glavne oblike multiple skleroze:

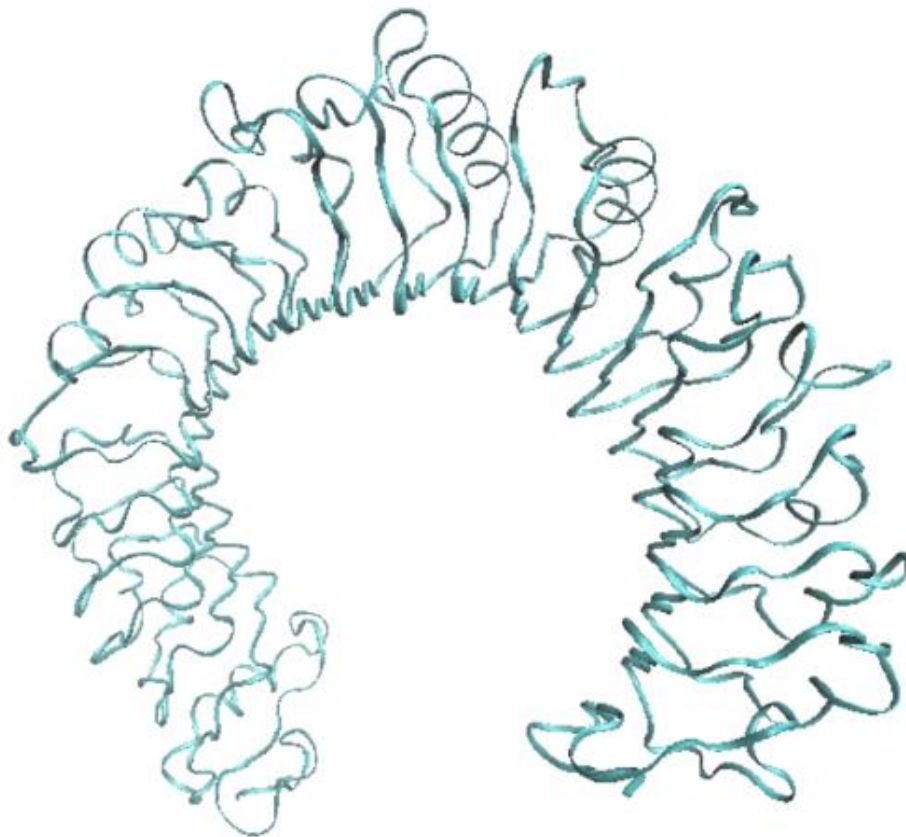
- recidivno remitentna (v razmaku nekaj mesecev oziroma celo let se stanje poslabša in nato izboljša, vendar se mielin nikoli ne zaceli stoodstotno, kar pomeni da se stanje v povprečju slabša);
- sekundarno progresivna (prvih nekaj period deluje enako kot recidivno remitentna oblika, nato pa začne naraščati približno premo sorazmerno s časom);

- primarno progresivna (poškodba ves čas narašča približno premo sorazmerno s časom);
- progresivno recidivna (ves čas se stanje slabša, vmes se zelo poslabša in gre malo na bolje, nato pa se spet začne progresivno slabšati).

Po vsakem napadu na imunski sistem se aktivirajo regulativne T imunske celice, da nekoliko umirijo reakcijo, čez nekaj časa pa imunske celice spet zaznajo oligodendrocite in mielin kot grožnjo. Zato se stanje pri vseh oblikah vedno slabša. Poznamo nekaj zaviralcev imunskega sistema, vendar delujejo na način, da zavirajo celoten imunski sistem, kar lahko pomeni, da bodo posledice navadnih bolezni, kot je na primer prehlad, zelo hude, morda se celo končajo s propadom imunskega sistema in smrtjo bolnika ("Moja MS", spletna stran).

2.2 Od DNK do proteina

Beljakovine oziroma proteini, so osnovni gradniki življenja. Ime *protein* izhaja iz grške besede *proteios*, kar pomeni "na prvem mestu". Proteini niso živi, vendar njihove funkcije pokrivajo delovanje celotnega organizma. Encimi, protitelesa, membrane, DNK, RNK in še mnoge druge strukture so sestavljene iz različno oblikovanih proteinov (Tomažič et al. 2018).



Slika 1. Struktura proteina TLR2 (lastna slika)

Proteini so ključnega pomena za življenje. Celotno telo deluje na podlagi sporazumevanja proteinov. Vsak ima unikatno obliko, kar pomeni, da ima tudi svojo funkcijo, ki jo opravlja. Imajo izpostavljene dele, ki se uporabljajo kot ključ za prileganje k drugim proteinom, s čimer se tvorijo še bolj kompleksne strukture oziroma sprožijo reakcije, ki omogočajo dostop različnim surovinam za življenje itd. Tudi naš imunski sistem deluje na podlagi sporazumevanja beljakovin. V nadaljevanju bomo predstavili osnovne gradnike, ki so pomembni za nastanek proteina (Tomažič et al. 2018).

- **Nukleotid**

Nukleotid je osnovni gradnik molekule DNK. Zgrajen je iz sladkorja deoksiriboze, fosfatne skupine in dušikove baze. V DNK poznamo štiri dušikove baze – adenin, timin, citozin in gvanin. Med sabo se vežejo v komplementarne pare, adenin s timinom (z dvojno vodikovo vezjo) in citozin z gvaninom (s trojno vodikovo vezjo). V podvajanju DNK pa lahko pride do sprememb, mutacij. V primeru spremembe enega nukleotida in posledično njegovega para govorimo o spremembi enega nukleotida (SNP). Taka sprememba nukleotida lahko spremeni zaporedje aminokislin v polipeptidni verigi, ni pa nujno, saj lahko več različnih kodonov predstavlja isto aminokislino ("Kaj je SNP?" 2022).

- **Deoksiribonukleinska kislina (DNK)**

Deoksiribonukleinska kislina je osnovni "recept" za izgradnjo novih proteinov. Danes vemo, da je v obliki dvojne vijačnice, ki sta jo odkrila Crick in Watson. DNA je sestavljena iz organske baze (poznamo pet različnih organskih baz – adenin, citozin, gvanin, timin in uracil, štiri pri DNA in štiri pri RNA; razlika je le v tem, da pri RNA uracil nadomesti timin), sladkorja deoksiriboze in fosfatne skupine (Tomažič et al. 2018).

- **Aminokislina**

Osnovni gradniki beljakovin so aminokislino. To so organske molekule, ki imajo amsko (-NH₂) in karboksilno (-COOH) funkcionalno skupino vezano na skupen ogljikov atom. Na ta ogljikov atom je poleg vodika vezan še spremenljivi del molekule (-R, radikal), ki določa značaj in vlogo aminokislino v beljakovini. Beljakovine so zgrajene iz kombinacij dvajset različnih aminokislin. Rastline vse aminokislino izdelujejo same, človek pa le nekatere. Ostale mora pridobiti s hrano (Tomažič et al. 2018).

- **Vodikove vezi**

Vodikova vez je šibka kemijska vez, ki nastane med vodikom, kovalentno vezanim na močno elektronegativen atom (O-H ali N-H skupina), in nekim drugim močno elektronegativnim elementom s prostimi elektronskimi pari (O, N, F, S). Kljub temu da je vodikova vez šibka, je najmočnejša medmolekulska vez. Prav zaradi te lastnosti imajo molekule zelo zanimive strukture pod različnimi koti. Prav tako so te vezi odgovorne za pregibanje in upogibanje proteinskih struktur. S pomočjo vodikovih vezi se ugotavlja stabilnost molekule (Smrdu 2009; Arunan et al. 2011).

- **Polipeptid**

Aminokisline se med seboj povezujejo s kovalentno vezjo, ki nastane med karboksilno in amsko skupino. Vez med aminokislinami imenujemo peptidna ali amidna vez. Pri tej reakciji polimerizacije se odcepi voda. Polimer, ki nastane iz nekaj do prek tisoč aminokislinskih monomerov, imenujemo polipeptid. Polipeptid ni sinonim za beljakovino, saj lahko le dovolj dolge polipeptidne verige, sestavljene iz več kakor petdeset aminokislin, oblikujejo beljakovino (Tomažič et al. 2018; Smrdu 2009).

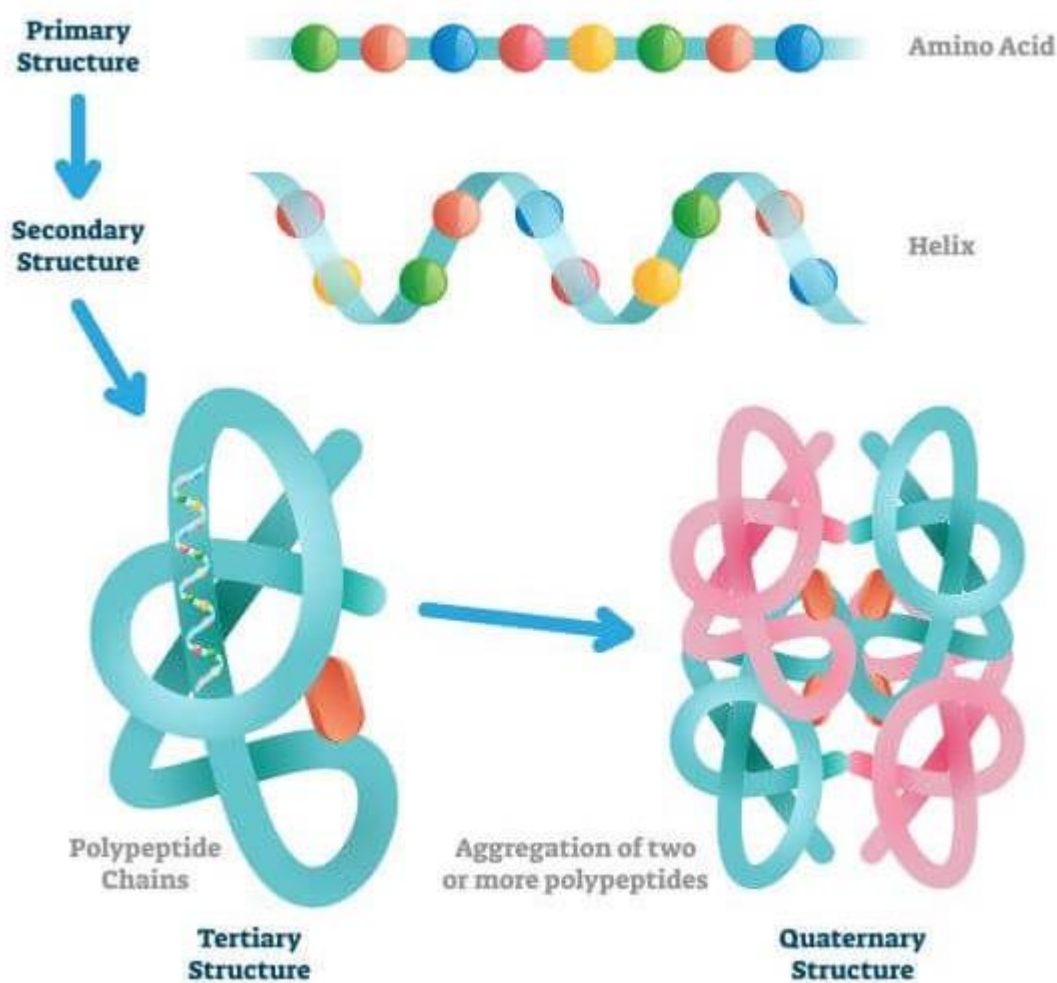
- **Strukture Proteinov**

Primarna struktura. Polipeptidi se razlikujejo po številu in zaporedju aminokislin v verigi. Iz samo dvajset različnih aminokislin lahko nastane nepredstavljivo veliko število različnih polipeptidov. Edinstveno število in zaporedje aminokislin v polipeptidu oblikuje primarno strukturo beljakovine (Tomažič et al. 2018).

Sekundarna struktura. Polipeptidi niso iztegnjene verige, ampak se spontano oblikujejo, krčijo in zvijajo kot vijačnica. Med sosednjimi zavoji v vijačnici se izoblikujejo številne vodikove vezi, kar tvori sekundarno strukturo beljakovin (Tomažič et al. 2018).

Terciarna struktura. Sile med radikali aminokislin v zvutih ali nagubanih delih polipeptidne verige določajo zapleteno terciarno strukturo proteina. Poleg šibkih vodikovih, ionskih in drugih vezi se namreč med radikali aminokislin tvorijo tudi močnejše kovalentne vezi. Tako se lahko izoblikujejo beljakovine s kroglasto ali nitasto terciarno strukturo (Tomažič et al. 2018).

Kvartarna struktura. Beljakovine so lahko povezane tudi iz več polipeptidnih verig. Neko beljakovino lahko torej sestavlja več polipeptidnih enot, ki skupaj proteinu dajo povsem novo funkcijo. Da se oblikuje kvartarna struktura beljakovin, se morajo terciarni polipeptidni deli ujemati med sabo, da oblikujejo funkcionalno obliko in delovanje celotnega proteina. Ob neujemanjih ali mutacijah je lahko beljakovina popolnoma nedelujoča. Lahko pa se zgodi povsem nasprotno, mutacija je lahko tudi pozitivna. Poznamo pa še seveda mutacije, ki ne spremenijo ključnega delovanja terciarnega polipeptida (Tomažič et al. 2018).



Slika 2. Prikaz vseh štirih struktur proteina, z začetkom pri spajanju aminokislin v verige, in koncem pri spajanju polipeptidnih verig v funkcionalen protein (Latham 2021)

2.2.1 Nastanek proteina

Transkripcija

V jedru celice se nahajajo kromosomi, ki hranijo DNK. Da se protein sintetizira, se mora DNK odpreti. Tam, kjer se odpre, se nanjo priključi encim RNK polimeraza, ki prebere zaporedje organskih baz. Nato se mRNA vzporedno priključuje in naredi kopijo enega izmed delov dvojne vijačnice. Ta proces se imenuje transkripcija (Tomažič et al. 2018; Smrdu 2009).

Translacija

Ko se transkripcija konča, se začne translacija. Molekula mRNA potuje iz nukleusa (jedra) v citosol in nato v ribosome. Ribosomi preberejo zaporedje ter ga dopolnijo s tremi zaporednimi prilegajočimi organskimi bazami, ki s sabo prinesejo tudi aminokisline, ki se nato sproti sestavljajo v primarno strukturo proteina. Ko je polipeptid dovolj velik, se začne oblikovati v končni protein po že omenjenih fazah. Tako preko štirih struktur dobimo funkcionalen protein (Tomažič et al. 2018; Smrdu 2009).

2.3 Tollu podoben receptor 2 (TLR2)

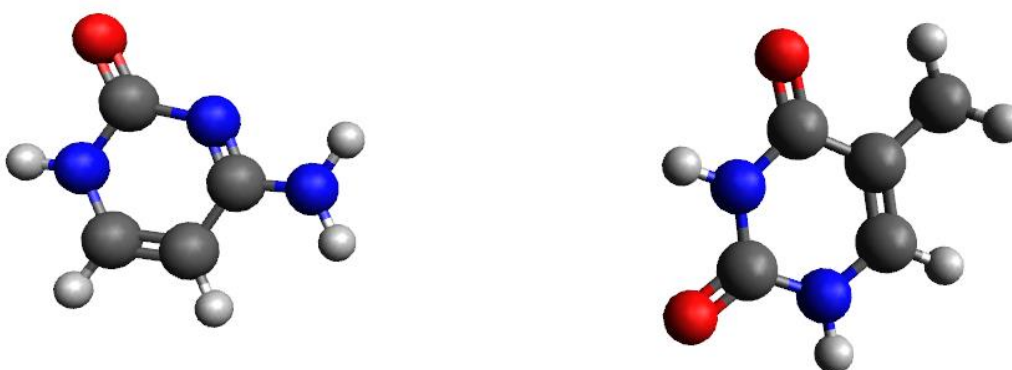
Tollu podoben receptor igra eno izmed ključnih vlog pri zaščiti našega telesa pred patogeni. Lahko deluje kot transmembranski receptor, lahko pa se nahaja tudi znotraj celice. V vsakem primeru pa prepozna potencialno grožnjo celici. TLR2 ne deluje sam, ampak se poveže v par s TLR1 ali pa TLR6. Deluje na imunskih celicah, kot so na primer makrofag, monocit, T-celica, B-celica itd. Najdemo pa ga tudi v celici oligodendrocita, v cerebrospinalni tekočini, na demieliniziranih delih aksonov ter celo na imunskih celicah, ki vstopijo skozi krvno-možgansko pregrado in napadejo mielin.

Ob pravilni ligaciji TLR2 pri multipli sklerozi se poveča produkcija IL1, IL6 in IL12 interleukin zaviralcev. Ti sprožijo preobrazbo '*naivne T celice*' v Th1 in Th17 celice. Te celice proizvajajo IL17 in interferon gama, ki omogočajo povečan pretok levkocitov skozi krvno-možgansko pregrado. IL2 in IL6 pa hkrati zavirata diferenciacijo regulativnih T celic, ki so ključne za zaustavljanje avtoimunske reakcije, saj proizvajajo IL10, interleukin, ki zavira avtoimunsko vnetje. Šele ko se aktivirajo TLR3 in TLR7, ki zavirajo proizvodnjo IL17 in IL23, se začne ustavljanje avtoimunske reakcije (Fujiwara et al. 2007; Merx et al. 2007; Miranda-Hernandez and Baxter 2013).

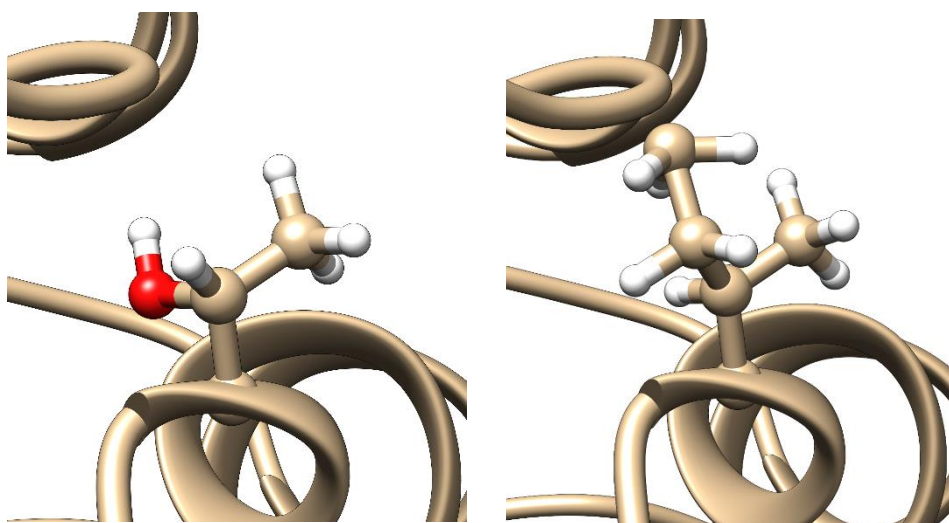
2.3.1 Mutacija Thr411Ile – polimorfizem enega nukleotida (SNP)

Po spremembi nukleotida (citozin se menja s timinom – slika 3) na DNK se spremeni zaporedje dušikovih baz v kodonu, ki je prvotno kodiral aminokislino treonin (Thr). Sedaj pa se na mestu 411 pojavi drugačna aminokislina, izolevcin (Ile), ki jo kodira kodon z drugačnim zaporedjem dušikovih baz. Strukturi obeh aminokislin sta prikazani na sliki 4. Kodon je zaporedje treh dušikovih baz, ob spremembi ene baze se lahko spremeni aminokislina, ki jo predstavlja kodon. Ni pa nujno, saj več kodonov predstavlja eno aminokislino. V primeru naše mutacije je jasno razvidno, da se spremeni aminokislina, ki jo določa kodon.

Ta mutacija sicer nima ogromnega vpliva na TLR2, je pa dovolj, da se nekoliko spremeni stabilnost in funkcionalnost. Ker so v pacientih z multiplo sklerozo odkrili nižje nivoje proteina TLR2 v krvi kot običajno, lahko sklepamo, da ima ligacija TLR2 pomembno vlogo pri razvoju MS (Fujiwara et al. 2007; Merx et al. 2007; Miranda-Hernandez and Baxter 2013).



Slika 3. Struktura nukleotidov citozin (levo) in timin (desno) (lastna slika)



Slika 4. Struktura aminokislin treonin (levo) in izolevcin (desno) (lastna slika)

Za mutacijo Thr411Ile se sklepa, da naj bi škodovala strukturo proteina, prav tako pa naj bi vplivala na aktivacijo pomembnega proteina, transkripcijskega faktorja NF- κ B, ki ima bistveno vlogo pri imunskem odzivu. Mutiran protein naj bi povzročil zmanjšano aktivacijo NF- κ B, kar posledično vpliva na imunski odziv in lahko vodi v povečano dovzetnost za razna vnetna obolenja, kot je tudi multipla skleroza (Ben-Ali et al. 2011; Liu et al. 2017).

3 METODE DELA

Ekperimentalni del raziskovalne naloge se je izvedel s pomočjo računalniškega pristopa. Z uporabo različnih orodij smo pripravili, izvedli in analizirali simulacije molekulske dinamike. V podatkovni bazi Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>) smo najprej poiskali primerno strukturo proteina TLR2. Na spletnem strežniku CHARMM-GUI (<https://www.charmm-gui.org/>) smo pripravili vhodne datoteke za program NAMD (Phillips et al. 2020), s katerim smo nato izvedli simulacije molekulske dinamike. Rezultate simulacij smo pregledali s programom VMD (Humphrey, Dalke, and Schulten 1996). Osredotočili smo se na RMSD in vodikove vezi. Iz teh podatkov lahko napovemo obnašanje in stabilnost celotnega proteina. Ker je raziskovalna naloga osredotočena na mutacijo v proteinu, ki nastane zaradi polimorfizma v DNK, smo simulacije izvedli za tako imenovani divji tip ('wild type' – nemutiran) proteina in za protein z mutacijo.

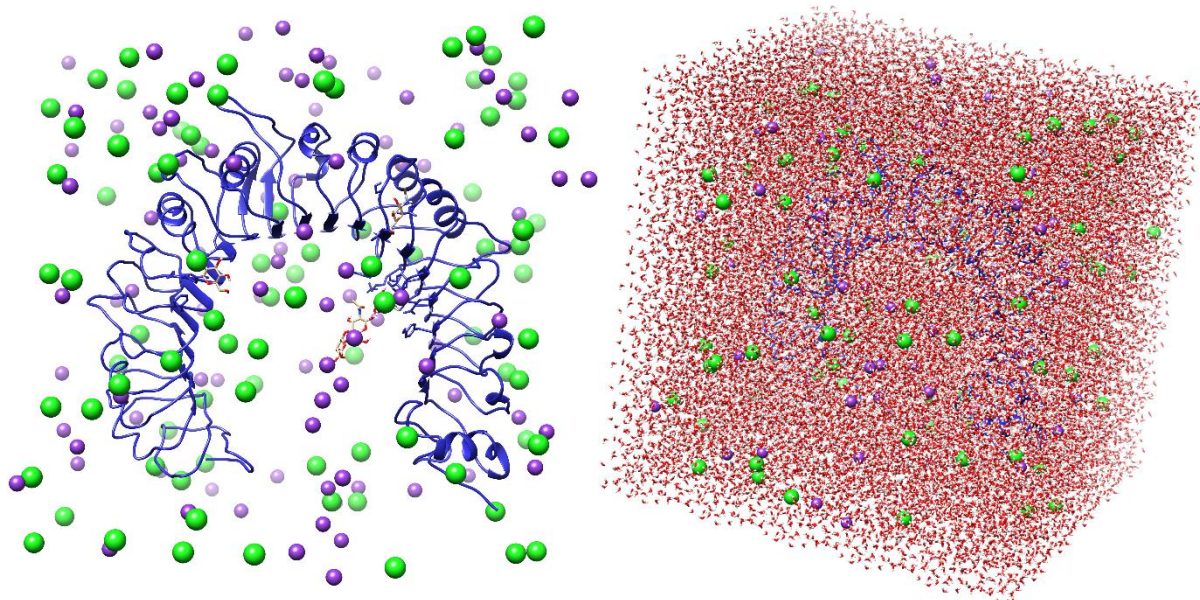
3.1 Priprava sistemov s spletnim strežnikom CHARMM-GUI

Iz podatkovne baze PDB smo izbrali vnos proteina z oznako PDB ID: 2z7x. Nato smo na spletnem strežniku CHARMM-GUI pripravili nemutiran sistem, kjer smo imeli divji tip proteina TLR2, kar pomeni, da je bila aminokislina s številko 411 treonin, ter mutiran sistem, kjer smo imeli na mestu 411 namesto treonina izoleucin, kar je predstavljalo našo mutacijo.

Oba sistema (proteina) smo postavili v vodno okolje. To je pomemben korak, saj želimo, da se izračuni ne izvajajo v vakuumu, saj to ni skladno z naravo. Vsak sistem je vseboval vodno kocko s stranico v velikosti 103 Å, kar znaša 10,3 nm ali 1.03×10^{-8} m.

Za uspešno izvedbo simulacij smo potrebovali nevtralen sistem v bioloških pogojih, kakršni so v človeških celicah. Zato smo v naša sistema dodali tudi protiione. Ker smo pripravljali okolje, kakršno se nahaja znotraj celice, smo biološke pogoje dosegali z dodajanjem kalijevih in kloridnih ionov. V sistem smo dodali 88 kalijevih in 88 kloridnih ionov, da smo dosegli 0,15 M raztopino, kakršna je prisotna v celici. Nevtralnost sistema smo prav tako dosegli z dodatkom

ionov. Ker ima protein negativni skupni naboj, smo v sistem dodali še 5 kalijevih ionov. Število protiionov v sistemu je odvisno od velikosti vodne kocke in skupnega naboja v proteinu. Slika 5 prikazuje pripravljen sistem.



Slika 5. Sistem, pripravljen za simulacije molekulske dinamike. Z modro je predstavljen protein, zeleno so kloridni ioni, vijolično kalijevi ioni, rjavi pa so naravno prisotni kofaktorji. Levo je predstavljena vodna kocka s proteinom in protiioni. (lastna slika)

3.2 Izvedba simulacij molekulske dinamike s programom NAMD

Sistema brez in z mutacijo smo v drugem koraku pripravili za izvedbo simulacij molekulske dinamike s programom NAMD. Vhodne datoteke z vsemi potrebnimi parametri smo pridobili s CHARMM-GUI na podlagi naših zahtev, sami pa smo nato pripravili zagonske skripte, ki smo jih potrebovali, da smo lahko zagnali izračune. Simulacije molekulske dinamike smo za vsak sistem izvedli dvakrat, da smo lahko preverili ponovljivost rezultatov.

Najprej smo izvedli korak ekvilibracije oziroma priprave sistema. V koraku ekvilibracije se naš sistem proteina v vodni kocki pripravi za nadaljnje izračune. Priprava sistema je pomembna, saj se pripravi temperatura okolja, ki je pri nas znašala 310 K oziroma 37 °C. V tem koraku samo spremljamo, kako se celoten sistem giblje, ali prihaja do kakšnih velikih sprememb v proteinu, ki bi nakazovale na nepravilno pripravo podatkov za izvedbo simulacij, ipd. Je zelo pomemben korak pri pripravi sistemov, vendar rezultati niso primerni za primerjavo in analizo obnašanja proteina.

Najpomembnejši, najdaljši in računsko najzahtevnejši korak pa je produkcijski korak simulacij molekulske dinamike. V tem koraku smo pridobili veliko podatkov o položajih in premikih atomov, dolžinah vezi, ter o celotni strukturi proteina. V koraku produkcije lahko prav tako pridobimo podatke o spremembi energije sistema v odvisnosti od premikov atomov. V produkciji simulacij molekulske dinamike smo izvedli 100 zaporednih izračunov, vsak izračun nam je predstavljal 1 ns življenja našega sistema. Tako smo skupno pridobili 200 ns življenja enega sistema.

Simulacije molekulske dinamike predstavljajo računsko zelo zahtevne operacije. Da smo si olajšali delo in pohitrili izračune, smo pri svojem delu uporabili superračunalnik VEGA ("HPC Vega - IZUM, Maribor, Slovenia").

3.3 Analiza simulacij molekulske dinamike s programom VMD

Rezultate simulacij molekulske dinamike smo pregledali s programom VMD, ki nam omogoča vizualizacijo tako imenovanih trajektorij, 'slik' sistemov v odvisnosti od časa.

Najprej smo vizualno pregledali gibanje proteina med simulacijo, da smo se prepričali, da tekom simulacije ni prišlo do kakšne nepričakovane cepitve, izravnave proteina ali kakšne druge večje deformacije. Nato pa smo se osredotočili na tri glavne sklope rezultatov: RMSD in vodikove vezi. Pri analizi RMSD smo se osredotočili na tako imenovano 'hrbtenico' proteina, stranske skupine aminokislin smo zanemarili, saj so preveč fleksibilne, in nam ne pripomorejo k boljšemu vpogledu v obnašanje proteina tekom simulacije. Vodikove vezi pa smo analizirali v celotnem proteinu, pri čemer smo se osredotočili na unikatne primere, da smo izločili ponavljajoče se vezi, za lažjo analizo. Vsak sklop posebej nam ne daje dovolj dobrega vpogleda v dejanske razlike med sistemi, vendar pa lahko s kombinacijo vseh analiz pridobimo celokupno sliko, kako bi lahko mutacija vplivala na protein.

3.3.1 Premik korena povprečnih kvadratov (RMSD)

RMSD (*ang.* Root-Mean-Square Deviation) vrednost nam pove, kako se spreminja položaj atomov glede na začetni položaj v odvisnosti od časa. Večji kot je RMSD večji premiki atomov se dogajajo tekom simulacije. RMSD se računa po naslednji formuli:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n d_i^2}, \quad (1)$$

kjer n predstavlja število vseh parov ekvivalentnih atomov tekom simulacije, en atom iz para predstavlja referenčni položaj, d_i pa predstavlja razdaljo med dvema atomoma iz i -tega para izmed vseh n parov.

Z izračuni RMSD lahko zaznamo večje spremembe v celotni strukturi, kot je recimo razpad ali nastanek sekundarne strukture, odpiranje ali zapiranje mesta vezave zdravila ipd. V primeru visokih vrednosti RMSD moramo protein tekom simulacije vizualno pregledati, da vidimo, zakaj pride do tega (Kufareva and Abagyan 2012).

S pomočjo RMSD lahko tudi primerjamo vpliv mutacije oziroma spremembe aminokisline v proteinu, saj nam lahko ta vrednost pokaže, ali mutacija vpliva na strukturo. Na primer, če je aminokislina po mutaciji večja kot pred njo, je lahko vezavno mesto zaradi tega večje in omogoča vezavo več različnim zdravilom.

3.3.2 Analiza vodikovih vezi

Vodikove vezi so pomemben faktor, ki nam pove, kako stabilen je protein. Vodikove vezi so prav tako pomemben faktor pri zvijanju proteina v sekundarne in terciarne strukture.

V simulacijah molekulske dinamike se spremlja število vodikovih vezi v celotnem proteinu v odvisnosti od časa. Več je vodikovih vezi, bolj je protein kompakten, manj je vodikovih vezi, bolj je protein razvejan ali iztegnjen (Hubbard and Kamran Haider 2010).

Pri analizi vodikovih vezi v proteinu z mutacijo lahko raziskujemo, ali ta mutacija povzroči, da se tvori več ali manj vodikovih vezi, in iz tega sklepamo o celokupni stabilnosti proteina.

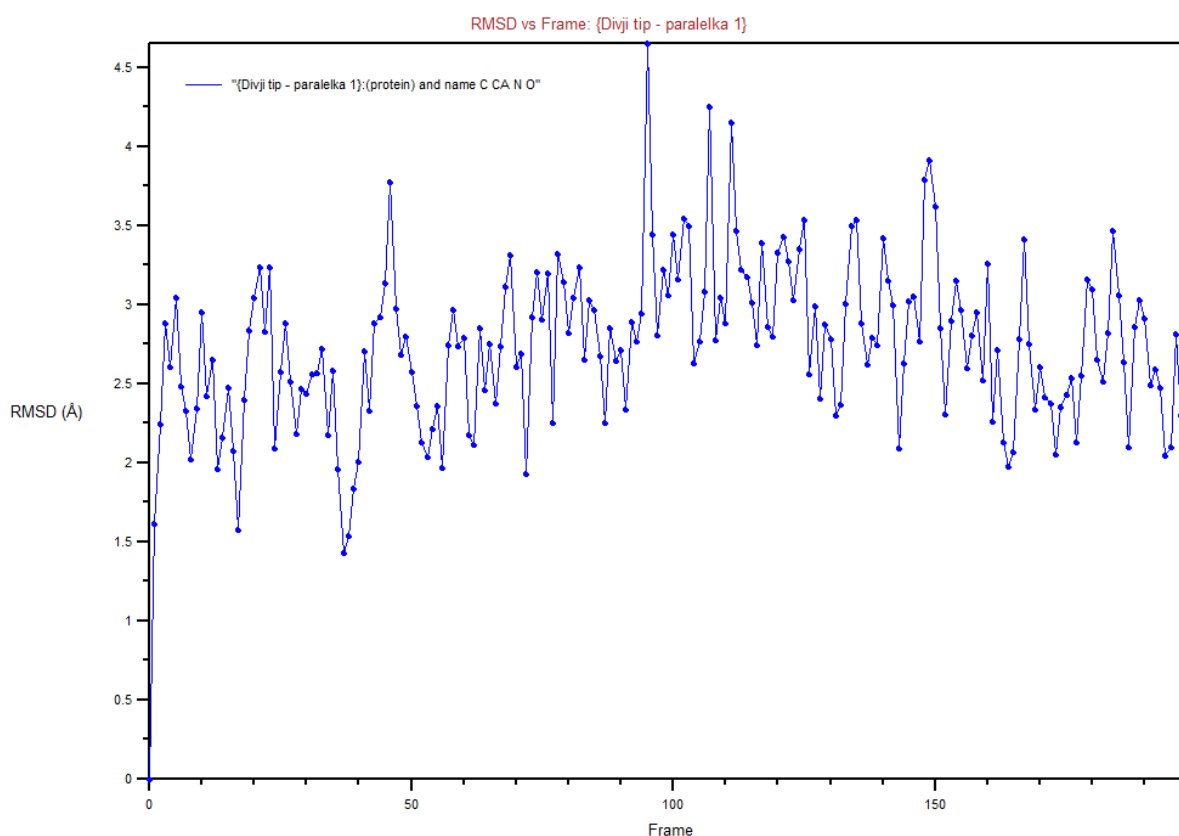
4 REZULTATI IN DISKUSIJA

V raziskovalni nalogi smo se osredotočili na mutacijo enega nukleotida (SNP) na DNK, kjer se citozin spremeni v timin, kako se ta mutacija nato izrazi kot sprememba aminokisline treonin na mestu 411 v izolevcin v proteinu ter kako ta sprememba vpliva na strukturo in stabilnost proteina TLR2, ki sodeluje v celičnem imunskem odzivu. Z vizualizacijo molekulske dinamike smo opazovali razlike v gibanju dveh proteinov, razlike v vodikovih vezeh ter razlike v strukturi proteina.

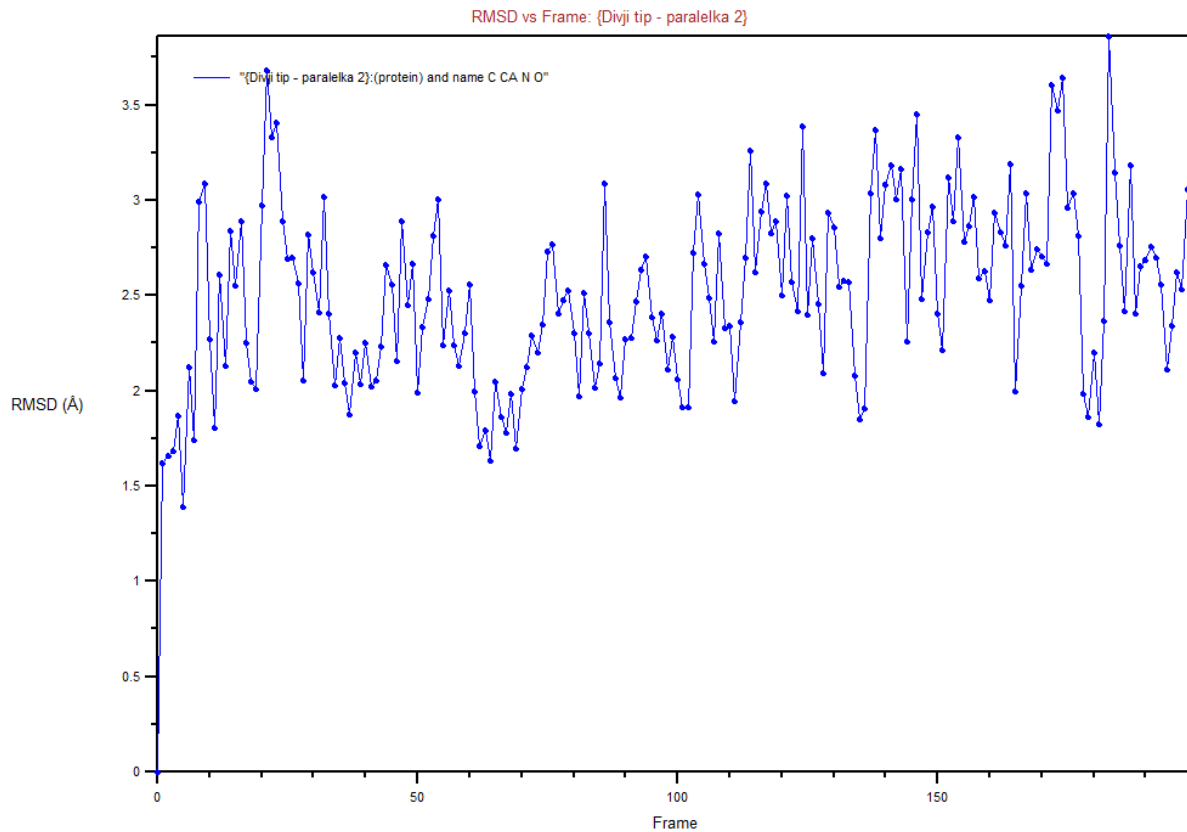
Ker se treonin in izolevcin razlikujeta v molekulskih strukturah, smo že vnaprej predvidevali, da bi lahko v proteinih prišlo do različnega števila vodikovih vezi. Izolevcin zaradi svoje hidrofobne stranske verige v teoriji tvori manj vodikovih vezi kot treonin, ki ima polarno

stransko verigo z alkoholno funkcionalno skupino. Prav tako smo zaradi dodatne CH₃- skupine v aminokislini izolevcin, ki mu podaljša stransko verigo, predvidevali, da bo sprememba aminokislinske vplivala na celotno strukturo proteina.

V raziskavi smo se najprej osredotočili na izračune RMSD, s katerimi smo raziskovali spremembo v strukturi proteina pred in po mutaciji. Obe vzporedni simulaciji, ti. paralelki, za nemutiran protein tvorita dokaj enakomerno razporeditev vrednosti RMSD, s povprečjem približno 2,5 (sliki 6 in 7). Anomalija je le v grafu prve paralelke osnovnega proteina, kjer RMSD faktor skoči na okoli 4,75. To se zgodi okoli petindevetdesete nanosekunde. Enakomerna razporeditev vrednosti na grafu torej nakazuje na rigidnost proteina, kljub enemu odstopanju med simulacijo.

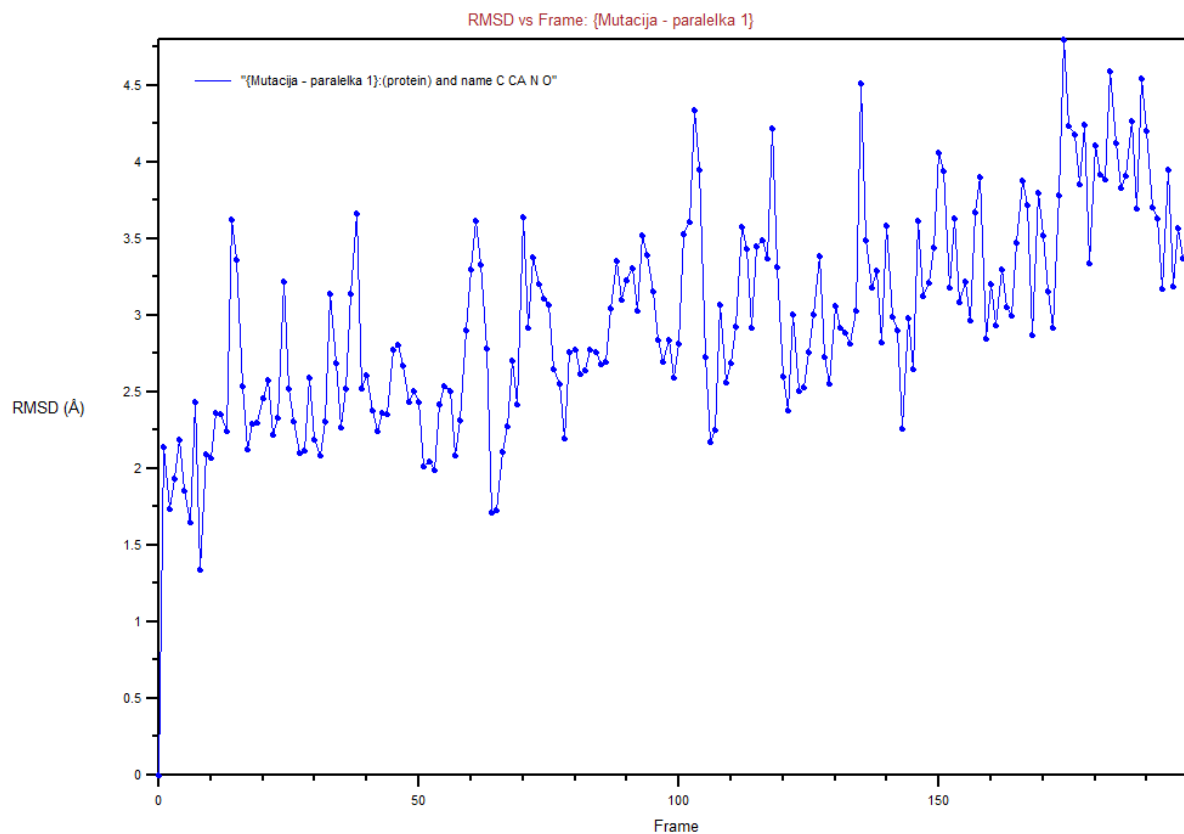


Slika 6. Prikaz RMSD vrednosti za divji tip proteina, prva paralelka. Frames predstavlja število posameznih položajev sistema tekom simulacije. 200 slik (frames) sovpada s 100 ns simulacije. (lastna slika)

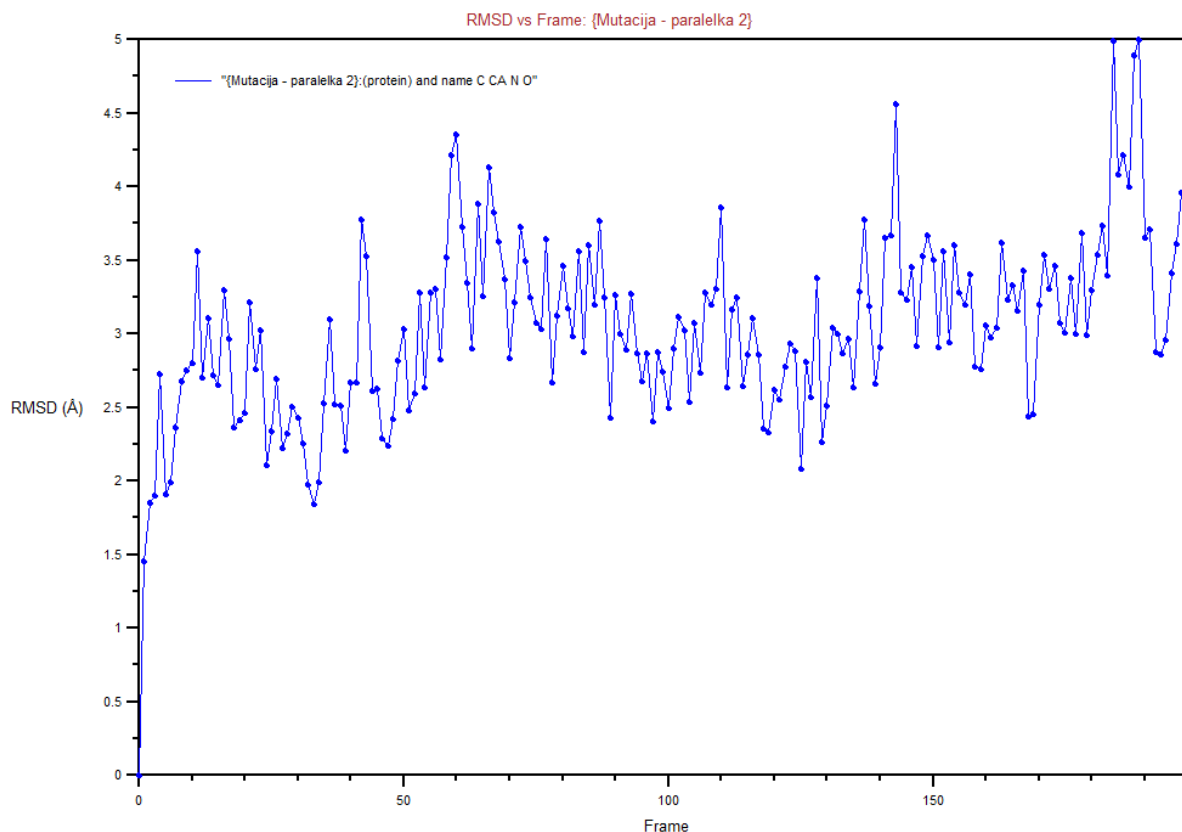


Slika 7. Prikaz RMSD vrednosti za divji tip proteina, druga paralelka. Frames predstavlja število posameznih položajev sistema tekom simulacije. 200 slik (frames) sovpada s 100 ns simulacije. (lastna slika)

Enako pa ne moremo zapisati za grafa simulacij mutiranega proteina, saj RMSD vrednost postopoma narašča (sliki 8 in 9). Iz tega lahko predvidevamo, da mutiran protein počasi izgublja osnovno obliko.



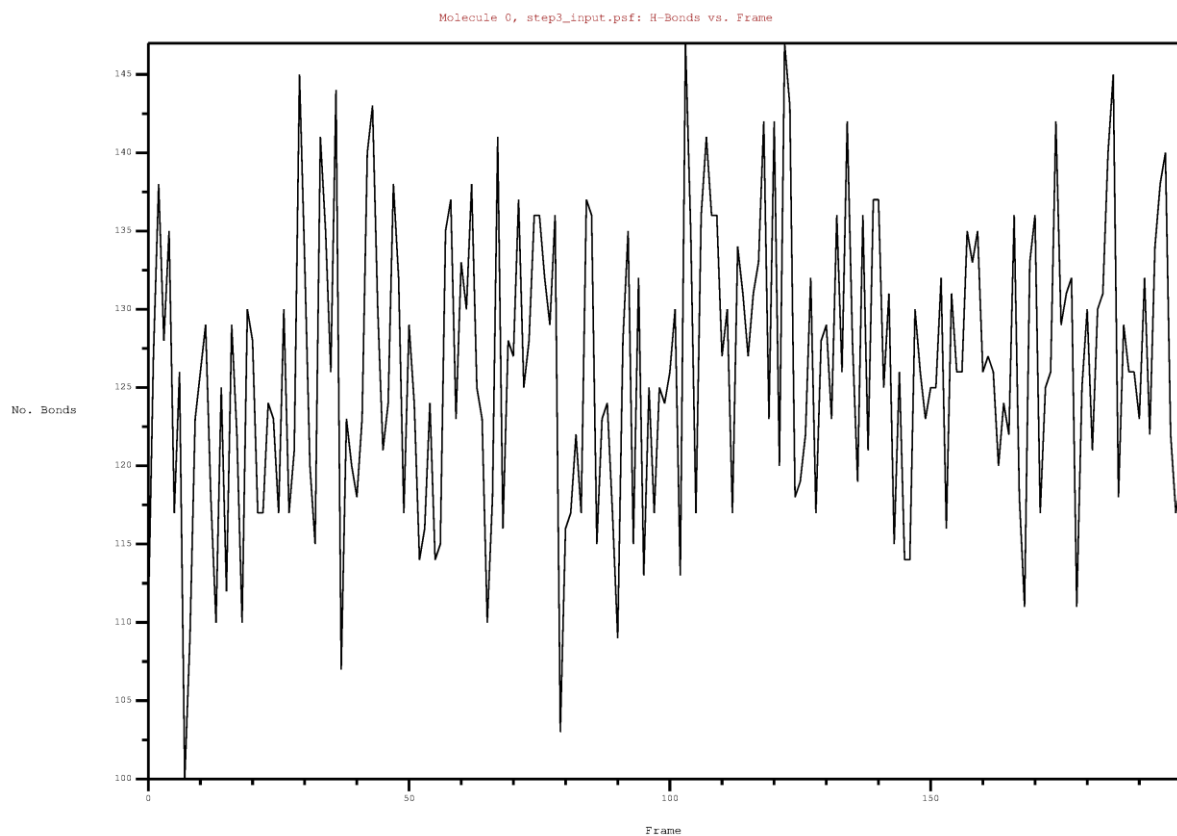
Slika 8. Prikaz RMSD vrednosti za mutiran protein, prva paralelka. Frames predstavlja število posameznih položajev sistema tekom simulacije. 200 slik (frames) sovpada s 100 ns simulacije. (lastna slika)



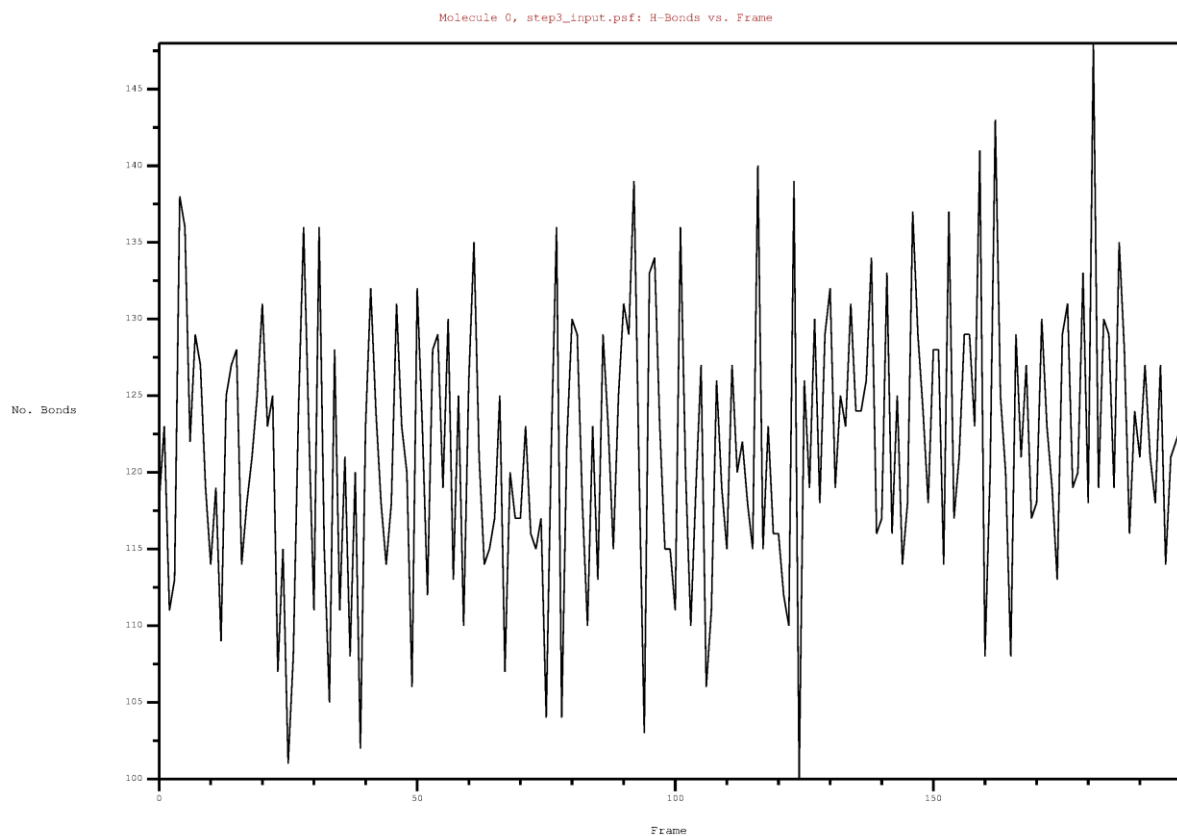
Slika 9. Prikaz RMSD vrednosti za mutiran protein, druga paralelka. Frames predstavlja število posameznih položajev sistema tekom simulacije. 200 slik (frames) sovpada s 100 ns simulacije. (lastna slika)

Če primerjamo RMSD grafe simulacij molekulske dinamike med seboj, se s časom opazi vedno večje odstopanje mutiranega proteina od osnovnega. V primeru nadaljevanja takšnega trenda naraščanja vrednosti RMSD pri mutiranem proteinu lahko sklepamo o znatnem povečanju fleksibilnosti proteina, kar lahko posledično vodi v poškodbo ali/in nefunkcionalnost proteina.

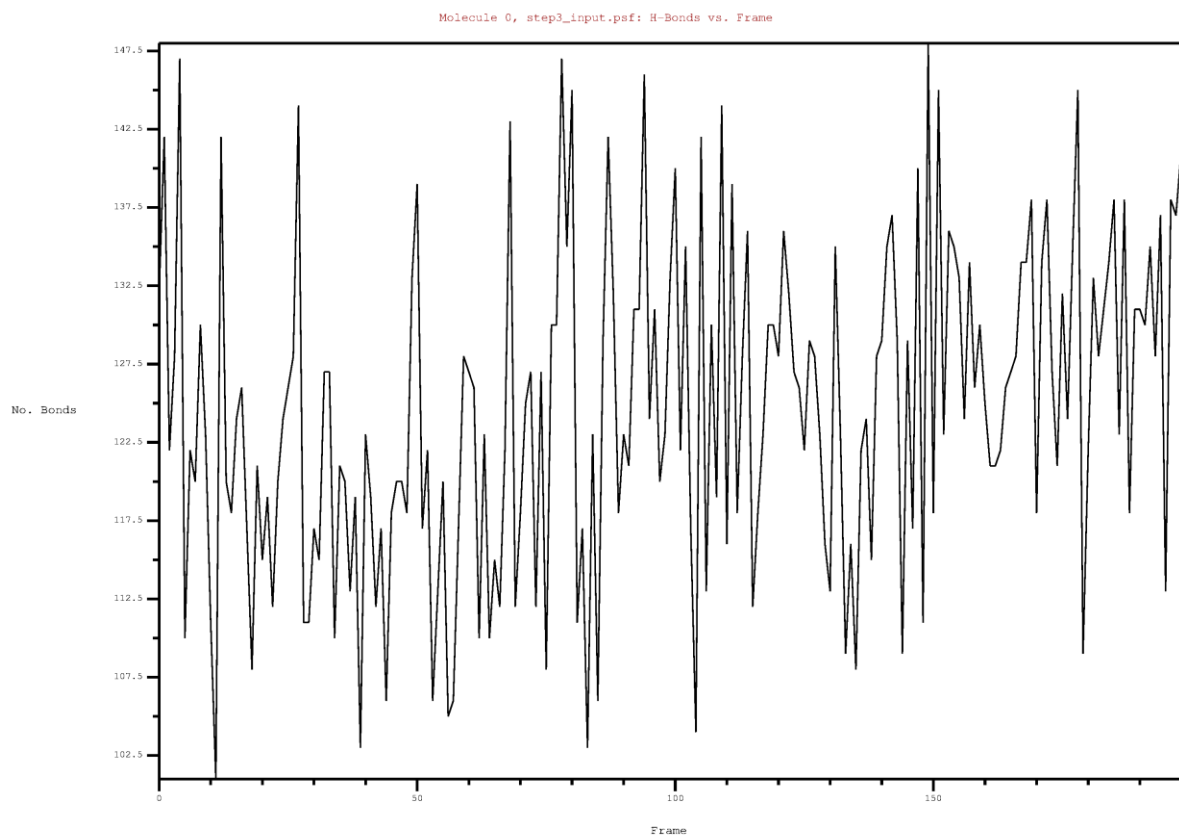
Ker pa RMSD vrednosti ne povejo dovolj o stabilnosti samega proteina, smo se osredotočili tudi na vodikove vezi, ki so v času simulacij v sistemu nastajale ali so razpadale. Število vodikovih vezi je odvisno od časovne komponente. V nekem trenutku lahko ima beljakovina manj vodikovih vezi kot na začetku, nato pa spet več. To je odvisno od trenutne oblike proteina, saj se vodikova vez tvori samo takrat, ko sta si ustrezna elementa dovolj blizu. Stabilnost vodikove vezi pa beležimo glede na odstotek prisotnosti med simulacijo. Na slikah 10–13 lahko vidimo, kako se število vseh vodikovih vezi spreminja v času simulacije za nemutiran in mutiran protein.



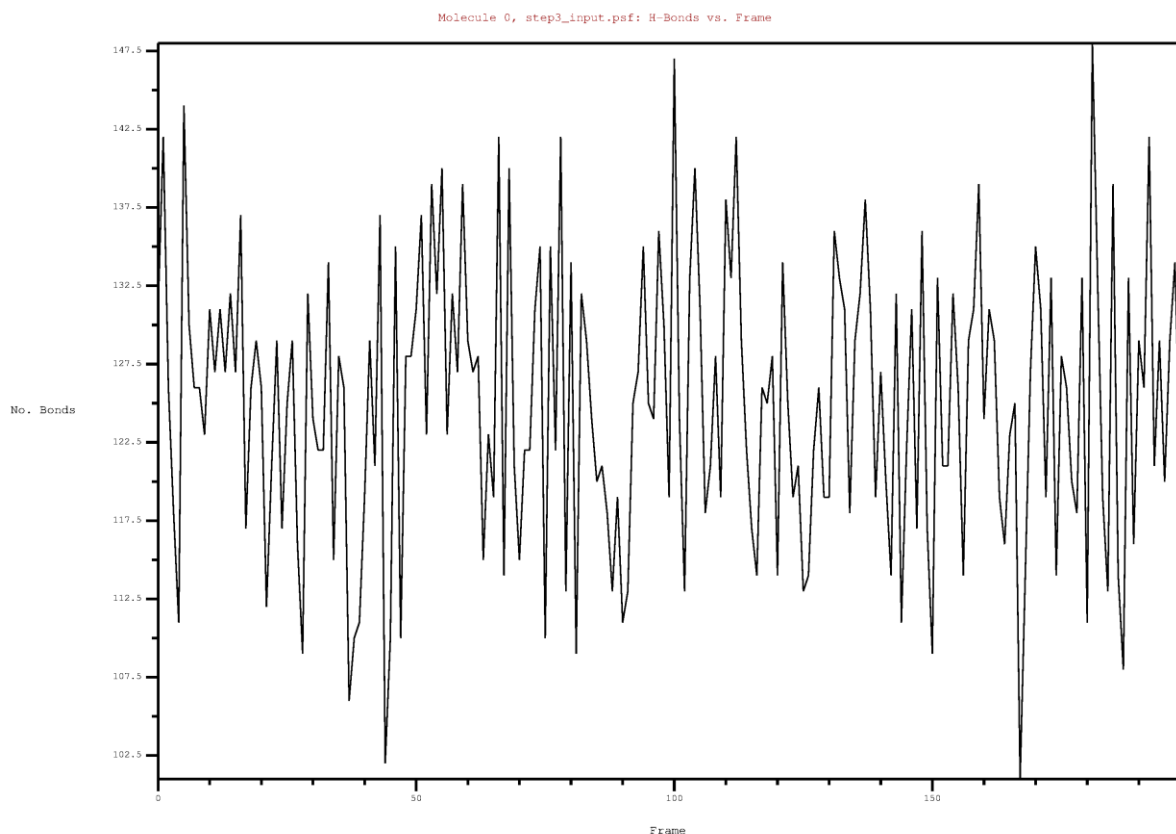
Slika 10. Prikaz števila vodikovih vezi za divji tip proteina, prva paralelka. Frames predstavlja število posameznih položajev sistema tekom simulacije. 200 slik (frames) sovpada s 100 ns simulacije. (lastna slika)



Slika 11. Prikaz števila vodikovih vezi za divji tip proteina, druga paralelka. Frames predstavlja število posameznih položajev sistema tekom simulacije. 200 slik (frames) sovpada s 100 ns simulacije. (lastna slika)



Slika 12. Prikaz števila vodikovih vezi za mutiran protein, prva paralelka. Frames predstavlja število posameznih položajev sistema tekom simulacije. 200 slik (frames) sovpada s 100 ns simulacije. (lastna slika)



Slika 13. Prikaz števila vodikovih vezi za mutiran protein, druga paralelka. Frames predstavlja število posameznih položajev sistema tekom simulacije. 200 slik (frames) sovpada s 100 ns simulacije. (lastna slika)

Aminokislina treonin v nemutiranem proteinu je v prvi paralelki tvorila pet vezi, med njimi je bila najstabilnejša prisotna 11,50 % vsega časa simulacije, druga najstabilnejša pa ima prisotnost 3 %. V drugi paralelki se je tvorilo sedem vodikovih vezi, v katerih je sodelovala preiskovana aminokislina. Med njimi najstabilnejša je bila prisotna 13 % časa simulacije. Aminokislina izolevcin na mutiranem proteinu pa je med prvo paralelko tvorila eno vodikovo vez, in sicer z 1,50-% prisotnostjo vsega časa simulacije. V drugi paralelki se je prav tako tvorila le ena vodikova vez, v kateri je sodelovala raziskovana aminokislina, s prisotnostjo 0,50 % tekom celotne simulacije. Opazimo lahko, da je vez zelo nestabilna. To pomeni, da ima nemutiran protein več vodikovih vezi kot mutiran, zato se posledično manj giblje. To smo s simulacijo tudi dokazali. Gibanje mutanta pa je posledica manjšega števila tvorjenih vodikovih vezi. Ker je le-teh manj, je protein bolj agilen in se lahko bolj oddalji od svoje značilne U oblike. Sčasoma se lahko struktura tako zelo spremeni, da se izgubi glavni namen beljakovine, to

pomeni, da se izgubi funkcionalnost. Raziskava je pokazala manjše število vodikovih vezi v mutiranem proteinu, kar v teoriji pomeni, da bo mutant manj stabilen kot divji tip.

V začetku raziskave smo si postavili tri hipoteze. Prva in druga hipoteza trdita, da bomo s pomočjo simulacij molekulske dinamike uspešno določili razlike v strukturi in stabilnosti proteina, ki nastanejo zaradi mutacije aminokisline. Vrednosti RMSD v posameznem sistemu bodo pokazale razlike v strukturi med nemutiranim in mutiranim proteinom. Analiza vodikovih vezi v posameznem sistemu pa bo pokazala razlike med stabilnostjo nemutiranega in mutiranega proteina. Z rezultati, ki smo jih pridobili tekom raziskave, lahko uspešno potrdimo obe hipotezi, saj smo pokazali, da mutacija proteina vpliva na stabilnost in strukturo proteina.

Tretja hipoteza pa trdi da bomo dobljene rezultate uspešno povezali z že znanimi podatki o mutaciji in potencialnem vplivu na potek multiple skleroze. Iz literature (Ben-Ali et al. 2011) je znano, da naj bi ta mutacija delovala negativno na celoten protein in posledično na odziv imunskega sistema. Mi smo tekom raziskave pokazali, da je mutiran protein manj stabilen in da se njegova struktura veliko bolj spreminja, kot pri nemutiranim proteinu, kar lahko povzroči delno ali popolno izgubo funkcionalnosti. Tako smo potrdili tudi tretjo hipotezo.

S temi rezultati lahko trdimo, da smo s pristopom simulacij molekulske dinamike uspešno pokazali, kako lahko specifične mutacije vplivajo na strukturo in stabilnost proteina, kar predstavlja obetavne pogoje za nadaljnje raziskave na temo mutacij v DNK, mutacij v proteinih in potencialnega vpliva na razvoj in potek bolezni.

5 ZAKLJUČEK

Glavni cilj raziskovanja je bil uspešno izvesti štiri simulacije molekulske dinamike za dva sistema. Za vsak sistem sta se izvedli dve paralelni simulaciji, da smo potrdili ponovljivost rezultatov. Podatke o poziciji molekul v proteinu smo črpali iz PDB (Protein Data Bank) ter jih vnesli v spletni strežnik CHARMM-GUI. Dobljene datoteke smo pripravili za ekvilibracijo. Ob koncu ekvilibracije smo datoteke naložili na superračunalnik Vega ter jih pripravili za simulacije. Po končanih simulacijah smo iz Vege prenesli datoteke in jih pregledali v računalniškem programu VMD. Analizirali smo grafe RMSD in grafe števila vodikovih vezi v odvisnosti od časa. S tem smo potrdili prvo in drugo hipotezo, ki pravita, da bomo s pomočjo simulacij molekulske dinamike in analizo RMSD ter vodikovih vezi uspešno določili razlike v strukturi proteina, ki nastanejo zaradi mutacije. Vrednosti RMSD in vodikove vezi v posameznem sistemu so pokazale razliko med nemutiranim in mutiranim proteinom, saj so se jasno videle razlike v RMSD analizi in v tvorjenih vodikovih vezeh pri izbranih aminokislinah – treonin jih je tvoril več in bolj stabilne, izolevcin pa je tvoril le eno, manj stabilno vodikovo vez.

Tudi tretjo hipotezo, ki pravi, da bomo dobljene rezultate uspešno povezali z že znanimi podatki o mutaciji in potencialnem vplivu na potek multiple skleroze ter s pomočjo rezultatov prikazali, zakaj mutacija vpliva na protein in posledično na potek bolezni, lahko potrdimo, saj smo pokazali, da se struktura in stabilnost proteina spremenita v odvisnosti od mutacije, kar bi lahko vodilo v delno ali popolno izgubo funkcionalnosti proteina. Ta raziskava predstavlja dober uvod v bolj natančne povezave med spremembo funkcionalnosti proteina in vplivom na potek multiple skleroze.

S to raziskavo smo hkrati potrdili relativno nov pristop k raziskovanju – računalniške simulacije molekulske dinamike. Tekom celotne raziskave nismo imeli resnejših težav z računalniškimi sistemi, tudi predvidevani končni rezultati so bili zadovoljivi. Na ta način lahko raziskujemo vplive takih mutacij tudi na še neraziskanih polimorfizmih.

Z našimi rezultati lahko ponudimo unikaten vpogled v obnašanje proteina, ki ga narekuje sprememba aminokisline in lahko pomagamo razložiti, zakaj ima mutacija takšen ali drugačen vpliv na sam protein in posledično na potek bolezni.

6 DRUŽBENA ODGOVORNOST, TRAJNOST, NAPREDEK

Kronične in avtoimunske bolezni so v današnji družbi vedno bolj pogoste. Primer take bolezni je multipla skleroza, ki je težka kronična avtoimunska bolezen, za katero ni zdravila. Vzroka še ne poznamo, prav tako zaenkrat še ne moremo vnaprej napovedovati možnosti nastanka pri posameznem človeku.

Raziskave mutacij v genih in posledično proteinih, ki sodelujejo v bioloških procesih pri multipli sklerozi, so zato zelo pomembne, saj bi lahko na tak način ugotovili, kateri procesi v telesu so glavni za nastanek bolezni.

Primer je lahko mutacija v tej raziskovalni nalogi. Zanje se sicer ve, da sodeluje v imunskem odzivu in ima nek dolgoročni vpliv. Vendar pa je pomembno raziskati, zakaj se protein z mutacijo obnaša drugače kot tisti brez mutacije. In prav simulacije molekulske dinamike lahko ponudijo edinstven in predvsem drugačen vpogled kot eksperimenti ter ponudijo nove možnosti raziskovanja.

7 VIRI IN LITERATURA

- Arunan, Elangannan, Gautam R. Desiraju, Roger A. Klein, Joanna Sadlej, Steve Scheiner, Ibon Alkorta, David C. Clary, et al. 2011. "Definition of the hydrogen bond (IUPAC Recommendations 2011)." *Pure and Applied Chemistry* 83 (8): 1637–41. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-01-02>.
- Ben-Ali, Meriem, Beatrice Corre, J  r  my Manry, Luis B. Barreiro, H  l  ne Quach, Michele Boniotto, Sandra Pellegrini, and Llu  s Quintana-Murci. 2011. "Functional Characterization of Naturally Occurring Genetic Variants in the Human TLR1-2-6 Gene Family." *Human Mutation* 32 (6): 643–52. <https://doi.org/10.1002/humu.21486>.
- Fujiwara, Yuko, Daniel A. Osborne, Michelle D. Walker, De-an Wang, Debra A. Bautista, Karoly Liliom, James R. Van Brocklyn, Abby L. Parrill, and Gabor Tigyi. 2007. "Identification of the Hydrophobic Ligand Binding Pocket of the S1P1 Receptor *." *Journal of Biological Chemistry* 282 (4): 2374–85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609648200>.
- "HPC Vega - IZUM, Maribor, Slovenia." n.d. Accessed February 14, 2024. <https://si-doc.vega.izum.si/>.
- Hubbard, Roderick E, and Muhammad Kamran Haider. 2010. "Hydrogen Bonds in Proteins: Role and Strength." In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003011.pub2>.
- Humphrey, William, Andrew Dalke, and Klaus Schulten. 1996. "VMD: Visual Molecular Dynamics." *Journal of Molecular Graphics* 14 (1): 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- "Kaj je SNP?" 2022. GOVEDO.si. December 9, 2022. <https://www.govedo.si/kaj-je-snp/>.
- Kufareva, Irina, and Ruben Abagyan. 2012. "Methods of Protein Structure Comparison." In *Homology Modeling: Methods and Protocols*, edited by Andrew J. W. Orry and Ruben Abagyan, 231–57. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6_10.
- Liu, Ting, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, and Shao-Cong Sun. 2017. "NF-  B Signaling in Inflammation." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
- Merx, Sabine, Michael Neumaier, Hermann Wagner, Carsten J. Kirschning, and Parviz Ahmad-Nejad. 2007. "Characterization and Investigation of Single Nucleotide Polymorphisms

- and a Novel TLR2 Mutation in the Human TLR2 Gene.” *Human Molecular Genetics* 16 (10): 1225–32. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm070>.
- Miranda-Hernandez, Socorro, and Alan G Baxter. 2013. “Role of Toll-like Receptors in Multiple Sclerosis.” *American Journal of Clinical and Experimental Immunology* 2 (1): 75–93.
- “Moja MS | Multipla Skleroza.” n.d. Accessed February 14, 2024. https://www.mojams.si/?gad_source=1.
- Phillips, James C., David J. Hardy, Julio D. C. Maia, John E. Stone, João V. Ribeiro, Rafael C. Bernardi, Ronak Buch, et al. 2020. “Scalable Molecular Dynamics on CPU and GPU Architectures with NAMD.” *The Journal of Chemical Physics* 153 (4): 044130. <https://doi.org/10.1063/5.0014475>.
- Smrdu, Andrej. 2009. *Kemija, Snov in Spremembe 3: Učbenik Za Kemijo v 3. Letniku Gimnazije*. Svet Kemije. Ljubljana: Jutro. <https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/267853824>.
- Tomažič, Iztok, Primož Zidar, Jasna Dolenc Koce, and Jerneja Ambrožič. 2018. *Biologija 1: O Biologiji, Celicah in Genetiki: Učbenik Za Biologijo v Gimnazijah in Srednjih Strokovnih Šolah*. 1. ponatis. Ljubljana: Mladinska knjiga. <https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/295374592>.