

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2013/208



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J7-2379
Naslov projekta	Mikrovezikli aktivirajo Tollu podobne receptorje in prispevajo k vnetnim procesom
Vodja projekta	21426 Mateja Manček Keber
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	4173
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	05.2009 - 04.2012
Nosilna raziskovalna organizacija	104 Kemijski inštitut
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	7 INTERDISCIPLINARNE RAZISKAVE
Družbeno-ekonomski cilj	13.03 Medicinske vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)

2. Raziskovalno področje po šifrantu FOS¹

Šifra	3.04
- Veda	3 Medicinske vede
- Področje	3.04 Medicinska biotehnologija

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta²

SLO

Sterilno vnetje je fiziološko stanje, ki nastane brez okužbe z mikrobi in je posledica poškodbe tkiv zaradi mehanskih poškodb, hemoragij, ishemije/reperfuzije. Neprestano vnetje je tudi del patogeneze kroničnih bolezni, kot so ateroskleroza, revmatoidni artritis (RA), avtoimunih bolezni in celo raka. Vnetje lahko vodi tudi do razvoja sindroma sistemskega vnetnega odgovora (SIRS), ki je

lahko smrten. Značilna je povečana produkcija kisikovih in dušikovih reaktivnih spojin, ki so del oksidativnega stresa in so povezana s poškodbami. Glavna značilnost takšnega oksidativnega stresa je povečana peroksidacija fosfolipidov, ki tako predstavljajo pomemben marker stanja.

Iz poškodovanih celic se v okolje sproščajo endogeni ligandi, vendar so identiteta endogenih ligandov in njihov mehanizem delovanja še vedno slabo poznani. Oksidativni stres povzroči oksidacijo fosfolipidov. Ti peroksidirani fosfolipidi, ki se lahko sproščajo v krvni obtok v obliki mikroveziklov (MV), bi lahko predstavljali iskani "signal nevarnosti". Predvidevamo, da peroksidirani fosfolipidi (PL) v MV predstavljajo ligande, ki aktivirajo kompleks receptorjev TLR4/MD-2 in sprožijo izražanje provnetnih citokinov oz. vnetje.

V projektu smo pokazali, da delno oksidirani fosfolipidi v MV, izoliranih iz plazme bolnikov z RA ali iz celic, ki so bile podvržene oksidativnemu stresu, aktivirajo TLR4 v celičnih linijah in *in vivo*. MV, izolirane iz zdravih oseb, ali pripravljene iz sintetičnih fosfolipidov, smo z delno oksidacijo spremenili v aktivne ligande TLR4, medtem ko jih je popolna oksidacija inaktivirala. Hidro(pero)skilne PL smo identificirali kot aktivne molekule. Aktivacija TLR4 s PL/MV oponaša mehanizem aktivacije TLR4 z LPS, kar smo demonstrirali z učinki proteina MD-2, mutacijami, inhibitorji in dimerizacijo receptorskega kompleksa. Kljub podobnostim v mehanizmu pa patogeni signal (LPS) in endogeni signal (MV) inducirata zelo različen odgovor na nivoju transkripcije v mišjih celicah BMDM, kjer imajo MV močan potencial usmerjanja v utišanje vnetja. Hidro(pero)skilni PL v MV torej predstavljajo splošen endogeni signal nevarnosti, ki se sprošča ob oksidativnem stresu in potrjujejo prodorno vlogo receptorja TLR4 pri vnetju. Ti rezultati vodijo k razumevanju molekularnih mehanizmov, kar je ključno za razvoj bolj učinkovitih terapij in diagnostike. Uspešna aplikacija raziskav bi lahko vodila v razvoj novih pristopov diagnostike bolezni in razširila uporabo inhibitorjev receptorja TLR4 ter povečala možnost zdravljenja določenih kroničnih bolezni in stanj po poškodbah.

ANG

Sterile inflammation is a physiological condition, which develops in absence of a microbial infection as a result of tissue damage resulting from mechanical trauma, hemorrhage, ischemia/reperfusion. Ongoing inflammation also underlies the pathogenesis of many chronic diseases, for example atherosclerosis, rheumatoid arthritis, autoimmune diseases and even cancer. Inflammation can lead to the development of systemic inflammatory response syndrome (SIRS), which can be deadly. Sterile inflammation involves the increased production of oxygen and nitrogen reactive species, which are part of oxidative stress and cause injuries. One of the main features of oxidative stress is increased phospholipid peroxidation, which is now being recognized as one of the important markers of the condition.

Cells under stress release endogen ligands, but their identity as well as their mechanisms of action are still poorly investigated. Oxidative stress is a cause of phospholipid peroxidation. These peroxidized phospholipids can be subsequently released to the blood stream in the form of microvesicles (MVs), which could present the so called "danger signal". We presume peroxidized phospholipids composing MV could be ligands, which activate TLR4/MD-2 receptor complex and synthesis of proinflammatory cytokines or inflammation.

In this project we showed that partially oxidized phospholipids in MVs from plasma of patients with rheumatoid arthritis or cells submitted to oxidative stress induce activation of TLR4 in cultured cells and *in vivo*. MVs from sera of healthy donors or reconstituted synthetic MVs can be converted to TLR4 agonists by limited oxidation, while prolonged oxidation abrogated the activity. Hydro(pero)xyl PLs were identified as agonistic molecules. Activation of TLR4 by phospholipids/MVs mimics the mechanism of TLR4 activation by LPS, demonstrated by the effects of MD-2, mutations, inhibitors and receptor complex dimerization. However, signal from pathogens (LPS) and endogenous danger signal (MVs) induced significantly different transcriptional response profile in mouse BMDMs with a strong inflammation-resolving component induced by the endogenous signal. Hydro(pero)xyl PLs in MVs thus represent a ubiquitous endogenous danger signal released under the oxidative stress, which underlies the pervasive role of TLR4 signaling in inflammation. These results lead forward understanding of the molecular mechanisms of sterile inflammation, which is essential for the development of more effective therapy, diagnostics and prevention. The successful application of research could lead to the development of innovative approaches and tools for the disease diagnostic and may expand the application of inhibitors of TLR4 receptor and increase the possibilities to treat specific chronic diseases and conditions after injuries.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu³

V prvih dveh letih smo na različne načine pokazali, da samo delno ne pa popolnoma oksidirani fosfolipidi v mikroveziklih lahko aktivirajo sintezo provnetnih citokinov v odvisnosti od receptorskega kompleksa TLR/MD-2. V zadnjem letu pa smo pokazali, da lahko aktivne MV pridobimo, če v celicah sprožimo oksidativni stres s kalcijev ionoforom A23187, medtem ko stimulacija celic s TNF α vodi v tvorbo MV, ki ne aktivirajo receptorja TLR4 in pokazali na mehanizem same tvorbe MV. Tako pridobljeni MV lahko povzročijo tudi sintezo citokinov v primarnih celicah miši, ki imajo delujoč TLR4, ne pa v tistih, ki imajo okvarjenega. Enako smo potrdili tudi z injiciranjem MV v same miške. Dodatno smo raziskali tudi sam mehanizem aktivacije receptorskega kompleksa TLR4/MD-2 in tako pokazali, zakaj so aktivacije sposobni samo fosfolipidi v specifičnem oksidativnem stanju.

BMDM (bone marrow derived macrophages) smo pripravili iz kostnega mozga C3H/HeN mišk, ki imajo divji tip TLR4 in C3H/HeJ, ki imajo okvarjen TLR4. Celice smo stimulirali z aktivnimi MV, pripravljenimi iz celičnih kultur s stimulacijo z A23187, delno oksidiranimi sintetičnimi MV in popolnoma oksidiranimi MV. Pokazali smo, da je sinteza citokina IL-6 popolnoma odvisna od prisotnosti TLR4 (Slika 1a). Delno oksidirani MV so aktivirali tudi sintezo citokina IL-6 v miškah, ki smo jim i.v. injicirali MV (Slika 1b), kar potrjuje naše domneve, da bi MV lahko imeli tudi sistemski učinek pri sterilnem vnetju.

Kristalna struktura proteina MD-2, na katerega se veže ligand lipopolisaharid (LPS), je znana. Iz nje je razvidno, da je za tvorbo aktivnega dimerne kompleksa TLR4/MD-2 pomembna tudi interakcija ene acilne verige molekule LPS z molekulo TLR4. Mi smo predpostavili, da je ta interakcija pomembna tudi za aktivnost delno oksidiranih fosfolipidov, ki imajo v strukturi še vedno dolge acilne verige. Pri popolnoma oksidiranih MV, kjer pride do krajšanja acilnih verig, pa ta interakcija ni več mogoča. Uporabili smo mutanti TLR4 F440A in F463A (Slika 2a). Obe mutanti sta zmanjšali oz. popolnoma inhibirali odziv tako na LPS kot tudi na delno oksidirane MV.

Fosfolipidi imajo strukturo psevd molekule LPS. Kristalna struktura pokaže, da je za aktivacijo verjetno potrebna vezava dveh molekul fosfolipida na MD-2. Torej, bi ena molekula fosfolipida lahko delovala inhibitorno in tako zmanjšala aktivacijo z LPS, pri večjih koncentracijah, ko bi dve molekuli zasedli prostor na MD-2 pa bi vezava bila aktivna. Ta bifazni model delovanja fosfolipidov smo pokazali najprej z modelom (Slika 2b) in nato še z eksperimentom (Slika 2c). Tako so delno oksidirani MV pri nizkih koncentracijah inhibirali aktivacijo z LPS, nato pa se je krivulja obrnila navzgor.

Kar lahko že imenujemo kot **nadgradnja projekta** so rezultati, ki smo jih pridobili z **analizo mikromrež in na mišjem modelu RA**. Poskusi na mišjem modelu RA so bili izvedeni v času trajanja EMBO štipendije, ki sem jo pridobila in v okviru katere sem med majem 2011 in julijem 2011 delala na Oddelku za reumatologijo, Medicinske univerze na Dunaju, Avstrija, pod mentorstvom dr. Silvie Hayer.

Zelo zanimive rezultate smo pridobil z analizo mikromrež, narejeno na vzorcih RNA, ki smo jih pridobili s stimulacijo mišjih BMDM z LPS, MV in neaktivnimi oksidiranimi MV. Ti rezultati kažejo, da kljub temu, da imajo LPS in MV enak mehanizem vezave na MD-2/TLR4 receptorski kompleks, aktivirajo drugačen imunski odziv. MV ne pa LPS stimulirajo sintezo citokinov, ki usmerjajo Th2 citokinski odgovor oz. M2 alternativno pot, za katero je značilna sinteza citokinov IL-4, IL-5, IL-10 in drugih, ki prispevajo k utišanju imunskega odgovora.

Rezultati mikromrež so pomembni, ker nam pomagajo razložiti rezultate, pridobljene na miškah, ki smo jim s kolagenom inducirali razvoj RA. Kot že napisano, so MV, če so bili injicirani i.v. sprožili sintezo IL-6 citokina (Slika 1b). Kljub temu pa niso dodatno poslabšali razvoja RA pri miškah, ampak so imeli celo blagi pozitivni učinek (Slika 3a,b in c), kar je verjetno prav posledica aktivacije M2 alternativne poti in kaže na drugačno vlogo endogenih ligandov od patogenih ter potrjuje široko in pomembno vlogo receptorja TLR4 v vnetnih procesih v telesu.

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

Glede na spodnjo tabelo, ki smo jo predložili v projektu, lahko rečemo, da smo izpolnili cilje v vseh točkah. Kot nadgradnjo in dodano vrednost projekta lahko štejemo poskuse, ki smo jih pridobili z analizo mikromrež in s poskusi na živalskem modelu RA. Dodana vrednost projekta je tudi vzpostavitev sodelovanja z Oddelkom za reumatologijo na Medicinski fakulteti na Dunaju, kjer bo sodelava potekala tudi v prihodnje.

Časovna razporeditev:

	1. leto				2. leto				3. leto			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
Cilj 1:												
1.1. Testiranje aktivnosti MV	X	X	X						X	X		
Cilj 2:												
2.1. Določitev aktivne komponente MV		X	X									
2.2. Merjenje oksidiranih fosfolipidov v MV				X	X	X						
2.3. Izvor MV						X	X			X	X	
2.4. <i>In vitro</i> oksidacija MV	X	X		X	X							
Cilj 3:												
3.1. Rekonstitucija aktivnih sintetičnih MV							X	X	X			
Cilj 4:												
4.1. Vpliv oksidativnega stresa na izražanje in signalizacijo TLR							X	X			X	X

6. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine²

Ni bilo sprememb, ki bi vplivale na izvajanje projekta.

7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

Znanstveni dosežek		
1.	COBISS ID	29065433 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Nanoparticles isolated from blood : a reflection of vesiculability of blood cells during the isolation process.
		<i>ANG</i> Nanoparticles isolated from blood : a reflection of vesiculability of blood cells during the isolation process.
	Opis	<i>SLO</i> Nanodelci (mikrovezikli - MV), ki se nahajajo v periferni krvi, nastajajo z odcepljanjem s celične membrane. Med procesom izolacije lahko pride do dodatnega sproščanja MV iz krvnih celic, zato je optimizacija in zmanjšanje sproščanja MV med izolacijo ključnega pomena, če želimo MV uporabljati kot diagnostični marker stanja za določene bolezni. Opazili smo, da sta velikost in količina MV odvisni od temperature izolacije, kjer pri nižjih temperaturah izolacije opazimo višje koncentracije povprečno manjših delcev. Na podlagi slik deformiranih krvnih celic v izolatih pa lahko tudi predpostavljamo, zakaj pride do njihove fragmentacije. Rezultati kažejo, da vsebine izolatov izražajo lastnosti krvnih celic in njihovih interakcij s tekočinami, katerih sestava se lahko spreminja pri določenih bolezni, in bi lahko bile klinično relevanten podatek.

		are pivotal if MVs are used as a diagnostic marker for certain diseases. We showed that a size and a concentration of MVs are dependent on temperature during the isolation, where higher concentrations of smaller MVs were observed at lower temperatures. On the basis of pictures of deformed blood cells found in the isolates indicate we can speculate how fragmentation of blood cells may take place. The results show that the contents of isolates reflect the properties of blood cells and their interaction with the surrounding solution, which differ in different diseases and may therefore present a relevant clinical parameter.
	ANG	
Objavljeno v		Dove Medical Press; International journal of nanomedicine; 2011; Vol. 6; str. 2737-2748; Impact Factor: 3.130; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.705; Avtorji / Authors: Šuštar Vid, Bedina Zavec Apolonija, Štukelj Roman, Frank Mojca, Bobojević Goran, Janša Rado, Ogorevc Eva, Kruljc Peter, Mam Keriya, Šimunič Boštjan, Manček Keber Mateja, Jerala Roman, Rozman Blaž, Veranič Peter, Hägerstrand Henry, Kralj-Iglič Veronika
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	4957722
		Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	The lipopolysaccharide core of "Brucella abortus" acts as a shield against innate immunity recognition
	ANG	The lipopolysaccharide core of "Brucella abortus" acts as a shield against innate immunity recognition
Opis	SLO	Lipopolisaharid (LPS) gram-negativne bakterije Brucella nima izrazitih s patogeni povezanih molekularnih vzorcev, za katere se predvideva, da so odgovorni za zakasnen razvoj imunskega odgovora. Ugotovili smo, da ima B. abortus mutanta v genu wadC spremenjen LPS, vendar ohranjen O-polisaharid in lipid A. Pri miših, wadC mutanta povzroči vnetni odzivov. Poleg tega so bakterije občutljive na ubijanje z neimunskim serumom, baktericidnimi peptidi in se ne razmnožujejo v dendritičnih celicah. Vse te lastnosti smo lahko reproducirali z očiščenim LPS wadC mutante v odvisnosti od TLR4. Poleg tega se mutirani LPS močneje veže na MD-2, ko-receptor TLR4 in vodi v povečano znotrajcelično signalizacijo. Pokazali smo, da Brucella uide prepoznavanju v zgodnjih fazah okužbe z izražanjem zaščitnega LPS in opredelili nov mehanizem virulenčnosti pri znotrajceličnih po Gramu negativnih bakterijah. Ti rezultati so vspodbudni tudi za izboljšanje bakterijskih cepiv.
	ANG	Lipopolysaccharide (LPS) of the gram-negative bacterium Brucella lacks a marked pathogen-associated molecular pattern, and it has been postulated that this delays the development of immunity. We found that a B. abortus mutant in the wadC gene displayed a disrupted LPS core while keeping both the LPS O-polysaccharide and lipid A. In mice, the wadC mutant induced proinflammatory responses and was attenuated. In addition, it was sensitive to killing by non-immune serum and bactericidal peptides and did not multiply in dendritic cells. All these properties were reproduced by the wadC mutant purified LPS in a TLR4-dependent manner. Moreover, the core-mutated LPS displayed an increased binding to MD-2, the TLR4 co-receptor leading to subsequent increase in intracellular signaling. Here we show that Brucella escapes recognition in early stages of infection by expressing a shield against recognition by innate immunity in its LPS core and identify a novel virulence mechanism in intracellular pathogenic gram-negative bacteria. These results also encourage for an improvement in the generation of novel bacterial vaccines.
Objavljeno v		Public Library of Science; PLOS pathogens; 2012; Vol. 8, iss. 5; str. e1002675-1-e1002675-14; Impact Factor: 9.127; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.531; A": 1; A': 1; Avtorji / Authors: Conde-Alvarez Raquel, Arce-Gorvel Vilma, Iriarte Maite, Manček Keber

		Mateja, Barquero-Calvo Elias, Palacios-Chaves Leyre, Chacon-Diaz Carlos, Chaves-Olarte Esteban, Martirosyan Anna, Von Bargen Kristine, Grilló María-Jesús, Jerala Roman, Brandenburg Klaus, Llobet Enrique, Bengoechea José A., Moreno Edgardo, Moriyon Ignacio, Gorvel Jean-Pierre
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
3.	COBISS ID	4824602 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> DNA-guided assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency
		<i>ANG</i> DNA-guided assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency
	Opis	<i>SLO</i> Sintetično ogrodje, ki omogoča prostorsko in časovno postavitve encimov v živih celicah, je obetavna post-translacijska strategija za nadzorovanje pretoka informacij metabolnih in signalnih poti. Opisujemo uporabo plazmidne DNA kot stabilnega, robustnega ogrodja za postavitve biosinteznih encimov v citoplazmi bakterije <i>Escherichia coli</i> . To vključuje pretvorbo posameznih encimov v himerne encime, ki imajo sposobnost vezave na DNA, kar smo dosegli z gensko fuzijo cinkovih prstov, ki se vežejo na specifična zaporedja DNA. Himerni proteini, izraženi v celicah v prisotnosti DNA ogrodja, ki vsebuje specifično DNA zaporedje, ki ga cinkovi prsti prepoznavajo, povečajo titer metabolnih produktov, kot so resveratrol, 1,2-propanediol in mevalonat. Rezultati ponazarjajo uporabnost DNA ogrodja za združevanje biosintetskih encimov v funkcionalne metabolne strukture.
		<i>ANG</i> Synthetic scaffolds that permit spatial and temporal organization of enzymes in living cells are a promising post-translational strategy for controlling the flow of information in both metabolic and signaling pathways. Here, we describe the use of plasmid DNA as a stable, robust and configurable scaffold for arranging biosynthetic enzymes in the cytoplasm of <i>Escherichia coli</i> . This involved conversion of individual enzymes into custom DNA-binding proteins by genetic fusion to zinc-finger domains that specifically bind unique DNA sequences. When expressed in cells that carried a rationally designed DNA scaffold comprising corresponding zinc finger binding sites, the titers of diverse metabolic products, including resveratrol, 1,2-propanediol and mevalonate were increased as a function of the scaffold architecture. These results highlight the utility of DNA scaffolds for assembling biosynthetic enzymes into functional metabolic structures.
	Objavljeno v	Oxford University Press; Nucleic acids research; 2012; Vol. 40, no. 4; str. 1879-1889; Impact Factor: 8.026; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.739; A': 1; Avtorji / Authors: Conrado Robert J., Lebar Tina, Turnšek Jernej, Tomšič Nejc, Avbelj Monika, Gaber Rok, Koprivnjak Tomaž, Mori Jerneja, Glavnik Vesna, Vovk Irena, Benčina Mojca, Hodnik Vesna, Anderluh Gregor, Jerala Roman
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
4.	COBISS ID	4930586 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> MARCKS as a negative regulator of lipopolysaccharide signaling
		<i>ANG</i> MARCKS as a negative regulator of lipopolysaccharide signaling
	Opis	<i>SLO</i> MARCKS (ang. myristoylated alanine-rich C kinase substrate) je naravno nezvit protein, ki posreduje pogovor med različnimi signalnimi potmi. Transkripcija proteina MARCKS je povečana po stimulaciji z bakterijskim LPS. Pokazali smo, da MARCKS specifično veže LPS. Po stimulaciji z LPS se MARCKS premakne s plazemske membrane v FYVE-pozitivne endosome, kjer kolokalizira z LPS. V proteinu MARCKS okvarjene celice MEF (ang. mouse embryonic fibroblasts) se odzovejo na stimulacijo z LPS s povečano produkcijo IL-6 glede na divji tip celic MEF. Podobne rezultate smo dobili z

		uporabo MARCKS siRNA, medtem ko povečano izražanje MARCKS povzroči inhibicijo LPS signaliziranja. Ti rezultati kažejo, da MARCKS prispeva k negativni regulaciji celičnega odgovora na LPS.
	ANG	Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) is an intrinsically unfolded protein, which mediates the cross-talk between several signal transduction pathways. Transcription of MARCKS is increased by stimulation with bacterial LPS. We determined that MARCKS specifically binds to LPS. After LPS stimulation, MARCKS moved from the plasma membrane to FYVE-positive endosomes, where it colocalized with LPS. MARCKS-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs) responded to LPS with increased IL-6 production compared with the matched wild-type MEFs. Similarly, small interfering RNA knockdown of MARCKS also increased LPS signaling, whereas overexpression of MARCKS inhibited LPS signaling. These findings demonstrate that MARCKS contributes to the negative regulation of the cellular response to LPS.
	Objavljeno v	Williams & Wilkins; The journal of immunology; 2012; Vol. 188, no. 8; str. 3893-3902; Impact Factor: 5.788; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 4.167; A': 1; Avtorji / Authors: Manček Keber Mateja, Benčina Mojca, Japelj Boštjan, Panter Gabriela, Andrä Jörg, Brandenburg Klaus, Triantafilou Martha, Triantafilou Kathy, Jerala Roman
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
5.	COBISS ID	4652570 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Ectodomain of the toll-like receptor 4 prevents constitutive receptor activation
		ANG Ectodomain of the toll-like receptor 4 prevents constitutive receptor activation
	Opis	SLO TLR4 je vpleten v aktivacijo nespecifične imunosti. Kljub temu, da je močno preučevan, je regulacija njegove aktivacije še vedno slabo raziskana. Če smo ektodomeno TLR4 zamenjali z MD-2 ali CD14, smo dobili konstitutivno aktiven receptor neodvisen od liganda. To kaže na to, da je vloga ektodomene tudi v tem, da preprečuje spontano težnjo transmembranskih in citoplazmatskih domen po dimerizaciji, kar je verjetno pomembno za občutljivost TLR4 na aktivacijoj z različnimi agonisti.
		ANG TLR4 is involved in activation of innate immune response. Despite numerous studies, the role of separate domains of TLR4 in the regulation of receptor activation is poorly understood. Replacement of the TLR4 ectodomain with LPS-binding proteins MD-2 or CD14 resulted in a robust ligand-independent constitutive activation. This demonstrates an intrinsic dimerization propensity of the transmembrane and cytoplasmic domains of TLR4 and reveals a previously unknown function of the ectodomain in inhibiting spontaneous receptor dimerization. This is important for the sensitivity of TLR4 to activation by different agonists.
	Objavljeno v	American Society of Biological Chemists.; The Journal of biological chemistry; 2011; Vol. 286, no. 26; str. 23334-23344; Impact Factor: 4.773; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.739; A': 1; WoS: CQ; Avtorji / Authors: Panter Gabriela, Jerala Roman
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek

8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁷

	Družbeno-ekonomski dosežek	
1.	COBISS ID	4959514 Vir: COBISS.SI
		Izboljšana biosinteza preko urejenega ogrodja za biosintetske encime na

	Naslov	<i>SLO</i>	osnovi DNK zaporedja
		<i>ANG</i>	Improved synthesis of biosynthetic product by ordered assembly of biosynthetic enzymes guided by the nucleotide sequence motif template
Opis		<i>SLO</i>	Patent za izboljšanje biosintetske poti s pomočjo ogrodja na osnovi DNA
		<i>ANG</i>	Patent on the improvement of the biosynthetic pathway based on the DNA scaffold
Šifra	F.33 Patent v Sloveniji		
Objavljeno v	Urad Republike Slovenije za intelektualno lastnino; 2012; 100 str.; Avtorji / Authors: Jerala Roman, Avbelj Monika, Benčina Mojca, Mori Jerneja, Gaber Rok, Koprivnjak Tomaž, Anderluh Gregor, Vovk Irena, Lebar Tina, Turnšek Jernej, Ilc Tina, Tomšič Nejc, Stošički Tjaša, Žnidaršič Matej, Bordon Jure, Petroni Mattia, Glavnik Vesna		
Tipologija	2.24 Patent		
2.	COBISS ID	4757018	Vir: COBISS.SI
Naslov		<i>SLO</i>	Študentski projekti I-GEM in Biomod
		<i>ANG</i>	Student projects I-GEM and Biomod
Opis		<i>SLO</i>	Člana projektne skupine (Rok Gaber, Alja Oblak) sta kot mentorja sodelovala pri pripravi in izvedbi projektov I-GEM 2010 in 2012 ter Biomod 2011. Leta 2010 so prejeli Grand prize, 2012 pa prvo mesto na področju Zdravja in medicine ter drugo mesto v skupni razvrstitvi.
		<i>ANG</i>	The members of the project team (Rok Gaber and Alja Oblak) were mentors to students I-GEM teams 2010 and 2012 and Biomod team 2011. In 2010 they won Grand prize and in 2012 the first place in Health and medicine section and the second place in general.
Šifra	D.10 Pedagoško delo		
Objavljeno v	2010; Avtorji / Authors: Ilc Tina, Lebar Tina, Stošički Tjaša, Tomšič Nejc, Turnšek Jernej, Žnidaršič Matej, Bordon Jure, Češnovar Rok, Petroni Mattia, Pustoslemšek Rok		
Tipologija	3.25 Druga izvedena dela		
3.	COBISS ID	4829466	Vir: COBISS.SI
Naslov		<i>SLO</i>	Lapajnetovo priznanje: Role of TLR4 receptor in infection and sterile induced threat
		<i>ANG</i>	Lapajne award: Role of TLR4 receptor in infection and sterile induced threat
Opis		<i>SLO</i>	Lapajnetovo priznanje Slovenskega biokemijskega društva (je strokovno priznanje mlademu članu in se podeli članu Društva za vrhunske dosežke na področju biokemijskih znanosti na znanstveno-raziskovalnem področju)
		<i>ANG</i>	Lapajne award from Slovenian Biochemical Society (it is a professional award to a young member for outstanding achievements in research in biochemical sciences)
Šifra	E.01 Domače nagrade		
Objavljeno v	Zavod za zdravstveno varstvo; Abstract book; 2011; Str. 84; Avtorji / Authors: Manček Keber Mateja		
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci		
4.	COBISS ID	4978714	Vir: COBISS.SI
Naslov		<i>SLO</i>	Kratka ustna predstavitev dela na konferenci: Partially oxidized phospholipids in microvesicles are endogenous activators of TLR4 in chronic inflammation
		<i>ANG</i>	Short oral presentation at the conference: Partially oxidized phospholipids in microvesicles are endogenous activators of TLR4 in chronic inflammation

Opis	SLO	Projektno delo je bilo večkrat predstavljeno znanstveni publiki.	
	ANG	This project work was presented to scientific public on several congresses.	
Šifra	B.06	Drugo	
Objavljeno v	Kenes International; 8th International congress on autoimmunity, Granada, Spain, May 9-13, 2012; 2012; [1 str.]; Avtorji / Authors: Manček Keber Mateja, Frank Mojca, Hafner Bratkovič Iva, Smole Anže, Zorko Mateja, Kralj-Iglič Veronika, Rozman Blaž, Horvat Simon, Jerala Roman		
Tipologija	1.12	Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
5. COBISS ID		Vir: vpis v poročilo	
Naslov	SLO	Jan Lonzarić - podiplomski študent	
	ANG	Jan Lonzarić - postgraduate student	
Opis	SLO	Sem mentorica dijakom, študentom in podiplomskim študentom.	
	ANG	I work as a mentor to students and postgraduate students.	
Šifra	D.09	Mentorstvo doktorandom	
Objavljeno v	xxx		
Tipologija	3.25	Druga izvedena dela	

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

Članek v pripravi/Paper manuscript

Naslov/Title: TLR4 senses oxidative stress mediated by oxidative stress-derived microvesicles
 Povzetek/Abstract: Oxidative stress is a hallmark of inflammation caused by infection or sterile tissue injury. Here we show that partially oxidized phospholipids in microvesicles (MVs) from plasma of patients with rheumatoid arthritis or cells submitted to oxidative stress induce activation of TLR4 in cultured cells and in vivo. MVs from sera of healthy donors or reconstituted synthetic MVs can be converted to TLR4 agonists by limited oxidation, while prolonged oxidation abrogates the activity. Hydro(pero)xyl PLs were identified as agonistic molecules. Activation of TLR4 by phospholipids/MVs mimics the mechanism of TLR4 activation by LPS, demonstrated by the effects of MD-2, mutations, inhibitors and receptor complex dimerization. However, signal from pathogens (LPS) and endogenous danger signal (MVs) induced significantly different transcriptional response profile in mouse BMDMs with a strong inflammation-resolving component induced by the endogenous signal. Hydro(pero)xyl PLs in MVs thus represent a ubiquitous endogenous danger signal released under the oxidative stress, which underlies the pervasive role of TLR4 signaling in inflammation.

Avtorji/Authors: Mateja Manček-Keber, Mojca Frank, Iva Hafner-Bratkovič, Anže Smole, Mateja Zorko, Nina Pirher, Silvia Hayer, Veronika Kralj-Iglič, Blaž Rozman, Simon Horvat, Roman Jerala

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

10.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

Vnetne bolezni, kjer so vpleteni receptorji TLR, in oksidacija lipidov, so med glavnimi vzroki za smrt, saj vključujejo od kardiovaskularnih do avtoimunih bolezni. Z identifikacijo endogenih ligandov in pojasnitvijo molekularnega mehanizma prispevamo k razvoju tega področja, ki je ključno za razvoj bolj učinkovitih terapij in diagnostike.

S sodelovanjem s skupinami iz Medicinske fakultete UL, Kliničnega centra v LJ in Medicinske univerze na Dunaju smo prispevali k razreševanju klinično pomembnih vprašanj, kjer imajo pridobljeni rezultati lahko skupaj s klinično sliko bolezni neposreden vpliv na zdravljenje ljudi. Uspešna aplikacija raziskav bo lahko razširila naše znanje na področju kroničnih bolezni. Razumevanje teh procesov je poleg medicinskega tudi biotehnološkega pomena. Naša raziskovalna skupina ima odlično ekspertizo na področju razvoja inhibitorjev receptorjev TLR,

saj smo že identificirali in patentirali nove spojine, ki so potencialno uporabne za zdravljenje vnetnih bolezni (inhibitorji aktivacije TLR4/MD-2). Določitev vloge receptorja TLR4 v sterilnem vnetju lahko razširi aplikacijo teh spojin in poveča možnost zdravljenja teh bolezni. Z inovativnim pristopom in novimi idejami smo razširili spekter znanj (raziskovalcev, mladih raziskovalcev, diplomantov). V sklop izobraževanja lahko vključimo tudi naš prispevek k promociji naravoslovja: V obdobju preteklih treh let so raziskovalci, ki so v projektni skupini, preko izjemnih uspehov na tekmovanjih raziskovalnih projektov v najbolj eminentni akademski konkurenci (iGEM, opisan v dosežkih) pomembno pripomogli k promociji naravoslovja in znanosti v širši javnosti in promociji Slovenije kot države z dobro znanostjo in izobraževanjem. Omenjeni uspehi so odmevali po vsem svetu z objavami v časopisih, revijah, dnevnikih, na radiu, TV in spletnih straneh.

ANG

Inflammatory diseases, where TLR receptors are involved, and lipid oxidation are between main causes of death as they are involved in cardiovascular to autoimmune diseases. Identification of endogenous ligands and molecular mechanism contributed to the development of the research area, which is prerequisite for development of efficient therapies and diagnostics. Cooperation with groups from Faculty of Medicine UL, University Medical Centre LJ and Medical university Vienna contributed to clinically important issues, where the results and clinical picture can have direct influence on patient's treatment. Successful application of research of those diseases increased our knowledge on chronic diseases. Understanding of the molecular mechanisms is not only of medical, but also of biotechnological importance. Our group has a great expertise in the design of TLR receptor inhibitors, where we have already identified and patented compounds with a potential for treatment of inflammatory diseases (inhibitors of TLR4/MD-2 activation). Describing a role of TLR4 in sterile inflammation could broaden the application of these compounds and increase the possibilities to treat these disorders. Using innovative strategies and new ideas we educated students (undergraduate and PhD students) for research. In terms of education also our contribution to promotion of natural science can be included: In the period of last three years members of the project team have achieved exceptional successes in the competitions of research projects in the most eminent academic competition (iGEM, described in achievements). Thus, they importantly help to the promotion of natural science in the broad public and Slovenia as the state with the excellent science and education. A wide response of mentioned successes was encountered through all over the world in the newspapers, journals, TV, radio, on web pages.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Kljub napredku intenzivne medicine smrtnost zaradi SIRS pri sterilnem vnetju in kroničnih bolezni narašča. Zato je vsak napredek pri razumevanju molekularnih mehanizmov in pri razvoju potencialnih učinkovin pomemben in dragocen. Z raziskavo smo identificirali endogene ligande in tako razložiti molekularno ozadje vnetja. Hkrati pa že iščemo potencialne inhibitorje signaliziranja in spojine za nevtralizacijo mikroveziklov. Tako odpiramo pot do razvoja učinkovin za kombinirano terapijo, ki bi po enem tiru zmanjševala prisotnost mikroveziklov in po drugem zavirala signalizacijo preostalih MV. Od identifikacije spojine vodnice do nove učinkovine je dolga pot in kot možnost se ponuja tudi iskanje sodelavcev za nadaljevanje raziskav oz. zainteresiranih podjetij preko evropskih projektov. Rezultati so pomembni iz medicinskega vidika z opaznim vplivom na zdravje človeka. Osnovna spoznanja pogosto vodijo do okritij, ki so osnova aplikativnih raziskav. Uporabnikom raziskav, kot je farmacevtska industrija, pomenijo torej osnovne raziskave izhodišče za nadaljnje aplikativne raziskave, saj odpirajo še neraziskana področja in nudijo nov pogled na problematiko. Z osnovnimi raziskavami razširjamo tudi spekter metod, kar lahko ponudimo industriji kot know-how pri reševanju njihovih problemov.

ANG

Despite advances in intensive medicine the mortality due to SIRS in sterile inflammation and chronic diseases increases. So, any advance in understanding of molecular mechanisms and drug design is therefore valuable. In the project we identified endogenous ligands to describe molecular background of inflammation. Meantime, we already search for potential inhibitors of signaling and compounds for microvesicle neutralization. This opens a new pathway to

combined therapy that would on one hand decrease MV presence in blood and on the other inhibit signaling of the remaining MVs. There is a long way from identification of leading compounds to new drugs, so there is a chance to find new collaborators or interested companies through european projects.

Our results have from medical point of view noticeable impact on human health. Basic research usually leads to new discoveries, which then become basic for applicative research. So, the potential users of our research results, such as pharmaceutical industry, could use our basic results for further applicative research, as they open new horizons and subsequently new views to problems. Within basic research new research methods will be introduced which could also serve as a know-how for industry to solve their problems.

**11.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	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.25 Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev		
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.26 Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev		
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.27 Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine		
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.28 Priprava/organizacija razstave		
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.29 Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete		
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.30 Strokovna ocena stanja		
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.31 Razvoj standardov		
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.32 Mednarodni patent		
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.33 Patent v Sloveniji		

	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

Komentar

--

12. 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	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev					

	dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01.	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.06.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.09.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

Komentar

--

13.Pomen raziskovanja za sofinancerje¹²

	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	

14. Izjemni dosežek v letu 2012¹³

14.1. Izjemni znanstveni dosežek

Objava znanstvenega članka MARCKS as a negative regulator of lipopolysaccharide signaling v reviji The journal of immunology z IF: 5.788, kjer je vodja projekta prvi avtor članka.

V članku nam je uspelo pokazati nov mehanizem regulacije signaliziranja preko MD-2/TLR4, ki prepoznava bakterijski lipopolisaharid (LPS). MARCKS je protein, ki posreduje pogovor med različnimi signalnimi potemi. Pokazali smo, da MARCKS specifično veže LPS in se po stimulaciji premakne s plazemske membrane v FYVE-pozitivne endosome, kjer kolokalizira z LPS. Povečano izražanje MARCKS inhibira LPS signaliziranje, medtem ko ga MARCKS siRNA poveča. Mehanizem je zanimiv, ker inhibicija poteka v endosomih in ne na plazemski membrani, kjer se tvori kompleks LPS/MD-2/TLR4. Povečana ekspresija proteina MARCKS je popolnoma inhibirala signalizacijo, kar kaže na to, da le-ta v večji meri poteka v endosomih in ne na plazemski membrani in tako prispeva k negativni regulaciji celičnega odgovora na LPS.

14.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

--

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:

Kemijski inštitut

Mateja Manček Keber

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana	13.3.2013
-----------	-----------

Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2013/208

¹ Opredelite raziskovalno področje po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science). Prevajalna tabela med raziskovalnimi področji po klasifikaciji ARRS ter po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science) s kategorijami WOS (Web of Science) kot podpodročji je dostopna na spletni strani agencije (<http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/preslik-vpp-fos-wos.asp>). [Nazaj](#)

² Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

³ 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](#)

⁴ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11)

[Nazaj](#)

⁵ 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](#)

⁶ 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](#)

⁷ 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](#)

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁹ 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](#)

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

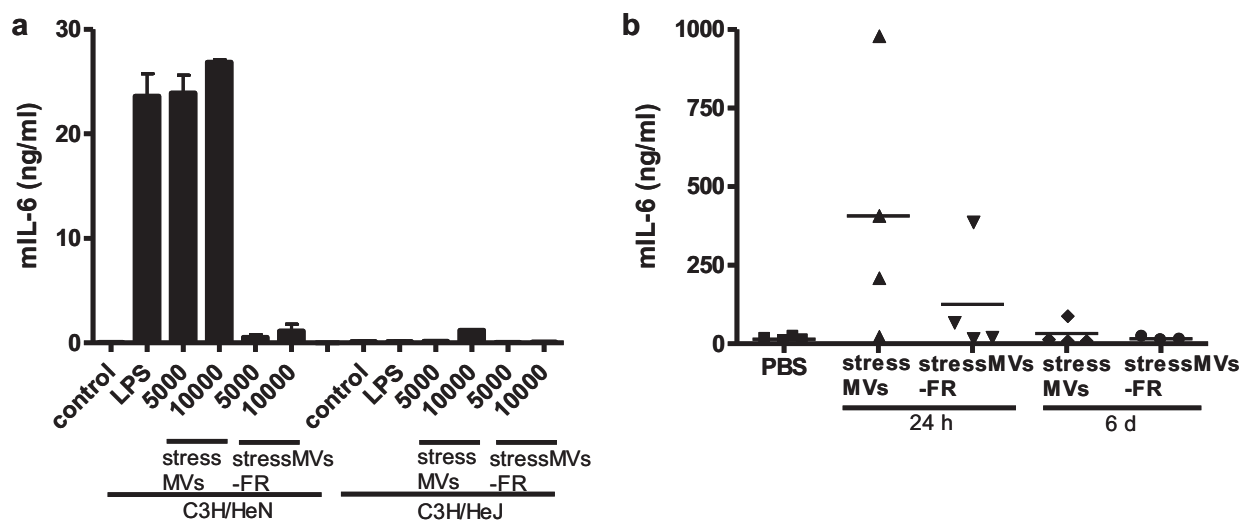
¹¹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹² 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](#)

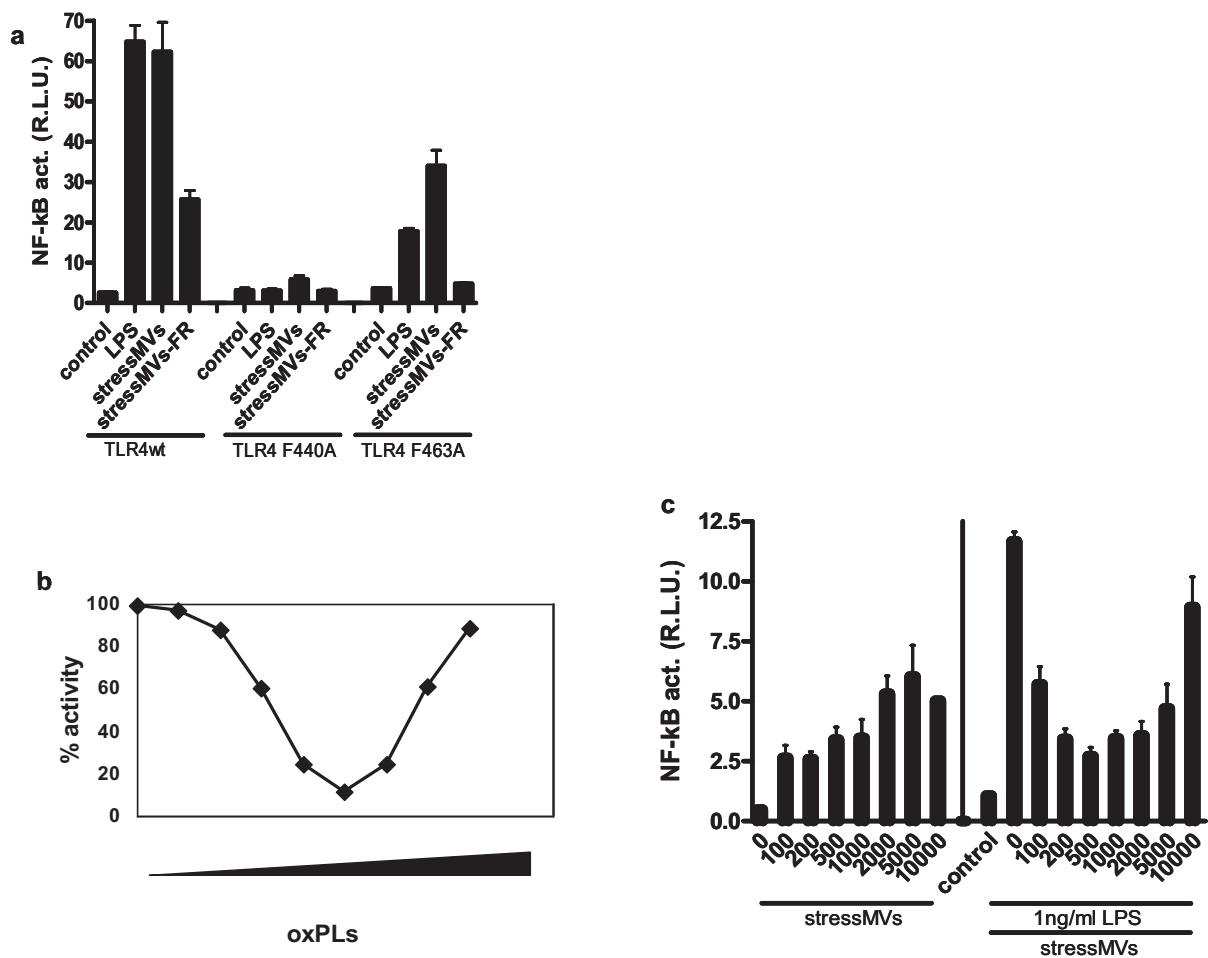
¹³ Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2012 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, 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/2013 v1.00

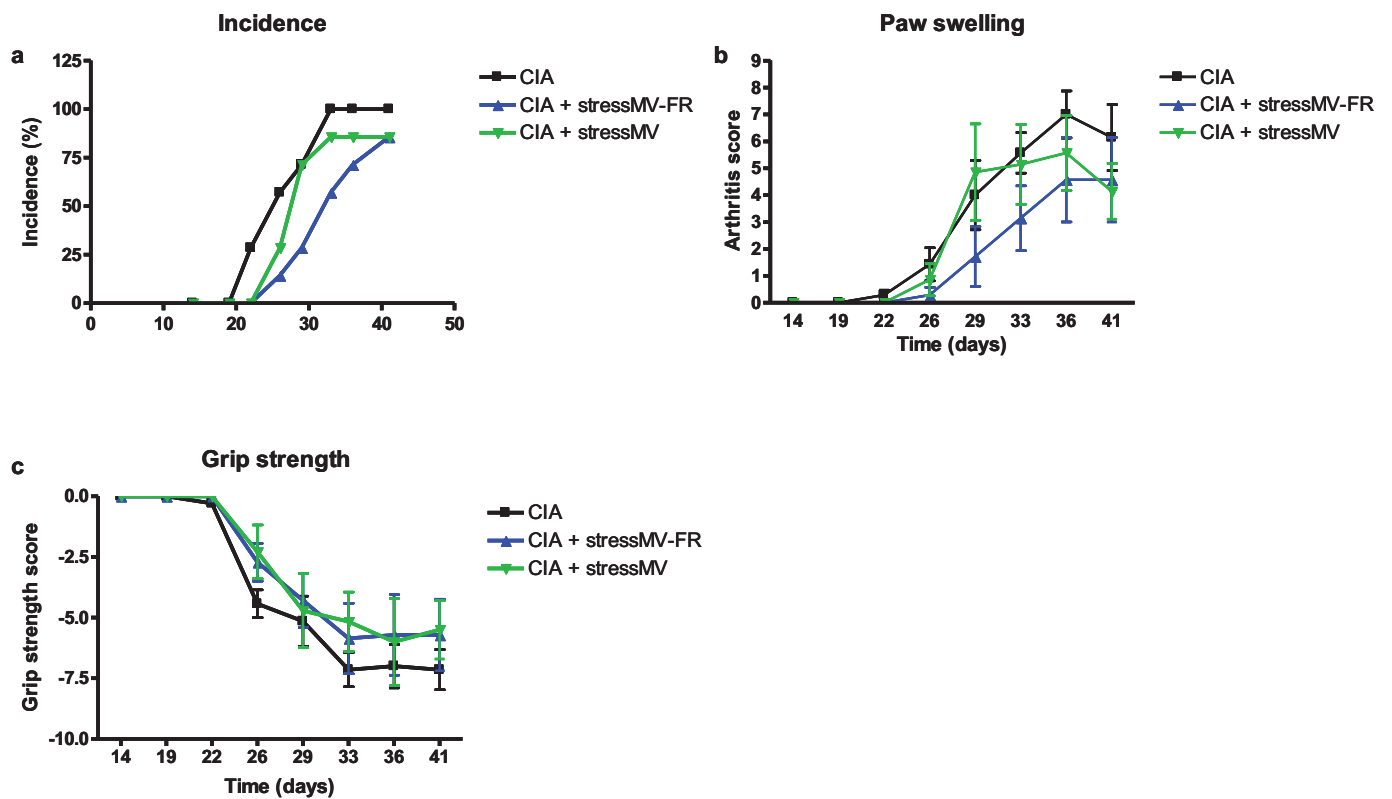
CE-C6-B8-A6-E5-0E-D1-13-D3-87-4F-49-88-87-29-DA-B2-B8-CF-8D



Slika 1 | Delno oksidirani MV aktivirajo celice BMDM preko TLR4 in povzročijo vnetje pri miškah. Aktivne MV (stressMV_s) smo izolirali iz HEK celic, ki so bile stimulirane z A23187. **(a)** BMDM-je iz C3H/HeN in C3H/HeJ miši smo stimulirali s stressMV in stressMV-FR, ki so bili popolnoma oksidirani s Fentonovo reakcijo (FR) 24 h. mIL-6 smo detektirali z ELISO. **(b)** V miške smo i.v. injicirali 300 000 stressMV in popolnoma oksidiranih stressMV-FR ter PBS. Po 24h oz. 6 dneh smo miškam odvzeli kri in z ELISO določili koncentracijo mIL-6.



Slika 2 | Strukturni podatki podpirajo aktivacijo TLR4/MD-2 kompleksa z delno oksidiranimi fosfolipidi. (a) HEK293T celice, ki so izražale TLR4 mutante F440A ali F463A in MD-2 so bile stimulirane s stressMV (5000 MV/ml) in LPS (100 ng/ml). (b) Bifazni koncentracijsko odvisen model aktivacije TLR4 z oksidiranimi fosfolipidi (ng/ml), ki je sestavljen iz seta treh povezanih ravnotežnih enačb med MD-2, LPS in oksidiranimi fosfolipidi. (c) Potrditev bifaznega modela. HEK293T celice, ki so izražale TLR4, MD-2 in CD14 so bile stimulirane z različnimi koncentracijami stressMV (MV/ml) (levo); 1 ng/ml LPS in stressMV (MV/ml) (desno).

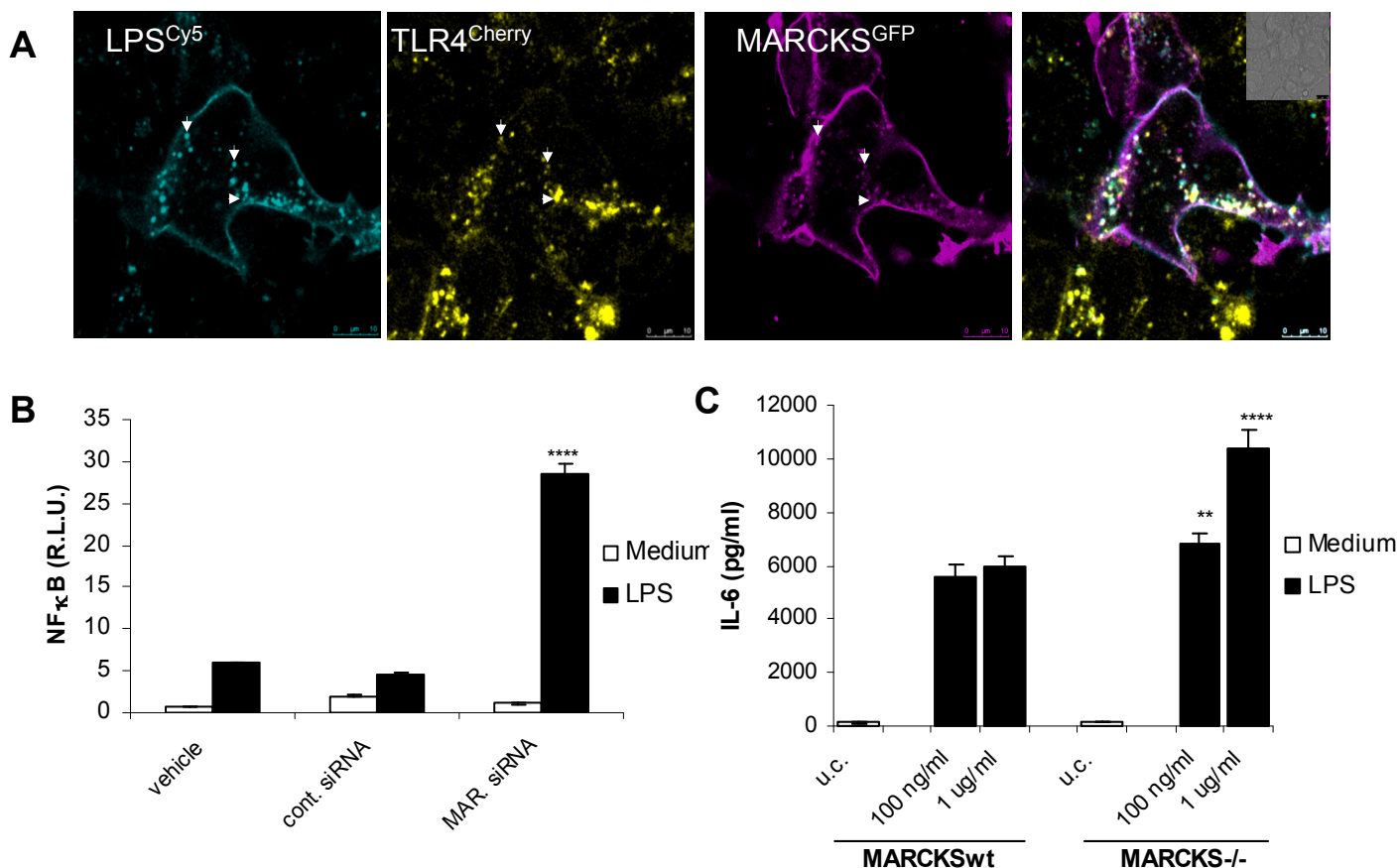


Slika 3 | Vpliv MV na razvoj s kolagenom inducirane artritisa pri miškah. DBA-J miškam (stare 7-8 tednov), ki smo jim inducirali artritisa s kolagenom, smo 7x (4 dni zapored, nato na 3 dni) injicirali stressMV in stressMV-FR (50 000 MV) oz. PBS v očesno veno. Opazovali smo razvoj bolezni (a), oteklino tačk (b) in moč oprijema (c). Miške, ki smo jim injicirali MV, so kasneje razvile znake artritisa, imele manj otečene tačke oz. se jim je stanje hitreje umirilo, zato so se tudi lažje oprijemale kletke.

VEDA

Področje: 7. Interdisciplinarne raziskave

Dosežek 1: MARCKS as a negative regulator of LPS signaling, Vir: Manček Keber Mateja, Benčina Mojca, Japelj Boštjan, Panter Gabriela, Andrä Jörg, Brandenburg Klaus, Triantafilou Martha, Triantafilou Kathy, Jerala Roman. The journal of immunology; 2012; Vol. 188, no. 8; str. 3893-3902; Impact Factor: 5.788.

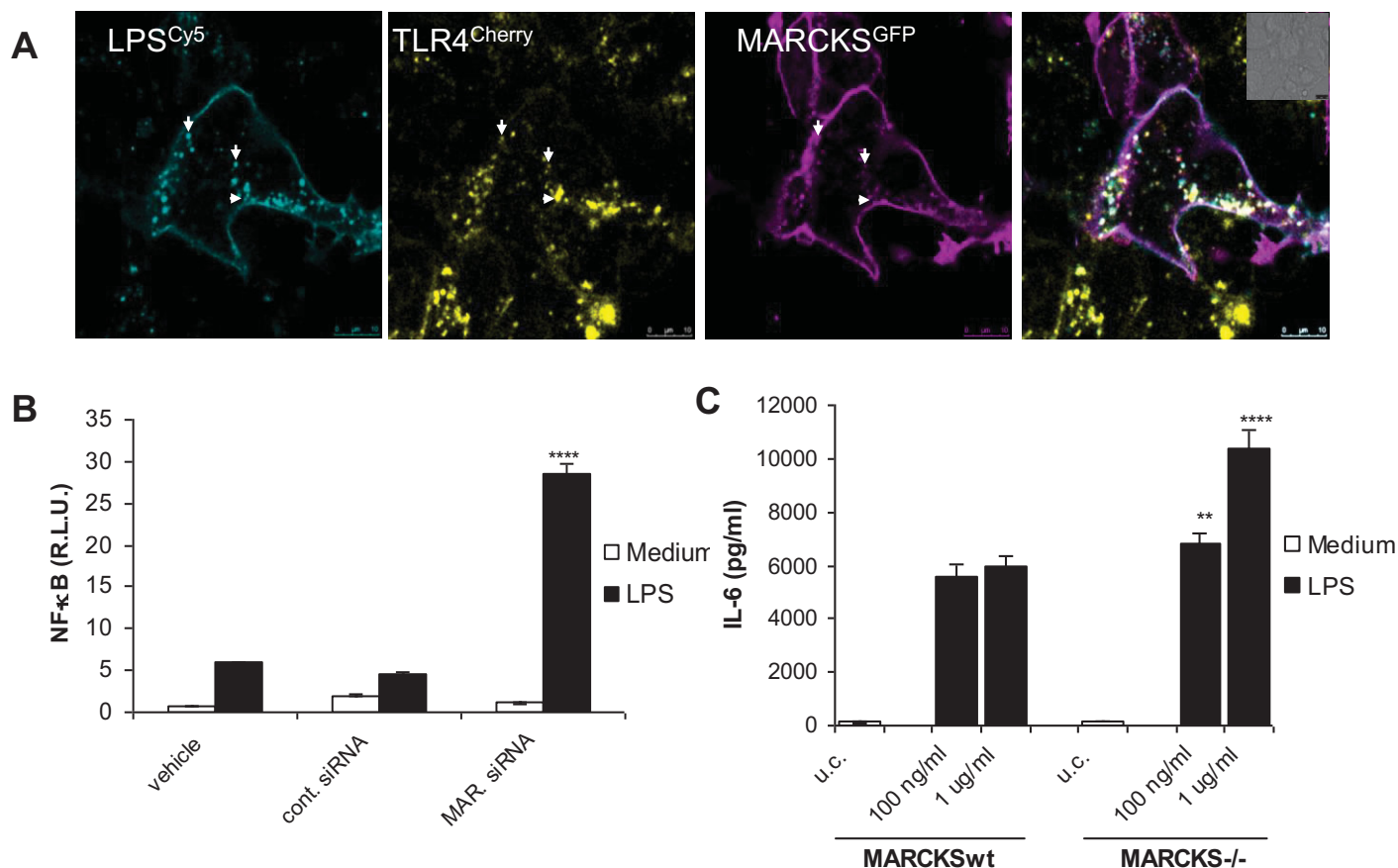


MARCKS (ang. myristoylated alanine-rich C kinase substrate) je naravno nezvit protein, ki posreduje pogovor med različnimi signalnimi potemi. Transkripcija proteina MARCKS je povečana po stimulaciji z bakterijskim lipopolisaharidom (LPS). Pokazali smo, da MARCKS specifično veže LPS. Po stimulaciji z LPS se MARCKS premakne s plazemske membrane v FYVE-pozitivne endosome, kjer kolocalizira z LPS (Slika 1a). V proteinu MARCKS okvarjene celice MEF (ang. mouse embryonic fibroblasts) se odzovejo na stimulacijo z LPS s povečano produkcijo IL-6 glede na divji tip celic MEF (Slika 1c). Podobne rezultate smo dobili z uporabo MARCKS siRNA (Slika 1b), medtem ko povečano izražanje MARCKS povzroči inhibicijo LPS signaliziranja. Ti rezultati kažejo, da čeprav se kompleks LPS/MD-2/TLR4 tvori na plazemski membrani, signalizira pretežno v endosomih in MARCKS z vezavo LPS prispeva k negativni regulaciji celičnega odgovora na bakterijski LPS.

VEDA

Področje: 7. Interdisciplinarne raziskave

Dosežek 1: MARCKS as a negative regulator of LPS signaling, Vir: Manček Keber Mateja, Benčina Mojca, Japelj Boštjan, Panter Gabriela, Andrä Jörg, Brandenburg Klaus, Triantafilou Martha, Triantafilou Kathy, Jerala Roman. The journal of immunology; 2012; Vol. 188, no. 8; str. 3893-3902; Impact Factor: 5.788.



MARCKS (ang. myristoylated alanine-rich C kinase substrate) je naravno nezvit protein, ki posreduje pogovor med različnimi signalnimi potemi. Transkripcija proteina MARCKS je povečana po stimulaciji z bakterijskim lipopolisaharidom (LPS). Pokazali smo, da MARCKS specifično veže LPS. Po stimulaciji z LPS se MARCKS premakne s plazemske membrane v FYVE-pozitivne endosome, kjer kolocalizira z LPS (Slika 1a). V proteinu MARCKS okvarjene celice MEF (ang. mouse embryonic fibroblasts) se odzovejo na stimulacijo z LPS s povečano produkcijo IL-6 glede na divji tip celic MEF (Slika 1c). Podobne rezultate smo dobili z uporabo MARCKS siRNA (Slika 1b), medtem ko povečano izražanje MARCKS povzroči inhibicijo LPS signaliziranja. Ti rezultati kažejo, da čeprav se kompleks LPS/MD-2/TLR4 tvori na plazemski membrani, signalizira pretežno v endosomih in MARCKS z vezavo LPS prispeva k negativni regulaciji celičnega odgovora na bakterijski LPS.