

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2014/78



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	Z1-4071
Naslov projekta	Strukturna razlaga visokega dviga encimske aktivnosti sekretornih fosfolipaz A2 v kompleksu s kalmodulinom z NMR visoke ločljivosti.
Vodja projekta	25628 Lidija Kovačič
Tip projekta	Z Podoktorski projekt
Obseg raziskovalnih ur	3400
Cenovni razred	A
Trajanje projekta	07.2011 - 06.2013
Nosilna raziskovalna organizacija	106 Institut "Jožef Stefan"
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	1 NARAVOSLOVJE 1.05 Biokemija in molekularna biologija
Družbeno-ekonomski cilj	13.01 Naravoslovne vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	1 Naravoslovne vede 1.04 Kemija

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

2. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Sekretorne fosfolipaze A₂ (sPLA₂) so fosfolipolitični encimi, katerih encimska aktivnost je udeležena v številnih patofizioloških procesih pri sesalcih, kot so vrojena imunost, ateroskleroza, vnetne bolezni, rast celic, pri apoptoza, odstranjevanje poškodovanih celic, raku, sindromu akutne dihalne stiske, endotoksičnimi šok, sproščanje nevrotransmitterja, nevirtoogeneza, embriogeneza, bolečina, ishemija in Alzheimerjeva bolezen. Očitno je, da je natančna regulacija delovanja teh encimov zelo pomembna za naše zdravje. Amoditoksin (Atx), nevrotoksična sPLA₂ iz skupine IIA, tvori visoko-afinitetni kompleks s citosolnim regulatornim proteinom kalmodulinom (CaM), kar vodi do stabilizacije strukture Atx v

kompleksu z CaM, povrhu pa toksin pridobi občutno višjo encimsko aktivnost. Na podlagi kartiranja interakcijske površine med molekulama in podatkov mutageneze Atx smo zgradili model kompleksa Atx-CaM. Na osnovi tega modela smo ugotovili, da CaM povzroči podobne učinke tudi v primeru njemu homolognih, fiziološko zelo pomembnih sesalskih encimov, sPLA₂ iz skupin V in X hu (sPLA₂-V in -X), kar nakazuje, da CaM sodeluje pri regulaciji fosfolipazne aktivnosti v živih celicah.

Da bi lahko nadalje analizirali vlogo CaM pri regulaciji encimske aktivnosti sPLA₂ v citosolu, smo okviru podoktorskega projekta s pomočjo NMR spektroskopijo visoke ločljivosti in s pomočjo biokemijskih metod študirali biofizikalne in biokemijske lastnosti nastanka kompleksa med CaM in AtxA ter hu sPLA₂-X. Naš cilj je bil izračun detajlne tridimenzionalne strukture kompleksa ter študija dinamičnih spremembah kompleksa na fosfolipidni membrani. V ta namen smo pripravili neoznačene in z ¹³C ter ¹⁵N izotopom označene proteine CaM, Atx in hu sPLA₂, preverili in potrdili njihovo aktivnost ter posneli njihove NMR spektre. NMR spektri z ¹³C in ¹⁵N izotopom označenega CaM v odsotnosti in prisotnosti sPLA₂ so bili izvrstne kvalitete.

Kljub intenzivnem iskanju pogojem pa nam ni uspelo pridobiti NMR spektre z ¹³C in ¹⁵N izotopom označene sPLA₂ v odsotnosti in prisotnosti CaM primerne kvalitete, kar nam je onemogočilo rešitev tridimenzionalne strukture sPLA₂-CaM kompleksa. Uspeli smo določiti aminokislinske preostanke CaM, ki sodelujejo v interakciji, in s tem potrdili predhodno postavljen model kompleksa. Na podlagi modeliranja in NMR rezultatov smo napovedali, da bo manjši interferirajoči peptid z imenom MLCKP (»Myosin Light Chain Kinase inhibitor Peptide) preprečil tvorbo kompleksa, kar smo nato eksperimentalno tudi pokazali. Znanje o interakcijski površini CaM v kompleksu s sPLA₂ in rezultati z MLCKP peptidom nam omogočajo usmerjeno načrtovanje mutant in drugih substanc, ki bodo nato služili pri raziskavah patofiziološkega pomena znotrajcelične aktivnosti sPLA₂ v sesalskih celicah, kar ima visok vpliv na izboljšanje človeškega zdravja pri zgoraj omenjenih boleznih.

ANG

Secretory phospholipases A2 (sPLA₂s) are phospholipid-hydrolysing enzymes, which enzymatic activity is implicated in numerous pathophysiological settings in mammals, for example innate immunity, atherosclerosis, inflammatory diseases, proliferation, apoptosis, removal of damaged cells, cancer, acute respiratory distress syndrome, endotoxic shock, neurotransmitter release, neuritogenesis, embryogenesis, pain, ischemia and Alzheimer's disease. Tight regulation of their enzymatic activity is therefore of a crucial importance. Ammodytoxin A (AtxA), a neurotoxic sPLA₂, a group IIA sPLA₂s, forms a high-affinity complex with cytosolic regulatory protein calmodulin (CaM), which leads to the substantial increase of its enzymatic activity under reducing, cytosol-like conditions. Based on mapping of the interaction site between Atx and CaM and Atx mutagenesis data we generated model of Atx-CaM complex. Based on this model we found that CaM induces similar effects also in the case of homologous, physiologically very important, mammalian enzymes, sPLA₂s of groups V and X (V- and X-sPLA₂s), from which we postulated the phospholipase activity-regulating function for CaM.

To enable further analysis of the role of CaM in regulation of intra-cytosolic enzyme activity of sPLA₂s, we studied the biophysical and biochemical properties of the complex formation between CaM and AtxA or X-sPLA₂ by high-resolution NMR spectroscopy and by several biochemical methods. Our main goal was to determine the detail three-dimensional structure of the sPLA₂-CaM complex and to study the dynamic changes of the complex on phospholipid membrane. For this purpose we prepared fully functional unlabeled and ¹⁵N and ¹³C labeled proteins of CaM, AtxA and X-sPLA₂s and acquired their NMR spectra, respectively. NMR spectra of ¹⁵N and ¹³C labeled CaM in absence and presence of both sPLA₂s were excellent quality. In spite of intense search for the conditions, we were not able to acquire NMR spectra of adequate qualities of ¹⁵N and ¹³C labeled sPLA₂s in absence and presence of both CaM, which enabled us to determine three-dimensional structure of the sPLA₂-CaM complex. However, we were able to determine the CaM amino acid residues that take part in the interaction surface and in this way we confirmed the previously build model. Based on the modeling and NMR results we predicted and then also experimentally confirmed that small interfering peptide known as Myosin Light Chain Kinase inhibitor Peptide (MLCKP) prevents formation of the complex. Knowledge of the CaM interaction surface with sPLA₂ site and results gain with MLCKP enables rational design of mutants and other substances to be used further in research on pathophysiological relevance

of the intracellular action of sPLA₂ molecules in mammalian cells, therefore, our results have high impact on improvement of human health.

3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

Sekretorne fosfolipaze A₂ (sPLA₂, EC 3.1.1.4) so relativno majhni (13-19 kDa), od Ca²⁺-odvisni, z disulfidi bogati encimi, ki katalizirajo hidrolizirajo *sn*-2 esterske vezi v molekulah glicerofosfolidov. Ti encimi so prisotni v številnih živalskih strupih in se različno izražajo v številnih živalskih organih in tkivih. Vpleteni so v številne patofiziološke procese, kot so prirojena imunska pomanjkljivost, ateroskleroza, vnetne bolezni, proliferacija celic, apoptoza, odstranjevanje poškodovanih celic, vpleteni pa so tudi v različne vrste raka. Z encimsko aktivnostjo so sPLA₂ neposredno vpletene v procese, kot so akutni dihalni sindrom, endotoksični šok, sproščanje nevrotoksinov, nevrotransmitorjev, nevrotoxiciteta, embriogeneza, bolečina, ishemija in Alzheimerjeva bolezen. Posledica njihove encimske aktivnosti je sproščanje arahidonske kisline iz celičnih fosfolipidov, ki je prekurzor številnih bioaktivnih lipofilnih molekul eikozanoidov, kamor prištevamo tudi prostaglandine in levkotriene. Natančna regulacija delovanja teh encimov je očitno zelo pomembna za njihovo pravilno fiziološko funkcijo. Nedavno so začeli razvijati potencialna zdravila, zasnovana na njihovi encimski aktivnosti.

Amoditoksin A (AtxA) je presinaptično nevrotoksična sPLA₂ iz kačjega strupa, ki je strukturno zelo podobna sesalskim sPLA₂ iz skupin II, V in X (hu sPLA₂-V in -X) in predstavlja dober model za študij mehanizma presinaptične nevrotoksičnosti. Natančnega molekulskega mehanizma njegovega nevrotoksičnega delovanja še ne poznamo, vemo pa, da je toksičnost AtxA posledica vezave na specifični receptor v živčnem končiču motoričnih nevronov in njegove encimske aktivnosti. Eden izmed visoko afinitetnih vezavnih proteinov je regulatorni citosolni protein kalmodulin (CaM). Mnogi dokazi naše skupine kažejo, da je ta interakcija udeležena v procesu nevrotoksičnosti Atx, kajti struktura Atx je v kompleksu z CaM stabilizirana v citosolnih pogojih in njegova encimska aktivnost povišana za kar 21-krat. CaM je imel enak učinek povišanja encimske aktivnosti tudi v primeru homolognih hu sPLA₂-V in -X. Mehanizem regulacije stabilnosti in encimske aktivnosti sPLA₂ v znotraj sesalskih celic s CaM je tako postal izjemno pomembna raziskovalna tema. Že vrsto let smo v naši skupini poskusili pridobiti kristale Atx-CaM kompleksa in določiti njegovo tridimenzionalno strukturo, a žal brez uspeha. Nedavno smo pripravili tridimenzionalni model kompleksa Atx-CaM, za kar smo uporabili rigidni protokol modeliranja kristalne strukture Ca²⁺-CaM z vezani ligandom. Nedavne NMR študije Ca²⁺-CaM v prosti obliki ali vezanega z ligandom kažejo na izredno dinamičnost tega proteina v obeh stanjih. Očitno, zaradi omejitev kristalografskih metod, v X-žarkovani kristalni strukturi Ca²⁺-CaM manjkajo podatki o dinamičnosti molekule, zato smo v tem projektu študirali nastanek kompleksa z NMR visoke ločljivosti. NMR je edina metoda, ki na atomskem nivoju lahko opiše strukturne, kinetične in dinamične spremembe obeh proteinov v kompleksu, celo v prisotnosti membrane. Za doseganje omenjenih ciljev smo sodelovali z NMR skupino z Univerze v Utrechtu, Nizozemska, ki je že rešila strukturo kompleksa med sPLA₂, njenim inhibitorjem in lipidno micelo ter NMR skupino na Kemijskem institutu v Ljubljani, Slovenija. Osnovni cilj predlaganega

projekta je bil razumevanje strukturnih vzrokov za aktivacijo Atx s CaM, kar je bila osnova za načrtovanje in preverjanje manjših peptidnih inhibitorjev, ki bi preprečili nastanek kompleksa znotraj celice.

V ta namen smo na Odseku za molekularne in biomedicinske znanosti, na Institutu Jožef Stefan, Ljubljani v prvi četrtini financiranja najprej pripravili ekspresijske vektorje, ki so vsebovali zapis za kalmodulin (CaM) s his-tagom in številne sPLA₂ v obliki fuzije s kratkim peptidom na N-koncu. Optimizirali smo ekspresije rekombinantnih proteinov AtxA, CaM, hu sPLA₂-V in -X ter njihovih encimsko neaktivnih mutant v bogatem mediju, ter ekspresije AtxA, sPLA₂-X in CaM v minimalnem ¹³C ter s ¹⁵N izotopom označenim mediju. Optimizacijo smo dosegli z uporabo nekoliko modificiranega avto-indukcijskega medija. Dejstvo, da CaM ne samo zaščiti strukturo sPLA₂ v redukcijskih pogojih ampak ji tudi popolnoma povrne encimsko aktivnost delno reducirani sPLA₂, nas je vodilo v raziskovalno hipotezo, da lahko CaM pripomore k pravilnem zvijanju sPLA₂ tekom renaturacije, kar se je izkazalo za pravilno. Z dodatkom CaM v renaturacijsko mešanico smo uspeli izboljšati renaturacijo za kar 100-krat, ter tako realizirali našo raziskovalno hipotezo. Renaturacija je uspela celo v primeru encimsko neaktivnih mutant sPLA₂s, ki se po klasičnem postopku ne zvijejo v pravilno strukturo. Pripravili smo dobrih 150 mg neoznačenega in s ¹³C ter s ¹⁵N izotopoma označenega CaM. Funkcionalnost pripravljenega CaM smo potrdili z masno spektroskopijo, z N-terminalno aminokislinsko sekvenco, z vezavo na naravni ¹²⁵I-AtxC ter s sulfo-SBED-AtxC, z vezavo na imobilizirani naravni AtxA na nosilec s pomočjo površinske plazmonske rezonance in z meritvam povišanja sPLA₂ encimske aktivnosti. Pripravili smo tudi 10 mg AtxA, 20 mg ¹³C in ¹⁵N izotopsko označenega AtxA, 10 mg hu sPLA₂-X, 20 mg ¹³C in ¹⁵N označene hu sPLA₂-X. Vse oblike rekombinantnih sPLA₂ smo karakterizirali z masno spektroskopijo, z določitvijo N-terminalnega aminokislinskega zaporedja, izpodrivanjem vezave na CaM z naravnim ¹²⁵IAtxC ter z meritvami vpliva CaM na encimsko aktivnost sPLA₂. Vsi proteini so bili funkcionalni in aktivni.

Prve NMR meritve izotopsko označenih AtxA in CaM smo izvedli na Kemijskem Institutu v Ljubljani. ¹⁵N HSQC spekter CaM je bil primerljiv spektru iz literature in iz spektra je bilo razvidno, da je CaM pravilno zvit. Nasprotno pa sta ¹⁵N HSQC spektra samega AtxA in AtxA-CaM kompleksa kazala na obstoj topnih agregatov. Preliminarni spektri so zadostovali, da smo uspeli pridobiti dodatna sredstva evropskega Bio-NMR FP7 projekta, s katerimi smo krili stroške potovanja na Univerzo v Utrechtu, Nizozemska, v NMR laboratorij prof. Rolfa Boelensa, pa tudi same NMR meritve. NMR je metoda, ki je zelo občutljiva na velikost proučevanega proteina in pojav visokomolekularnih topnih agregatov je onemogočil nadaljnje NMR meritve. Da bi preprečili pojav agregacije sPLA₂ v raztopini za NMR, smo izvedli test premika točke temperature razvijanja proteina v odvisnosti od pH pufru in dodatkov kot so soli, membran, detergentov, CaM in ozmoliti. Tako smo uspeli pridobiti za NMR primeren vzorec kompleksa AtxA-CaM, kjer je bil le CaM ¹³C in ¹⁵N izotopsko označen, ne pa tudi obratno. Na Univerzi v Utrechtu smo posneli ¹⁵N in ¹³C HSQC, CBCACONH, HNCACB, CNCO in HNCOCACB NMR spektre ¹³C in ¹⁵N označenega CaM v odsotnosti in prisotnosti neoznačenega Atx in hu sPLA₂-X. Pridobljeni spektri so visoke kvalitete in so omogočili asignacijo CaM v odsotnosti in prisotnosti sPLA₂. Polovico spektrov CaM v odsotnosti in prisotnosti neoznačeni sPLA₂ smo že uspešno asignirali. Vzoredno smo v Utrechtu intenzivno poskušali najti pogoje, ki bi preprečili agregacijo sPLA₂, tudi s pomočjo NMR metode, a žal brez uspeha. Da bi pridobili informacijo o dinamičnih spremembah s strukturi CaM smo v Utrechtu izvedli poskus motnje kemijskega premika (»Chemical Shift Perturbations - CSP), ki je omogočil zasledovanje spremembe kemijskega okolja med titracijo neoznačenega AtxA in hu sPLA₂-X v vzorec z izotopsko

označenim CaM. Ker CSP metoda ni omogočila jasne identifikacije interakcijske površine verjetno zaradi nastanka agregatov, smo v vzorcih izotopsko označenega CaM, v odsotnosti in prisotnosti $sPLA_2$, izvedli tudi metodo dvigov paramagnetne relaksacije (»Paramagnetic Relaxation Enhancements - PREs) z uporabo Gd^{3+} paramagnetne sonde. Po primerjavi spektrov smo določili interakcijsko površino CaM, ki je v kontaktu z AtxA in z hu $sPLA_2$ -X, ter na ta način eksperimentalno potrdili model interakcije CaM z različnimi $sPLA_2$, ki smo ga predlagali na osnovi molekularnega modeliranja. Orientacija CaM v predhodno zgrajenim modelom se je izkazala za pravilno in obe $sPLA_2$ se vežeta na enako vezavno mesto na CaM. Zaradi agregacije $sPLA_2$ nismo uspeli pridobiti informacije o orientaciji $sPLA_2$ v kompleksu. Na podlagi NMR rezultatov in eksperimentalnih rezultatov kartiranja interakcijske površine bomo z uporabo programa HADDOCK izboljšali trenutni model kompleksa. Žal pa celotne tridimenzionalne strukture kompleksa ne bomo mogli rešiti. S primerjavo NMR spektrov samega CaM ter CaM v kompleksu z obema $sPLA_2$ smo odkrili, da vezava $sPLA_2$ povzroči signifikantne spremembe CaM kemijskega premika, ki niso le posledica vezave $sPLA_2$ na CaM, temveč odražajo strukturno spremembo CaM. Za CaM je znano, da se veže le na točno določene strukturne elemente v proteinih, na tako imenovane kanonske motive. Obe $sPLA_2$ pa v svoji strukturi ne vsebujeta nobenega od znanih CaM-vezavnih motivov pa kljub temu vežeta na CaM z zelo visoko afiniteto. Naša hipoteza, da $sPLA_2$, da vsebujejo nov, še nedoločen motiv, se je izkazala za pravilno.

Na podlagi tridimenzionalne modela kompleksa in odkritjem CaM vezavnih preostankov smo napovedali, da bo manjši interferirajoči peptid z imenom MLCKP (»Myosin Light Chain Kinase inhibitor Peptide) preprečil tvorbo kompleksa. Struktura MLCKP-CaM kompleksa je znana in MLCKP se veže na podobno vezavno mesto na CaM kot obe $sPLA_2$. Z merjenjem encimske aktivnosti smo potrdili, da je MLCKP primeren interferirajoči peptid, ki je zelo uspešno preprečil dvig encimske aktivnosti AtxA in hu $sPLA_2$ -X ob dodatku CaM v že nM koncentraciji. S pomočjo površinske plazmonske rezonance smo pokazali, da MLCKP prepreči tvorbo $sPLA_2$ -CaM kompleksa ter tako dodatno ovrednotili naš postavljen model kompleksa.

MLCKP inhibitor predstavlja pomembno orodje za nadaljnje raziskave pomena dviga $sPLA_2$ encimske aktivnost v živih celicah, kot tudi za raziskavo patofizioloških procesov omenjenih zgoraj, ki so odvisni od fosfolipolitične aktivnosti toksičnih in, kar je celo bolj pomembno, sesalskih $sPLA_2$ s.

4. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

Poglavitni programski cilji podoktorskega projekta so bili doseženi v zastavljenem času, žal pa nam ni uspelo realizirati pridobitve vseh spektrov kompleksa primerne kakovosti, ki so potrebni za izračun tridimenzionalne strukture kompleksa v prisotnosti in odsotnosti membranske površine.

Kljub intenzivnemu iskanju pogojev nam ni uspelo pridobiti pogoje, kjer bi lahko pripravili vzorec topnega AtxA v raztopini visoke koncentracije in v monomerni obliki. Metoda NMR visoke ločljivosti je zelo občutljiva metoda, vendar je omejena na velikost molekule. Molekula AtxA je bila pri NMR primernih koncentracijah ($\sim 0,2$ mM) v obliki topnih agregatov s previsoko molekulsko maso. Dodatek CaM, soli, membran, detergentov ali ozmolitov žal ni preprečil tvorbe topnih agregatov. Topne agregate smo uspeli pretvoriti v dimerne molekule AtxA le z redčenjem vzorca pod koncentracijo nižje od 0.03 mM, ki pa je prenizka za pridobivanje več dimenzionalnih NMR spektrov. Da je molekula AtxA težavna za strukturne študije kaže tudi dejstvo, da je bilo potrebno celo dvajset let prizadevanj za kristalizacijo in za izračun njegove tridimenzionalne strukture.

5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁴

Načrtovani program podoktorskega projekta nismo bistveno spremenili. Zaradi nepredvidljivih

težav pri pripravi NMR vzorca AtxA, žal nismo uspeli pridobiti spektre primerne kvalitete $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ označenega samega AtxA ali v kompleksu z neoznačenim CaM. Slednje nam je onemogočilo pridobitev spektrov kompleksa, ki so potrebni za izračun strukture kompleksa. S pomočjo spektrov $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ označenega samega CaM in v kompleksu z neoznačenim Atx smo lahko predhodni model s strani CaM overili in ga bomo s programom HADDOCK še izboljšali.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	25010983	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Cys-Ph-TAHA
		ANG	Cys-Ph-TAHA
	Opis	SLO	Sintetizirali smo novo lantanovo probo CysPhTAHA z enojno tiolno reaktivno skupino za v namen paramagnetnega označevanja proteinov, ki proizvede NMR spekter le z enim setom pikov. Ta proba je vezana na ubikvitin inducirala visoke residualne dipolarne sklopke in tako imenovane »pseudo« premike kemijskih premikov, ki so bili enostavno merljivi in v skladu z znano strukturo proteina. Pokazali smo, da se lahko CysPhTAHA uporabi za označevanje tudi velikih proteinov, ki predstavljajo velik biokemijski izziv, kot je Lac represor v 90 kDa ternarnem kompleksu z DNA in inducerjem.
		ANG	We synthesized a new lanthanide single thiol reacting tag for the paramagnetic labelling of proteins, named CysPhTAHA, which gives NMR spectra with a single set of peaks. Bound to ubiquitin, it induced large residual dipolar couplings and pseudocontact shifts that could be measured easily and agreed very well with the protein structure. We show that CysPhTAHA can be used to label large proteins that are biochemically challenging such as the Lac repressor in a 90 kDa ternary complex with DNA and inducer.
	Objavljeno v	ESCOM; Journal of biomolecular NMR; 2011; Vol. 51, no. 3; str. 329-337; Impact Factor: 3.612; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.255; A': 1; WoS: CQ, XQ; Avtorji / Authors: Peters Fabian, Maestre-Martinez Mitcheell, Leonov Andrei, Kovačič Lidija, Becker Stefan, Boelens Rolf, Griesinger Christian	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
2.	COBISS ID	26807847	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO	Študija kompleksa med fosfolipazo A2 iz kačjega strupa ali človeško sekretorno fosfolipaze A2 in kalmodulinom s pomočjo NMR visoke ločljivosti.
		ANG	Study of complexes between a snake venom or human secreted phospholipase A2 and calmodulin by high-resolution NMR.
	Opis	SLO	V tem vabljenem predavanju so bili predstavljeni naši najnovejši rezultati o naravi sPLA2-CaM interakciji.
		ANG	In this invited lecture our recent results of the nature of sPLA2-CaM interaction, were presented.
	Objavljeno v	V: 3rd Bio-NMR Annual User Meeting, 10-13 June, 2013, Budapest. NMR and protein dynamics in structural biology. [S. l.: s. n.], 2013, str. 31.	
	Tipologija	1.06 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci (vabljen predavanje)	
3.	COBISS ID	36989189	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO	Študija kompleksa med fosfolipazo A2 iz kačjega strupa ali človeško sekretorno fosfolipaze A2 in kalmodulinom s pomočjo NMR visoke ločljivosti.

		ANG	Study of complexes between a snake venom or human secreted phospholipase A2 and calmodulin by high-resolution NMR.
	Opis	SLO	V obliki postra smo predstavili naše najnovejše rezultate o naravi sPLA2-CaM interakcije in inhibitor, ki prepreči nastanek kompleksa.
		ANG	On the poster our most recent results of the nature of sPLA2-CaM interaction and the inhibitor that prevents the interaction, were presented.
	Objavljeno v		10th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with International Participation, Ljubljana, Slovenia, September 15-18, 2013. PETAN, Toni (ur.), ŠPES, Aleš (ur.). Book of abstracts. Ljubljana: Slovenian Biochemical Society, 2013, str. 39.
	Tipologija		1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci
4.	COBISS ID	26286375	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO	NMR študija tvorbe kompleksa med fosfolipazo A2 in kalmodulinom.
		ANG	NMR study of the complex formation between secreted phospholipases A2 and calmodulin.
	Opis	SLO	V obliki postra smo na mednarodni konferenci predstavili naše prve NMR rezultate o naravi sPLA2-CaM interakcije.
		ANG	On the poster our first NMR results of the nature of sPLA2-CaM interaction, were presented.
	Objavljeno v		VODIŠKAR, Mateja (ur.), et al. 3rd Annual East-NMR User Meeting, Laško, Slovenia, November 13-16, 2012. Ljubljana: Slovenian NMR Centre, National Institute of Chemistry, 2012, str. 64.
	Tipologija		1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci
5.	COBISS ID	26953767	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Strukturni vpogled v LexAREcA interakcijo
		ANG	Structural insight into LexAREcA interaction
	Opis	SLO	V razvoju odpornosti bakterij na antibiotike je zelo pomemben bakterijski sistem SOS, v katerem igra ključno vlogo interakcija med eno verižno DNA (ssDNA) ter dvema proteinoma, RecA in LexA. Na osnovi eksperimentalnih podatkov smo postavili tridimenzionalni model kompleksa ssDNA-RecA-LexA, ki bo omogočil ciljan razvoj učinkovin za preprečevanje bakterijske odpornosti proti antibiotikom.
		ANG	Bacterial SOS response play crucial rule in the development of bacterial antibiotic resistance, where a key regulator is a complex formed between single stranded DNA (ssDNA) and two proteins, RecA and LexA. Based on the experimental data we constructed three-dimensional model of a ssDNA-RecA-LexA complex, which offers new possibilities to fight antibiotic resistance of bacteria.
	Objavljeno v		Oxford University Press; Nucleic acids research; 2013; Vol. 42, issue 21; str. 9901-9910; Impact Factor: 8.278; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.761; A': 1; WoS: CQ; Avtorji / Authors: Kovačič Lidija, Paulič Nejc, Leonardi Adrijana, Hodnik Vesna, Anderluh Gregor, Podlesek Zdravko, Žgur-Bertok Darja, Križaj Igor, Butala Matej
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

	Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID		Vir: vpis v poročilo

	Naslov	SLO	Deseto srečanje Slovenskega biokemijskega društva z mednarodno udeležbo, Ljubljana, Slovenija, september.
		ANG	10th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with International Participation, Ljubljana, Slovenia, September.
	Opis	SLO	Kot članica organizacijskega odbora smo organizirali Deseto srečanje Slovenskega biokemijskega društva z mednarodno udeležbo, Ljubljana, Slovenija, september. V ta namen sem pripravila internetno stran: http://bio.ijs.si/sbd2013/Organizatorji.html .
		ANG	As a member of the Organizing Committee we organized the 10th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with International Participation, Ljubljana, Slovenia, September. For that purpose I constructed internet site: http://bio.ijs.si/sbd2013/Organizatorji.html .
	Šifra	B.01 Organizator znanstvenega srečanja	
	Objavljeno v	http://bio.ijs.si/sbd2013/Organizatorji.html Slovenian Biochemical Society; Book of abstracts; 2013	
	Tipologija	3.13 Organiziranje znanstvenih in strokovnih sestankov	
2.	COBISS ID	25458215	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Protein - DNA interakcije
		ANG	Protein - DNA interactions
	Opis	SLO	Prepoznavanje specifičnih DNA zaporedij s proteini in povezava prepoznavne v signalne dogodke predstavljajo osnovne dogodke v celici, ki ležijo na koreninah številnih celičnih procesov. Zato študija interakcijskih procesov med proteini in DNA so izjemnega pomena ne le za bazično razumevanje molekularnih funkcij ampak tudi za racionalno načrtovanje potencialnih zdravil. V tem delu opisujemo trenutne zmožnosti študij protein-DNA interakcij z uporabo NMR metode ter številne dodatne tehnike, ki so lahko komplementarne NMR metodi.
		ANG	The recognition of specific DNA sequences by proteins and the coupling to signaling events are fundamental occurrences that lie at the root of many cellular processes. Therefore, the study of the interaction processes between proteins and DNA is of crucial importance not only for our basic understanding of molecular function, but also for a rational approach to drug design. Here, we describe our current capabilities for studying protein-DNA interactions using NMR spectroscopy, identify the challenges and limitations in the presently available NMR methodology, and address several additional techniques that could be complementary to the NMR results.
	Šifra	B.06 Drugo	
	Objavljeno v	Wiley-VCH; NMR of biomolecules; 2012; Str. 239-252; Avtorji / Authors: Kovačič Lidija, Boelens Rolf	
	Tipologija	1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji	
3.	COBISS ID	2847311	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Ključni igralci SOS odgovora kot tača antibiotikov
		ANG	Key players of the SOS response as a targets for anti-infectives
	Opis	SLO	Na pomembnem mednarodnem srečanju s prisotnostjo vodilnih farmacevtskih podjetij je bil predstavljen LexA-RecA* kompleks interakcije, ki omogoča nov pristop k boju proti bakterijskim okužbam.
		ANG	On the important international meeting with pharmaceutical enterprises participation, the LexA-RecA* complex of interaction, which offers new possibilities to fight antibiotic resistance of bacteria, was presented.

Šifra	B.04	Vabljen predavatelj
Objavljeno v	s. n.; Programme and abstracts; 2013; Str. [40]; Avtorji / Authors: Kovačič Lidija, Paulič Nejc, Leonardi Adrijana, Hodnik Vesna, Podlessek Zdravko, Žgur-Bertok Darja, Križaj Igor, Rupnik Maja, Hugl Linda, Matthews Ian, Busby Steve J. W., Butala Matej	
Tipologija	1.10	Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (vabljen predavatelj)

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁷

Financiranje tega podoktorskega projekta je omogočilo pripravo NMR vzorcev, kar je omogočilo pridobitev evropskih sredstev Bio-NMR FP7 projekta, ki je kril stroške potovanj in NMR meritve na Univerzi v Utrechtu, Nizozemska, v NMR laboratorij prof. Rolfa Boelensa. V Utrechtu sem poleg NMR znanja nadgradila tudi svoje znanje v uporabi programa HADDOCK, ki so ga razvili v Utrechtu. Financiranje tega projekta je tako omogočilo številne bogate diskusije z HADDOCK osebjem. To pridobljeno znanje sem s pomočjo Utrecht osebja nato uspešno uporabila pri raziskavi v sodelovanju z dr. Matejem Butalom iz Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Rezultat naše sodelave je bil zgrajen tridimenzionalni model kompleksa bakterijskega sistema SOS, ki omogoča ciljno načrtovanje substanc pri preprečevanju razvoja bakterijske odpornosti na antibiotike. Bakterijski sistem SOS predstavlja kompleks med eno verižno DNA (ssDNA) ter RecA in LexA proteinoma in na osnovi eksperimentalnih podatkov kartiranja interakcijske površine med omenjenimi molekulami smo z uporabo HADDOCK programa zgradili njihov model kompleksa. Za uspešno modeliranje sem potrebovala tudi znanje o protein-DNA interakcijah, znanje, ki je razvidno iz naše skupne objave z Utrecht skupino v poglavju o protein-DNA interakcijah v ugledni monografski publikaciji Wiley-VCH. Model ssDNA-RecA-LexA pa smo uspeli objaviti v obliki članka v zelo kvalitetni reviji (L. Kovačič in sod., *Nucleic Acids Research*, 41 (2013), 9901–9910), ki je bil bran že kar preko 1500 krat v manj kot pol leta od njegove objave. Rezultate smo v obliki vabljenih predavanj predstavili na številnih mednarodnih konferencah, kar je prejelo zanimanje tudi s strani farmacevtskih podjetij.

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

9.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

SPLA2s so encimi, ki so vpleteni v številne patofiziološke procese v sesalskih organizmih. Njihovo zunaj celično delovanje je bilo že detajlno raziskovano, medtem, ko so raziskave vnosa teh molekul v celico in njihovo delovanja v citosolu vse bolj v ospredje potem, ko smo in vitro dokazali relativno stabilnost teh encimov v citosolu-podobnih pogojih ter in vivo demonstrirali vezavo AtxA na CaM v citosolu nevronske celice. Odkritji stabilizacije in visokega dviga encimske aktivnosti s CaM pri AtxA in nekaterih človeških sPLA2 odkrivata možen nov način regulacije teh encimov. Poznavanje natančne interakcijske površine CaM v kompleksu s sPLA2 omogoča racionalno načrtovanje mutacij v molekuli CaM, kar je ključnega pomena za nadaljnje raziskave patofiziološkega pomena sPLA2 znotraj sesalskih celic. Znano je, da CaM intereagira s proteini preko točno določenih strukturnih elementov v proteinih, t.i. CaM-vezavnih motivov. S pomočjo NMR in modeliranja smo odkrili, da se sPLA2 veže na CaM z novim kanonskim CaM-vezavnim motivom, kar posledično privede do strukturnih sprememb v molekuli CaM, ki so drugačne, kot je do sedaj znano v literaturi za kanonske CaM-vezavne molekule. Naši rezultati omogočajo tako iskanje novih CaM-vezavnih molekul. Na podlagi rezultatov smo napovedali in tudi in-vitro preverili delovanje manjšega interferirajočega peptida z imenom MLCKP, ki je preprečil vezavo sPLA2 na CaM in posledično tudi dvig in stabilizacijo encimske aktivnosti sPLA2. Na podlagi tega peptida lahko v prihodnje načrtujemo nove učinkovine, ki predstavljajo nov načinov posredovanja in nadzora teh regulatornih poti v sesalskih celicah. Te molekule so izjemnega pomena za naše zdravje v procesih kot so so prirojena imunska pomanjkljivost, ateroskleroza, vnetne bolezni, proliferacija celic, apoptoza, odstranjevanje poškodovanih celic, rak, akutni

dihalni sindrom, endotoksični šok, sproščanje nevrottransmitorjev, nevritogeneza, embriogeneza, bolečina, ishemija in Alzheimerjeva bolezen.

ANG

sPLA2s are enzymes implicated in numerous pathophysiological processes in mammalian organisms. The extracellular actions of these enzymes have been extensively studied, while the studies of their cellular internalization and action in the cytosol is coming into the focus following our in vitro demonstration of their relative stability in the cytosol-like conditions and demonstration of Atx association with CaM in vivo in the cytosol of a neuronal cell. Our finding that CaM stabilizes and substantially enhances the activity of Atx and some other human sPLA2s provides a possible regulatory mechanism for these enzymes.

Knowledge of the CaM interacting surface in the sPLA2-CaM complex offers rational design of mutant on the CaM to be used in research of the pathophysiological relevance of the intracellular action of sPLA2 molecules in mammalian cells. CaM is known to bind proteins in well-established, canonical way through the so called CaM-binding motifs in proteins. By using NMR and modelling we discovered that sPLA2 binds to CaM with new CaM-binding motive, which leads to structural changes in the CaM that seems to be different from any of the canonical CaM-binding protein reported so far. Our result therefore offers the search for new CaM-binding proteins with such CaM-binding motive. Based on the results we predicted and then also verified the functionality of small interfering peptide named MLCKP, which prevented the complex formation between sPLA2 and CaM and, consequently, also the increase and stabilization of enzymatic activity of sPLA2. This peptide presents important tool for further design of new interfering substances that lead to new approaches to interfere/control the CaM-mediated sPLA2 regulatory pathways in mammalian cells. This molecules are highly relevant for our health in the pathophysiological effects mammalian sPLA2s, e.g. presynaptic neurotoxicity, innate immunity, atherosclerosis, inflammatory diseases, proliferation, apoptosis, removal of damaged cells, cancer, acute respiratory distress syndrome, endotoxic shock, neurotransmitter release, neuritogenesis, embryogenesis, pain, ischemia and Alzheimer's disease.

9.2.Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Raziskovalni projekt imel kar nekaj posrednih pozitivnih učinkov na našo družbo. Te so bile zlasti pri prenosu znanja pridobljenega na Nizozemskem v Slovenijo ter na področju izobraževanja. Preko raziskovalnih aktivnosti so moje znanstvene in profesionalne izkušnje rasle, svoje znanje ter izkušnje pa sem prenesla na študente. Kot asistentka na fakulteti sem bila vključena v poučevanje dodiplomskih študentov na Univerzi v Ljubljani. V okviru raziskav se je izobraževal en dodiplomski in en podiplomski študent. Rezultate naših raziskav smo in nekatere še bomo objavili v kvalitetnih mednarodnih znanstvenih revijah in monografijah. S predstavljanjem svojih dosežkov sem v obliki vabljenih predavanj in v obliki postrov predstavila na številnih mednarodnih znanstvenih srečanjih in tako dodala k prepoznavnosti in znanstvenemu ugledu Slovenije v svetu. Posebnega pomena za slovenski raziskovalni prostor in preko njega za celotno družbo je bilo uvajanje v program HADDOCK, NMR tehnika in v druge najnovejše raziskovalne tehnologije, ki sem jih uporabila pri svojem raziskovalnem delu.

ANG

The research project had several indirect positive impacts on our society. These were particularly in the transfer of knowledge that I gained in The Netherlands and in the field of education. Through the research activities my scientific and professional experiences grow and my knowledge and experiences were transferred to the students. As a teaching assistant I was involved in teaching activities at undergraduate levels at the Ljubljana University. In the scope of the project one undergraduate and one postgraduate student were directly and practically educated. The results of our research were published in high quality scientific journals and scientific monographs, some results are still in preparation. Together with dissemination of our achievements through invited lectures and on posters on international scientific conferences, I extended the recognition and scientific reputation of Slovenia worldwide. Of the special importance for the Slovenian research sphere and through it for the whole society was also introducing and transferring of the latest research technologies that I used in my experimental work, especially the usage of HADDOCK program and NMR technic.

10.Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!

Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	

	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	

	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

Komentar

11.Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!
Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☐	☐	☐	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☐	☐	☐	☐	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☐	☐	☐	☐	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☐	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	☐	☐	☐	☐	
G.02.07.	Večji delež izvoza	☐	☐	☐	☐	
G.02.08.	Povečanje dobička	☐	☐	☐	☐	
G.02.09.	Nova delovna mesta	☐	☐	☐	☐	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	☐	☐	☐	☐	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	☐	☐	☐	☐	
G.02.12.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	☐	☐	☐	☐	
G.03.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	☐	☐	☐	☐	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	☐	☐	☐	☐	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije	☐	☐	☐	☐	

	in javne uprave					
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	☐	☐	☐	☐	
G.04.06.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete	☐	☐	☐	☐	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj	☐	☐	☐	☐	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	☐	☐	☐	☐	
G.09.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	

Komentar

--

12.Pomen raziskovanja za sofinancerje¹¹

	Sofinancer		
1.	Naziv		
	Naslov		
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja		Šifra
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
Komentar			
Ocena			

13.Izjemni dosežek v letu 2013¹²**13.1. Izjemni znanstveni dosežek**

Rezistenca bakterij na antibiotike predstavlja ena od najresnejših groženj modernega zdravja. V zadnjih letih smo priča pojava vse večjega števila sojev bakterij (*Escherichia coli* in *Neisseriae gonorrhoea*), ki so odporne na antibiotike. V sodelovanju z dr. Matejem Butalom iz Oddelka za

biologijo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani smo zgradili tridimenzionalni model kompleksa, ki je odgovoren za bakterijsko rezistenco in ta model omogoča ciljno načrtovanje substanc pri preprečevanju razvoja bakterijske odpornosti na antibiotike. V tem procesu igra ključno vlogo bakterijski sistem SOS, v katerem je udeležena interakcija med eno verižno DNA (ssDNA) ter RecA in LexA proteinoma. Na osnovi eksperimentalnih podatkov kartiranja interakcijske površine smo z uporabo HADDOCK programa postavili tridimenzionalni model kompleksa ssDNA-RecA-LexA (L. Kovačič in sod., Nucleic Acids Research, 41 (2013), 9901–9910).

13.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Kot članica organizacijskega odbora sem sodelovala pri organizaciji 10. Srečanja Slovenskega biokemijskega društva, ki je potekalo med 15. in 18. septembrom 2013 v Ljubljani. Srečanje je nudilo priložnosti za izmenjavo znanj, zamisli in izkušenj, živahne in plodne razprave, kakor tudi možnosti za sklenitev novih in obnovitev starih poznanstev ter začetke novih sodelav in skupnih projektov.

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Institut "Jožef Stefan"

Lidija Kovačič

ŽIG

Kraj in datum:

Dublin, Irska	26.3.2014
---------------	-----------

Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2014/78

¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

² Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

⁴ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

⁶ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A''

ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja [Nazaj](#)

⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹¹ Rubrike izpolnite / prepisite skladno z obrazcem "izjava sofinancerja" <http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>, ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

¹² Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2013 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2014 v1.01

59-21-4C-48-F0-84-0C-48-DB-0A-C0-87-04-E3-E2-C9-B9-C8-0E-E4

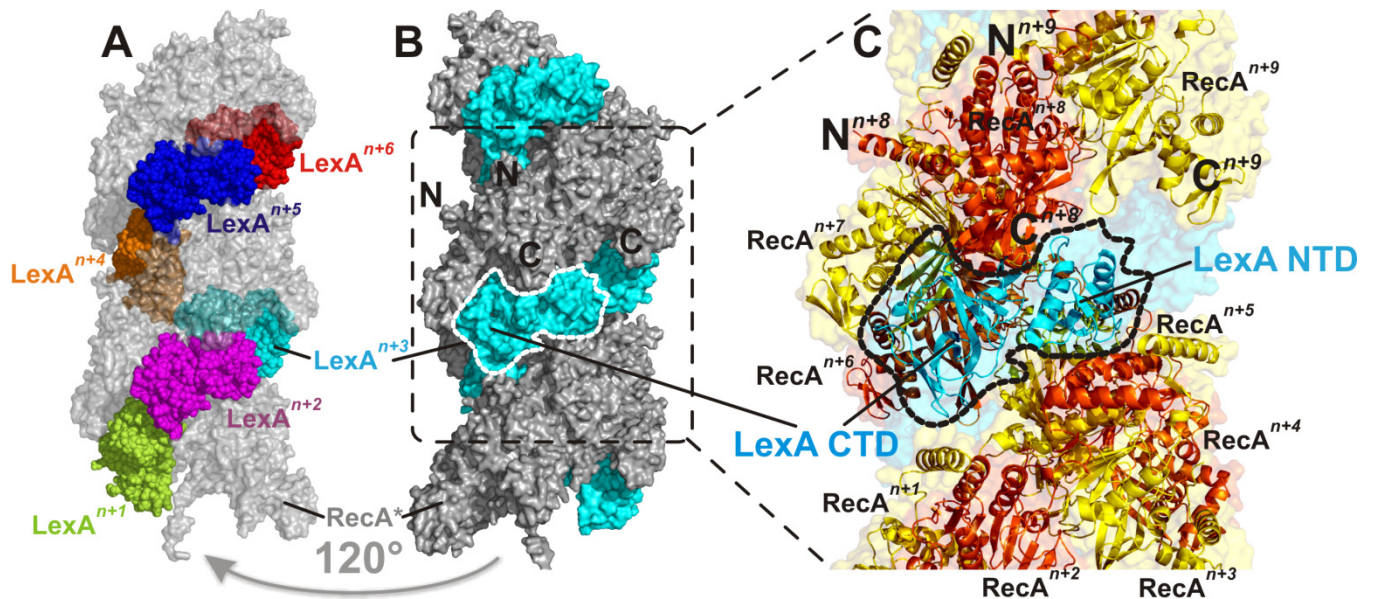
Priloga 1

1 NAROVOSLOVJE

1.05 Biokemija in molekularna biologija

Dosežek 1: Izvirni znanstveni članek,

Vir: Kovačič in sodelavci, *Nucleic acids res.*, 41, 21: 9901-9910, 2013.



Model tridimenzionalne strukture kompleksa ssDNA-RecA-LexA, ki bo omogočil ciljan razvoj učinkovin za preprečevanje bakterijske odpornosti proti antibiotikom. (A) Šest monomerov LexA (sferičen prikaz, vsak monomer je druge barve) se prilega dvema obratoma kompleksa ssDNA-RecA (RecA*) (prikazano v obliki sive prosojne površine). (B) Kompleks LexA-RecA* rotiran za 120° okoli navpične osi glede na smer prikaza (A). Monomeri LexA so prikazani v svetlo modri barvi, RecA pa v sivi. N- in C-konci dveh RecA monomerov so označeni. Eden od monomerov LexA je obkrožen s črtkano črto. (C) Prikaz detajlov kompleksa LexA-RecA*. Obkrožen je isti monomer LexA kot na sliki (B). Označeni sta N- in C-domena LexA (NTD in CTD). Monomer LexA obdaja devet zaporednih monomerov RecA (prikazani v rumeni in oranžni barvi). Sedem od devetih RecA tvori interakcijsko površino z LexA. Slika je povzeta iz članka L. Kovačič et al., *Nucleic Acids Research*, 41 (2013), 9901-9910.

Priloga 2

1 NAROVOSLOVJE

1.05 Biokemija in molekularna biologija

Dosežek 2: Sodelava v organizaciji znanstvenega srečanja,

Vir: Slovensko biokemijsko društvo; Knjiga povzetkov; 2013,

<http://bio.ijs.si/sbd2013/index.html>



Vabilo

Program

Povzetki

Prizorišče

Registracija

Organizatorji

Pokrovitelji

Vabilo



V veliko čast in zadovoljstvo nam je, da lahko organiziramo **10. Srečanje Slovenskega biokemijskega društva 2013**, ki bo potekalo med 15. in 18. septembrom 2013 v Ljubljani - v srcu Slovenije.

Prepričani smo, da bo to srečanje nudilo priložnosti za izmenjavo znanj, zamisli in izkušenj, živahne in plodne razprave, kakor tudi možnosti za sklenitev novih in obnovitev starih poznanstev ter začetke novih sodelav in skupnih projektov. Upamo, da bo srečanje udeležencem ponudilo bogato znanstveno in prijetno osebno izkušnjo.

Srečanje Slovenskega biokemijskega društva bo zajemalo področja proteinske strukture in funkcije, celičnega signaliziranja in membran, molekularnih osnov bolezni, sistemske biologije in funkcijske genomike ter bionotehnologije.



Prof. dr. Boris Turk
Predsednik znanstvenega odbora

dr. Aleš Berlec
Predsednik organizacijskega odbora

Zadnje novice

31. Julij 2013:
zadnji rok za oddajo
povzetkov

Kontakt:
infosbd2013@ijs.si

Uradna internetna stran 10. Srečanja Slovenskega biokemijskega društva 2013, ki je potekalo med 15. in 18. septembrom 2013 v Ljubljani.