

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/45



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J7-4050
Naslov projekta	Oligomeri amiloidogenih proteinov od a do ž; biofizikalne lastnosti, struktura, funkcija in medsebojne interakcije
Vodja projekta	3368 Eva Žerovnik
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	7560
Cenovni razred	
Trajanje projekta	07.2011 - 06.2014
Nosilna raziskovalna organizacija	106 Institut "Jožef Stefan"
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta 2990 Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov, Ljubljana
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	7 INTERDISCIPLINARNE RAZISKAVE
Družbeno-ekonomski cilj	13.01 Naravoslovne vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	1 Naravoslovne vede 1.07 Druge naravoslovne vede

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

2. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Oligomeri proteinov, ki so nagnjeni k tvorbi fibril, so povezovalna tema tega projekta, ki sega preko raznih disciplin, od strukture višjih (od tetramere) oligomer, njihove vloge v kinetiki in termodinamiki procesa tvorjenja amiloidnih fibril, novih fiziko-kemijskih lastnosti oligomer,

interakcij oligomer z membranami in med seboj (interakcija proteina s peptidom) in celični fenomeni ki so posledica proteinske oligomerizacije in agregacije, kot na primer avtofagija in oksidativni stres. Študirali bomo pretežno oligomere stefina B – kot dober model (obstajajo protokoli, kako jih pripraviti), a ne samo te. Kot primerjavo bomo študirali druge proteine: α -sinuklein, kot predstavnika naravno odvitih proteinov, ki gradi Levijeva telesca pri Parkinsonovi bolezni, *ataksin*, ki je predstavnik proteinov s poliglutaminskimi ponovitvami in verjetno še enega dodatnega predstavnika globularnih proteinov poleg stefina B - β 2-mikroglobulin, ki se nalaga v sklepih in kosteh pacientov na dolgotrajni hemodializi. Študijem mehanizmov in strukture bomo dodali študije na celičnih kulturah, z namenom, da razjasnimo celične procese, ki spremljajo proteinsko agregacijo. Cistatini, vključno s stefinom B so udeleženi pri pomembnih fizioloških procesih in aleli njihovih genov lahko povečajo tveganje za Alzheimerjevo bolezen (AD). Na primer, pokazali so, da alel B cistatina C vodi do oviranega izločanja tega sekretornega proteina in poveča tveganje za AD. Nedavno so objavili študijo, da ima cistatin C neko vlogo pri avtofagiji, katera je glavni način, kako se proteinski agregati čistijo iz celice. Za stefin B, katerega mutacije povzročajo progresivno mioklonično epilepsijo tipa 1 (EPM1), so poročali, da zmanjša oksidativni stres in celično smrt (apoptozo), oziroma da se tadva procesa povečata, če stefin B ni prisoten v celicah. Pred kratkim so tudi poročali, da stefin B zmanjša avtofagijo, da torej ta proces boljše poteka v celicah KO miši, kar je izboljšša siceršnjo patologijo pri enem modelu miši za AD. Poleg vsega naštetega je stefin B udeležen pri izvorni imunosti, na še nepojasnen način. Mnogi od teh učinkov so neodvisni od katepsinov in predstavljajo druge, alternativne funkcije cistatinov kot je inhibicija proteaz. Študij celičnih učinkov oligomer in njihova interakcija z membranami tako stefin a B in EPM1 mutant kot tudi α -sinukleina in njegovih mutant, ki povzročajo familiarno PD, ima neposredni pomen za medicino in sicer molekularno in translacijsko medicino (Polajnar & Žerovnik, članek v Trends in Molecular Medicine). Ta **interdisciplinarni projekt** povezuje discipline, ki segajo od strukturnih, molekularnih in celičnih lastnosti **prefibrilarnih oligomer** do morebitne funkcije in patofiziologije.

ANG

Oligomers of amyloid forming proteins will be the connecting theme of this project, which will encompass cross-disciplinary aspects stemming from higher oligomers structure, their role in the kinetics and thermodynamics of amyloid fibril formation, novel physico-chemical properties of the oligomers, molecular interactions of the oligomers with membranes and among themselves (protein: peptide interactions) and cellular phenomena which occur as a consequence of protein oligomerization and aggregation, such as autophagy and oxidative stress. Protein protein interaction between the oligomers of stefin B (or β 2-mikroglobulin) and other amyloid peptides, such as alpha-synuclein (or amylin) will be measured by using surface plasmon resonance (SPR). We will study oligomers of a globular protein human stefin B– as a good model (protocols exist how to isolate them) but not exclusively. As comparison we will study alpha-synuclein from the class or natively unfolded proteins, which build Lewy bodies in Parkinson's disease and *ataxin* – which is representative of the polyglutamine repeats disorders and possibly another member of globular proteins - *β 2-mikroglobulin*, which is found deposited in joints and bones of patients undergoing long-term hemodialysis. The mechanistic and structural studies of the prefibrillar oligomers *in vitro* will be supplemented by cell culture studies, with an aim to reveal cellular processes accompanying protein aggregation. Cystatins, including stefin B, are involved in important physiological processes and their gene alleles may represent a risk for Alzheimer's disease (AD). Cystatin C allele-B undergoes impaired secretion and represents a risk factor for AD. As recent data show, cystatin C also has a role in autophagy, which is the primary means of clearance protein aggregates from the cell. Stefin B, whose mutations cause progressive epilepsy of type 1 (EPM1), on one side prevents oxidative stress and cell death (apoptosis), which are increased in stefin B KO mice. However, stefin B on the other side reduces autophagy, which means that autophagy proceeds to completion in stefin B KO cells, which helped to clear amyloid pathology in a mouse AD model. Stefin B also is involved, by an unknown mechanism, in innate immunity. Many of these effects are cathepsin independent and cystatins alternative functions to protease inhibition are suggested. Studying cellular and membrane phenomena caused by oligomerization and amyloid fibril formation of stefin B and its EPM1 mutants as well as alpha-synuclein and its mutants involved in PD, is of direct medical relevance; contributes to Molecular Medicine (paper by Polajnar & Žerovnik in Trends Molecular Medicine). The project will connect different disciplines and is thus interdisciplinary: it spans the fields from structure, molecular and cellular properties to eventual function and pathophysiology of the **prefibrillar**

oligomers.

3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

REALIZACIJA ciljev projekta: Večino zastavljenih ciljev smo dosegli.

1. Določili smo kristalno strukturo stefina B, ki je kristaliziral pri pH 10, iz začetnega stanja monomere, v razporeditvi podobni kanalčku (Renko et al. 2014, dosežek 1). Nadalje, smo pridobili kristale prepletene dimere stefina B in amiloida beta, a še ne v taki obliki, ki bi zagotavljala dovolj resolucije.

2. V sodelavi z univerzo v Sheffieldu, Paramore et al. 2012, Frontiers Molecular Neuroscience, smo s heteronuklearnim NMR karakterizirali prefibrilarno konformacijo, ki vodi v amiloidne fibrile. Topila in razmere (temperatura, pH), ki sprožijo agregacijo proteina do amiloidnih fibril, vodijo v destabilizacijo tako dimere kot tetramere v prid monomeri. Opazimo majhne, lokalizirane strukturne spremembe. Obstajata vsaj dve vrsti dimer in monomer stefina B, kar se je potrdilo z masno spektrometrijo. S pomočjo masne spektrometrije (ESI MS) in pa merjenjem kinetike pretvorb, smo v sodelavi s P. Palumaa (Uni. Tallinn) postavili izboljšan model fibrilacije stefina B s poudarkom na vlogi začetnih oligomerov (dosežek 4 – Taler-Verčič et al., 2013).

3. Biofizikalne lastnosti (absorbanca in fluorescenca) oligomer in fibrilov je študiral doktorski študent fizike Matjaž Žganec. Delo je v teku, trenutno se sicer ukvarja s simulacijami molekulske dinamike (Uni. Drexel, USA). Iz tega smo zaenkrat napisali poročilo, članek je v pripravi. Napisala sva tudi pregledni/ mnenjski članek (Žganec in Žerovnik, 2013, BBA General subjects)

4. Interakcijo z membranami smo študirali z α -sinukeinom (Katja Pirc, N. Poklar-Ulrih, nastalo je tudi doktorsko delo in članki so v pripravi, 1 članek je izšel v ACS). Ta nativno odvit protein ob interakciji z lipidi tvori nekaj α -heliksa in delno uredi membrano, a kakšne večje interakcije oziroma nastanka oligomerov ali por nismo opazili.

5. Interakcije oligomer stefina B z drugimi proteini kot amiloid-beta (kar je bilo že objavljeno¹⁻²), nismo uspeli izmeriti. Ta cilj je bil nekoliko preveč ambiciozno zastavljen, saj ga ni bilo mogoče izpolniti v okviru tega projekta.

6. Več od pričakovanega pa smo dobili na celicah. Preučevali smo, kako na celice (linije HEK in neuroblastoma) in pa primarni astrociti pridobljeni iz KO miši, vpliva agregacija drugih proteinov in kakšno vlogo ima pri tem stefin B. Iz tega dela sta izšla dva pomembna članka in eno doktorsko delo (PhD M. Polajnar, dosežka 2 in 3). Proteomska študija je pokazala na nekaj proteinov, ki sodelujejo pri tvorjenju proteinskih agregatov (članek v PLOS One, dosežek 3).

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

REALIZATION OF THE GOALS: We have achieved most of the goals (as stated above).

1. We determined a crystal structure of stefin B, which crystallized under more extreme conditions (of pH 10), starting from the monomer and arranged itself in a 3D lattice 3D resembling a channel (Renko et al., achievement 1). We also got crystals of a dimer of stefin B in complex with amyloid-beta that remains to be improved in order to attain a better resolution.

2. In collaboration with University of Sheffield, Paramore et al., 2012, Frontiers Mol.

Neuroscience, we characterised by heteronuclear NMR prefibrillar conformation, which leads towards amyloid fibrils. The solvent, pH and temperature conditions that lead to amyloid also lead to destabilization of dimeric and tetrameric states of the protein in favor of the monomer. Small, highly localized structural changes can be mapped out that allow us to visualize directly areas of the protein which eventually become responsible for triggering amyloid formation. We observed two different conformers of the dimer and monomer of stefin B, in accordance with mass spectrometry. By using ESI MS (electrospray mass spectrometry) to measure initial changes in the kinetics of transformations between lower oligomers, we in collaboration with P. Palumaa (Uni.Tallinn) obtained an improved model for fibrillation of stefin B (achievement 4 – Taler-Verčič et al., 2013).

3. Biophysical properties of the oligomers and fibrils, such as absorbance and fluorescence, were studied by PhD student of physics, Matjaž Žganec. The work is in progress; momentarily he performs simulations by molecular dynamics (Uni. Drexel, USA). From the results we wrote a report and we are preparing a paper. With M. Žganec we also wrote a review/opinion paper (Žganec and Žerovnik, 2013, BBA General subjects)

4. Interaction with membranes we studied on the case of α -synuclein (Katja Pirc, N. Poklar-Ulrih). K. Pirc defended from this work her PhD thesis and published a paper in ACS. A few more papers are in preparation. It proved that this natively unfolded protein in interaction with lipids gains some α -helical structure and stabilizes membranes of certain lipid composition. A stronger interaction, which would perturb or make pores into membranes, was not observed.

5. Interaction of the oligomers of stefin B with other proteins than amyloid-beta we did not measure (the former has been already published ahead of the present project¹⁻²). This goal was slightly too ambitious to perform within this project, due to lots of other work.

6. More than expected was achieved in experiments with cells. We found out, how protein aggregation (by stefin B) affects the cells (HEK and neuroblasoma cell lines) and how other proteins aggregate in primary KO mice astrocytes. A role of stefin B on aggregation of other proteins was observed. We published two important papers from these studies and a PhD thesis (PhD M. Polajnar, achievement 2 and 3). The proteomic study revealed interesting possible interactors between amyloid aggregates and other proteins (PLOS One paper).

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

Ni sprememb

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	27622183	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Delni nered v rotacijski kristalni mreži stefina B
<i>ANG</i>		Partial rotational lattice order-disorder in stefin B crystals	
Opis	<i>SLO</i>	Kristalna mreža stefina B (kristaliziral pri pH 10) sestoji iz 5 slojev tetramer: štiri sloji so dobro urejeni, čemur sledi sloj drugače postavljene tetramere.	
	<i>ANG</i>	The lattice of stefin B crystals (obtained at pH 10) is composed of five tetramer layers: four well ordered layers which are followed by an additional layer of alternatively placed tetramers.	
		Munksgaard; Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography;	

	Objavljeno v	2014; Vol. 70, no. 4; str. 1015-1025; Impact Factor: 7.232; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.946; A'': 1; A': 1; WoS: CO, CQ, DA, FI; Avtorji / Authors: Renko Miha, Taler-Verčič Ajda, Mihelič Marko, Žerovnik Eva, Turk Dušan	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
2.	COBISS ID	27799335	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Pridobljena toksična funkcija agregatov EPM1 mutant stefina B
		<i>ANG</i>	Gain in toxic function of stefin B EPM1 mutants aggregates
	Opis	<i>SLO</i>	V tem članku smo pokazali, da celice z agregati nekaterih EPM1 mutant (G50E in G4R pa tudi Q71P) hitreje odmirajo. Našli smo korelacijo, ne z množino ali velikostjo agregatov, ampak z njihovo zmožnostjo povečati ROS (Taki mutanti sta G4R in G50E). To se sklada z ugotovitvijo, da so bolj toksični manjši, topni oligomeri. Razlike v toksičnosti so odvisne od tega ali so agregati prefibrilarni – oligomerni ali fibrilarni. To pa je odvisno od 3D strukture, kjer so odвите mutante manj toksične. Zanimivo je, da wt stefin B, ki ob prekomerni ekspresiji tudi tvori razpršene aggregate v citoplazmi, pravtako poveča oksidativni stres, medtem ko ne zmanjša znatno preživetje celic (gre za kompenzacijski mehanizem med protektivno funkcijo tega proteina in toksičnostjo agregatov v stresnih razmerah za celico v odgovoru na napačno zvite in agregirane proteine – naslednji članek v PLOS One)
		<i>ANG</i>	In this paper we have shown that cells with certain EPM1 mutants aggregates (such as G50E, G4R and Q71P) increase cell death. A correlation exists between the aggregates ability to increase ROS and cell death. On the other hand, there was no correlation between the size and number of the aggregates and cell death. We suggest that differences in toxicity of the aggregates depend on whether they are in oligomeric/protofibrillar (soluble) or fibrillar form. This in turn likely depends on the mutant's 3D structure where unfolded proteins show lower toxicity. Of interest, wt stefin B at over expression also forms scattered aggregates and increases oxidative stress. However, cell viability is not affected that much, which shows that a compensatory mechanism is taking place with stefin B exerting a protective function against cellular protein misfolding stress – next paper in PLOS One.
	Objavljeno v	Elsevier; Biochimica et biophysica acta. BBA, Molecular cell research; 2014; Vol. 1843, no. 9; str. 2089-2099; Impact Factor: 5.297; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.814; A': 1; WoS: CQ, DR; Avtorji / Authors: Polajnar Mira, Zavašnik-Bergant Tina, Kopitar-Jerala Nataša, Tušek-Žnidarič Magda, Žerovnik Eva	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID	27852327	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Vloga stefina B v celičnem odgovoru na napačno zvite proteine in avtofagiji
		<i>ANG</i>	Human stefin B role in cell's response to misfolded proteins and autophagy
	Opis	<i>SLO</i>	Že nekaj časa se nakazujejo alternativne funkcije stefina B razen inhibicije katepsinov. Izolirani astrociti iz miši z izbitim genom za stefin B (KO) vsebujejo več razpršenih proteinskih agregatov kot wt astrociti. Če smo dodali stefin B monomere ali nižje oligomere v celični medij, se je ta fenotip popravil, agregatov je bilo manj, kar smo dokazali s konfokalno mikroskopijo. Analiza avtofagije je pokazala, da je ta process nefunkcionalen v KO astrocitih. To pa nadalje vodi do nalaganja proteinskih agregatov v KO celicah, saj je avtofagija ključen proces, ki očisti celice agregatov. Da bi določili proteine, ki obkrožajo

		agregate v wt in KO celicah, smo analizirali netopne celične frakcije (po ustreznem procesiranju) z masno spektrometrijo.
	ANG	discovered for stefin B. Astrocytes isolated from stefin B knockout (KO) mice exhibited an increased level of protein aggregates scattered throughout the cytoplasm. Addition of stefin B monomers or small oligomers to the cell medium reverted this phenotype, as imaged by confocal microscopy. Analysis of autophagy activity demonstrated that this pathway was less functional in KO astrocytes. This in turn contributes to accumulation of protein aggregates in KO cells, since autophagy is a key pathway for the clearance of intracellular protein aggregates. To monitor the identity of proteins embedded within aggregates in wild type (wt) and KO cells, the insoluble cell lysate fractions were isolated, solubilized and analyzed by mass spectrometry.
	Objavljeno v	Public Library of Science; PloS one; 2014; Vol. 9, no. 7; str. e102500-1-e102500-15; Impact Factor: 3.534; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.663; A': 1; WoS: RO; Avtorji / Authors: Polajnar Mira, Zavašnik-Bergant Tina, Škerget Katja, Vizovišek Matej, Vidmar Robert, Fonović Marko, Kopitar-Jerala Nataša, Petrovič Uroš, Navarro Susanna, Ventura Salvador, Žerovnik Eva
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
4.	COBISS ID	26998567 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Vloga začetnih oligomerov v amiloidni fibrilaciji človeškega stefina B ANG The role of initial oligomers in amyloid fibril formation by human stefin B
	Opis	SLO V članku smo predstavili izboljššan model za mehanizem fibrilacije stefina B. Tega smo dobili s simulacijo podatkov kinetike merjene s CD in ThT fluorescenco kot funkcijo koncentracije proteina in temperature. Gre za tipično polimerizacijo, ki se začne z lag fazo, kjer se kopičijo oligomeri. Ko pride do kritične mase (cca 60-meri) in konformacijske spremembe (skoraj popolnega odvitja, $E_a = 55$ kcal/mol) zrastejo protofibrili in nazadnje v plato fazi fibrili (verjetno igrajo vlogo prolina $E_a = 25$ kcal/mol). ANG In this paper we improved the model for the mechanism of fibrillation of stefin B. We simulated the kinetic data obtained by CD and ThT fluorescence as a function of protein concentration and temperature. We observe a typical polymerization that starts with a lag phase, where oligomers accumulate till a critical mass (cca 60-mers) and a conformational change (involving nearly a complete unfolding, $E_a = 55$ kcal/mol). Later protofibrils and fibrils grow, ending in a plateau phase (possibly leading by a proline isomerization, $E_a = 25$ kcal/mol).
	Objavljeno v	Molecular Diversity Preservation International MDPI; International journal of molecular sciences; 2013; Vol. 14, no. 9; str. 18362-18384; Impact Factor: 2.339; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.395; Avtorji / Authors: Taler-Verčič Ajda, Polajnar Mira, Tušek-Žnidarič Magda, Žganec Matjaž, Škarabot Miha, Vilfan Andrej, Žerovnik Eva
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
5.	COBISS ID	24607527 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Okvarjena avtofagija ANG Impaired autophagy
	Opis	SLO Predlagamo, da je okvarjena avtofagija skupna nevrodegenerativnim boleznim NDs in progresivnim mioklonским epilepsijam –PMEs. V nekaterih PME, kot na primer Lafora bolezen, obstaja jasna evidenca za takšno okvaro. Po drugi strani pa so objave, kjer so pokazali, da je avtofagija prizadeta tudi v AD, tudi zaradi povečanja proteinskih

		agregatov, ki jih mora odstraniti. Take ugotovitve nakazujejo možnost novih terapij, ki bi bazirale na pospeševanju avtofagije.
	ANG	We suggest that impaired autophagy could be in common to neurodegenerative diseases – NDs and progressive myoclonus epilepsies – PMEs. In some of the PMEs, as for example Lafora disease, evidence exists for such an impairment. On the other side some authors have shown that autophagy is impaired in AD, on account of protein aggregates, which have to be cleared from the cell. Such new data imply new therapies based on autophagy enhancement.
Objavljeno v		Elsevier Science; Trends in molecular medicine; 2011; Vol. 17, no. 6; str. 293-299; Impact Factor: 10.355; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.978; A'': 1; A': 1; WoS: CQ, DR, QA; Avtorji / Authors: Polajnar Mira, Žerovnik Eva
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

Družbeno-ekonomski dosežek			
1.	COBISS ID	26013479	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Primer stefinov	
		ANG The case study of stefins	
	Opis	SLO The case study of stefins : towards a general mechanism of amyloid-fibril formation?. Barcelona: Institut of Biotechnology and Medicine, 13. jul. 2012	
		ANG The case study of stefins : towards a general mechanism of amyloid-fibril formation?. Barcelona: Institut of Biotechnology and Medicine, 13. jul. 2012	
	Šifra	B.04 Vabljeno predavanje	
	Objavljeno v	Institut of Biotechnology and Medicine; 2012; Avtorji / Authors: Žerovnik Eva	
	Tipologija	3.14 Predavanja na tuji univerzi	
2.	COBISS ID	512143641	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO Uredniški odbor mednarodne revije	
		ANG Editorial board of international journal	
	Opis	SLO Amyloid. Žerovnik, Eva (član uredniškega odbora 2005-). Carnforth: Parthenon. ISSN 1350-6129. [COBISS.SI-ID 512143641] kategorija: 2G (Z) točke: 100	
		ANG Amyloid. Žerovnik, Eva (editorial board from 2005-). Carnforth: Parthenon. ISSN 1350-6129. [COBISS.SI-ID 512143641] kategorija: 2G (Z) točke: 100	
	Šifra	C.04 Uredništvo mednarodne revije	
	Objavljeno v	revija	
	Tipologija	4.00 Sekundarno avtorstvo	
3.	COBISS ID	5029402	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO Urednik specialnega zvezka o cistatinih in stefinih (2012)	
		ANG Editor of a topic on cystatins and stefins (2012)	

Opis	SLO	Frontiers in molecular neuroscience. Žerovnik, Eva (urednik 2011-). Lausanne: Frontiers Research Foundation, 2008-. ISSN 1662-5099. http://www.frontiersin.org/molecularneuroscience/ . [COBISS.SI-ID 5029402] kategorija: 2G (Z) točke: 100	
	ANG	Frontiers in molecular neuroscience. Žerovnik, Eva (urednik 2011-). Lausanne: Frontiers Research Foundation, 2008-. ISSN 1662-5099. http://www.frontiersin.org/molecularneuroscience/ . [COBISS.SI-ID 5029402] kategorija: 2G (Z) točke: 100	
Šifra	C.03 Vabljeni urednik revije (guest-associated editor)		
Objavljeno v	revija		
Tipologija	4.00 Sekundarno avtorstvo		
4.	COBISS ID		Vir: vpis v poročilo
Naslov	SLO	Mentor študentom	
	ANG	Supervisor of PhD students	
Opis	SLO	V letih 2013 in 2014 sta dokončali svoja doktorska dela Ajda Taler Verčič in Mira Polajnar. V celoti sem bila mentor cca 6 študentom.	
	ANG	In the years 2013 and 2014 PhD theses by Ajda Taler-Verčič and MIRA Polajnar were defended. In total I have supervised cca 6 students.	
Šifra	D.09 Mentorstvo doktorandom		
Objavljeno v	COBISS		
Tipologija	2.08 Doktorska disertacija		
5.	COBISS ID	28101415	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Slikanje amiloidov	
	ANG	Imaging amyloid	
Opis	SLO	Uvodnik v revije, kjer sem urednik	
	ANG	Editorial in the journal I am an Editor	
Šifra	F.35 Drugo		
Objavljeno v	Austin Publishing Group; Journal of molecular biology and molecular imaging; 2014; Vol. 1, no. 2; str. 1-2; Avtorji / Authors: Žerovnik Eva		
Tipologija	1.03 Kratki znanstveni prispevek		

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine^z

MUŠEVIČ, Igor, ŠKARABOT, Miha, HUMAR, Matjaž. Direct and inverted nematic dispersions for soft matter photonics. Journal of physics, Condensed matter, ISSN 0953-8984, 2011, vol. 23, no. 28, str. 284112-1-284112-7, doi: 10.1088/0953-8984/23/28/284112. [COBISS.SI-ID 24853031], [JCR, SNIP, WoS do 5. 1. 2015: št. citatov (TC): 12, čistih citatov (CI): 10, čistih citatov na avtorja (CIAu): 3.33, normirano št. čistih citatov (NC): 3, Scopus do 7. 1. 2015: št. citatov (TC): 13, čistih citatov (CI): 10, čistih citatov na avtorja (CIAu): 3.33, normirano št. čistih citatov (NC): 3]
kategorija: 1A1 (Z, A', A1/2); uvrstitev: SCI, Scopus, MBP; tipologijo je verificiral OSICN točke: 33.33, št. avtorjev: 1/3

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine^s

9.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Naše študije so bazične narave, a so orientirane v razumevanje molekularnih osnov neurodegenerativnih bolezni kot je npr. Alzheimerjeva bolezen (AD), Parkinsonova bolezen, amiotropična lateralna skleroza (ALS), idr. Študije EPM1 mutant stefina B pa prispevajo k razumevanju vsaj dela patologije te progresivne mioklonične epilepsiji, ki je tudi delno neurodegenerativna bolezen.

Pričakujemo, da bo več znanja o lastnostih oligomer amiloidogenih proteinov dolgoročno pripomoglo v iskanju terapije za neurodegenerativne bolezni. Namreč, oligomeri amiloidogenih proteinov so se izkazali za toksične in so najverjetneje glavni igralci v patološki kaskadi v AD in drugih neurodegenerativnih boleznih. Interakcija z membranami (taki oligomeri delajo pore v membrane) predstavlja možni mehanizem citotoksičnosti. Ker struktura oligomer ni znana, pravitako ni znana konformacija ob membranah, so to trenutno zelo pereča vprašanja. Izviren je naš namen, da bi določili doslej nepreskušene biofizikalne lastnosti amiloidnih oligomer in fibril kot so optične in električne lastnosti.

Kdo bi lahko vprašal, zakaj so stefini dober model za študij zvižanja in agregacije? Prvič, znane so 3D strukture tako stefina A in B in pred kratkim je bila določena struktura tetramere stefina B (1), pravitako je znan model za strukturo fibril (2). Naša grupa je stefine dodobra preštudirala, tako njihovo stabilnost, zvitje in tvorbo amiloidnih fibril, ki pri stefinu B poteka pod milimi – fiziološko relevantnimi pogoji, v primerjavi z stefinom A ali cistatinom C. Študirali smo tudi vpliv sekvence (s pripravo himernih stefinov) in vlogo nekaterih ohranjenih prolinov, kar smo vse opisali v preglednem članku v reviji Biochimie (3).

1. nova osnovna znanja in potencialno uporaba za translacijsko medicino
Modelne študije, posredno pojasnjujejo molekularne mehanizme neurodegenerativnih bolezni (9-10). Mehanizem proteinske agregacije do amiloidnih fibril in toksičnost, ki jo povzročajo predvsem topni oligomeri in prefibrilarni agregati, sta dve najbolj pereči vprašanji današnje nevroznanosti. Danes obstaja prepričanje, da so celični vključki-agresomi ali ekstracelične lehe manj toksični kot so topne oligomere.

2. Drugi družbeno-ekonomskimi dosežki

C.06: članstvo v uredniškem odboru specialistične revije Amyloid :
Žerovnik, Eva (member of editorial board 2005-). Carnforth: Parthenon. ISSN 1350-6129. [COBISS.SI-ID 512143641] Amyloid, the international journal of experimental and clinical investigation. Časopis "International Society of Amyloidosis"

G Učinki aplikativnih raziskav

G.01 / G.01.02 Razvoj podiplomskega izobraževanja

1.Uvajanje novega raziskovalnega področja in predmeta na podiplomskem izobraževanju MPŠ Jožefa Stefana. Ima dva predmeta na podiplomskem študiju

<http://www.mps.si/splet/studij.asp?lang=slo&main=1&left=4&id=457&m=4>

Je nosilka izmenjave ERASMUS s Tehnično univerzo v Talinu, Estonia

G.09 Osnovne raziskave za zdravje in iskanje novih terapij: „Molekularna medicina“

Pregledni članek z naslovom: Protein Conformational Pathology in Alzheimer's and Other Neurodegenerative Diseases; New Targets for Therapy, je izšel v Current Alzheimer's Research (CAR)(11).

Povezava s privatno kliniko in farmacevtskim sektorjem

IRCCS Institute, Brescia študira vlogo cistatina C kot faktorja tveganja za Alzheimerjevo bolezen. Želijo si te študije razširiti tudi na stefin B (tudi imenovan cistatin B) kot morebiten rizični faktor za Alzheimerjevo in frontotemporalno demenco. S to privatno kliniko sodelujemo že vrsto let in smo prijavili več EU projektov, nazadnje ITN Marie Curie projekt. Tudi LEK Pharmaceuticals d.d., (Novartis, Sandoz group) del multinacionalne farmacevtske družbe se zanima za take študije.

ANG

Our studies are of basic nature, however, they are oriented to gain understanding of molecular backgrounds of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), etc. Studies of EPM1 mutants of stefin B contribute to

understanding at least some part of pathology of this progressive myoclonus epilepsy, which also can be regarded as neurodegenerative process.

More knowledge of the properties of oligomers will help in search for therapies for this kind of diseases. Oligomers of amyloid forming proteins proved cytotoxic and are main players in the pathological cascade in AD and other neurodegenerative conditions. Interaction with membranes (even making pores into membranes) is likely the key mechanism of their cytotoxic action. As the structure of the oligomers is not known, as well conformation at membranes is not clear, these remain open and hot questions. Original is our goal to study as yet unknown, novel biophysical properties of the prefibrillar oligomers (and amyloid fibrils), such as optical and electrical properties.

One could wonder, why using stefins as a primary model? One good reason is that 3D structures of stefins A and B have been determined and lately the structure of its tetramer (1) as well as the model for the fibrils (2), which renders them especially suitable for such studies. Stefins have been studied thoroughly by our group from stability, folding to amyloid fibril formation, which in contrast to stefin A or cystatin C occurs under mild, physiologically relevant conditions. Sequential influences (by studying chimeras) and role of the conserved prolines have been studied, resulting in many general findings (as reviewed Biochimie) (3).

1. New knowledge with potential application to translational medicine.

Model studies which explain basic molecular mechanisms taking place in neurodegenerative conditions (9,10). The mechanism of protein aggregation to amyloid fibrils and toxicity exerted by the soluble oligomers and prefibrillar aggregates, are two most challenging questions of the today's neuroscience. It is believed that cellular inclusions - aggresomes or extracellular plaques are less toxic than the soluble oligomers.

2. Other important contributions

C.06: Editorial board of Amyloid. Žerovnik, Eva (member of editorial board 2005-). Carnforth: Parthenon. ISSN 1350-6129. [COBISS.SI-ID 512143641] Amyloid, the international journal of experimental and clinical investigation. Official journal of the "International Society of Amyloidosis"

G Applications of research

G.01 / G.01.02 Contribution to postgraduate Education

1. Introduction of a new research field on postgraduate education at J.Stefan's International Postgraduate School (IPS). PI holds two courses at IPS.

<http://www.mps.si/splet/studij.asp?lang=slo&main=1&left=4&id=457&m=4>

2. PI has ERASMUS exchange grant with Technical University of Tallinn, Estonia.

G.09 Basic research for Health in search of new therapies: „molecular medicine“,

A review paper entitled: Protein Conformational Pathology in Alzheimer's and Other Neurodegenerative Diseases; New Targets for Therapy, was published in Current Alzheimer Research, 2010, 7, 74-83. IF= 4.1) (11).

Connection to private health and pharma sector:

The IRCCS Institute in Brescia will study the role of stefin B as a risk factor for neurodegenerative diseases (i.e. Alzheimer disease and Frontotemporal dementia). As well, LEK Pharmaceuticals d.d., (Novartis, Sandoz group) part of multi-national pharmaceutical company is interested in the results and future co-operation.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Stefin B pa ni le odličen model za študije mehanizma amiloidne fibrilacije in toksičnosti, ki bi ga smeli posplošiti na številne druge globularne proteine, predvsem tiste, ki tvorijo prepletene dimere, ampak je tudi fiziološko pomemben protein. V letu 2010 smo objavili študij interakcije stefina B v oligomerni obliki s amiloidom-beta tako in vitro kot ko-lokalizacijo v celici - kar postavlja stefin B direktno v povezavo z Alzheimerjevo boleznijo (4). Poleg tega so (Lehtinen et

al. 2009) poročali, da se v KO celicah brez stefina B poveča oksidativni stres (5) in pa, da cistatin C pospešuje avtofagijo (6). Avtofagija je proces, ki proteinske agregate odtraja iz celice in ima pomembno vlogo pri nevrodegenerativnih boleznih. Odsotnost stefina B izboljša patologijo modela AD (7-8), kar nadalje kaže na potrebo po razumevanju nove funkcije tega proteina.

Funkcija stefina B ni povsem pojasnjena, bolj ali manj znano je, da ima dodatne funkcije poleg inhibicije proteaz. Nepojasnjena je vloga stefina B pri preprečevanju oksidativnega stresa in izvorni (innate) imunosti. Ena možna funkcija, ki smo jo predlagali, je šaperonska, da oligomeri vežejo amiloidne peptide in preprečujejo njihovo agregacijo. Če bi se izkazalo, da EPM1 mutante nimajo enake funkcije vezave amiloida-beta, bi to imelo implikacije za patologijo EPM1. Podobno bi imela vezava α -sinukleina na oligomere stefina B pomembne implikacije za Parkinsonovo bolezen.

Celične študije se neposredno navezujejo na dejansko patologijo tako AD kot EPM1. Markerji proteinske agregacije, ki jih predvidoma povzročajo agregati stefina B in predvsem določene EPM1 mutante (določali smo markerje za oksidativni stres in avtofagijo) bi lahko bili skupni med EPM1 in nevrodegenerativnimi boleznimi (POLAJNAR, Mira, ŽEROVNIK, Eva. Impaired autophagy : in common to neurodegenerative diseases and progressive myoclonal epilepsy. Trends mol. med., IF (2009) = 11.049) (9). Podobna sugestija velja za nevropsihiatrične bolezni (10).

1. Jenko Kokalj, S., et al. Essential role of proline isomerization in stefin B tetramer formation. *J Mol Biol* 366, 1569-1579 (2007).
2. Morgan, G.J., et al. Exclusion of the native alpha-helix from the amyloid fibrils of a mixed alpha/beta protein. *J Mol Biol* 375, 487-498 (2008).
3. Zerovnik, E., Staniforth, R.A. & Turk, D. Amyloid fibril formation by human stefins: Structure, mechanism & putative functions. *Biochimie* 92, 1597-1607 (2010).
4. Skerget, K., et al. Interaction between oligomers of stefin B and amyloid-beta in vitro and in cells. *J Biol Chem* 285, 3201-3210 (2010).
5. Lehtinen, M.K., et al. Cystatin B deficiency sensitizes neurons to oxidative stress in progressive myoclonus epilepsy, EPM1. *J Neurosci* 29, 5910-5915 (2009).
6. Tizon, B., et al. Induction of autophagy by cystatin C: a mechanism that protects murine primary cortical neurons and neuronal cell lines. *Plos One* 5, e9819.
7. Kaur, G. & Levy, E. Cystatin C in Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci* 5, 79 (2012).
8. Kaur, G., et al. Cystatin C rescues degenerating neurons in a cystatin B-knockout mouse model of progressive myoclonus epilepsy. *Am J Pathol* 177, 2256-2267.
9. Polajnar, M. & Zerovnik, E. Impaired autophagy: a link between neurodegenerative diseases and progressive myoclonus epilepsies. *Trends Mol Med* 17, 293-300 (2011).
10. Polajnar, M. & Zerovnik, E. Impaired autophagy: a link between neurodegenerative and neuropsychiatric diseases. *J Cell Mol Med* (2014).
11. Zerovnik, E. Protein conformational pathology in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases; new targets for therapy. *Curr Alzheimer Res* 7, 74-83 (2010).

ANG

Stefin B is not only an excellent model to study mechanisms of amyloid fibril formation and toxicity, which can be generalised to other proteins, mostly the globular ones – which form domain-swapped oligomers but it also is physiologically important protein. In 2010 we have published our study of the interaction of stefin B with amyloid-beta in vitro and co-localization in cells, which brings stefin B in direct connection to AD (4). Apart from this, Lehtinen et al., 2009 have reported that in KO stefin B cells oxidative stress gets increased (5) and that cystatin C induces autophagy (6). This latter is a process which clears protein aggregates from the cell and has a major role in neurodegenerative diseases. Recently, another study was published, where they have shown that absence of stefin B ameliorates pathology in a mouse AD model (7-8). Altogether, this demonstrates that new functions of this protein have to be studied.

Function of stefin B is far from clear. Its function as a protease inhibitor is not the only one – as clearly shown by recent studies. How does it prevent oxidative stress and what role it may have in innate immunity? One possible function, which we have proposed is acting chaperone-like, as the oligomers might bind other amyloid peptides and thus prevent their aggregation. If it would be proven that EPM1 mutants loose such a protective function, this would certainly have implications for EPM1 disease. Similarly, binding of α -synuclein to stefin B would have important

implication to PD.

Cellular studies are directly relevant to pathology of AD and EPM1. Markers of protein aggregation, which we think stefin B influences and especially so some EPM1 mutants (we measured markers of oxidative stress and autophagy) could be in common between EPM1 and neurodegenerative diseases, which would prove our opinion (POLAJNAR, Mira, ŽEROVNIK, Eva. Impaired autophagy : in common to neurodegenerative diseases and progressive myoclonal epilepsy. Trends mol. med., IF (2009) = 11.049) (9). Similar conclusion might apply to neurodegenerative disease (10).

1. Jenko Kokalj, S., et al. Essential role of proline isomerization in stefin B tetramer formation. J Mol Biol 366, 1569-1579 (2007).
2. Morgan, G.J., et al. Exclusion of the native alpha-helix from the amyloid fibrils of a mixed alpha/beta protein. J Mol Biol 375, 487-498 (2008).
3. Zerovnik, E., Staniforth, R.A. & Turk, D. Amyloid fibril formation by human stefins: Structure, mechanism & putative functions. Biochimie 92, 1597-1607 (2010).
4. Skerget, K., et al. Interaction between oligomers of stefin B and amyloid-beta in vitro and in cells. J Biol Chem 285, 3201-3210 (2010).
5. Lehtinen, M.K., et al. Cystatin B deficiency sensitizes neurons to oxidative stress in progressive myoclonus epilepsy, EPM1. J Neurosci 29, 5910-5915 (2009).
6. Tizon, B., et al. Induction of autophagy by cystatin C: a mechanism that protects murine primary cortical neurons and neuronal cell lines. Plos One 5, e9819.
7. Kaur, G. & Levy, E. Cystatin C in Alzheimer's disease. Front Mol Neurosci 5, 79 (2012).
8. Kaur, G., et al. Cystatin C rescues degenerating neurons in a cystatin B-knockout mouse model of progressive myoclonus epilepsy. Am J Pathol 177, 2256-2267.
9. Polajnar, M. & Zerovnik, E. Impaired autophagy: a link between neurodegenerative diseases and progressive myoclonus epilepsies. Trends Mol Med 17, 293-300 (2011).
10. Polajnar, M. & Zerovnik, E. Impaired autophagy: a link between neurodegenerative and neuropsychiatric diseases. J Cell Mol Med (2014).
11. Zerovnik, E. Protein conformational pathology in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases; new targets for therapy. Curr Alzheimer Res 7, 74-83 (2010).

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 <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/varovanju 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

Situacija v slovenski znanosti je vsako leto slabša. Zelo težko je priti do denarja za projekte. Seveda pa upam, da bom na področju interdisciplinarnih raziskav pridobila še en domači projekt na podobno temo, da to delo (v nastajanju) nadaljujemo.

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	<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="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					
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj					
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					
G.09.	Drugo:					

Komentar

The situation re. finances in Slovene science is difficult, each year it is harder to obtain project money. However, I hope to obtain a new home project in interdisciplinary fields of biomedicine and biochemistry and molecular and structural biology that the work (in progress) can continue.

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 2014¹²

13.1. Izjemni znanstveni dosežek

POLAJNAR, Mira, ŽEROVNIK, Eva. Impaired autophagy : a link between neurodegenerative diseases and progressive myoclonus epilepsies. Trends in molecular medicine, ISSN 1471-4914, 2011, vol. 17, no. 6, str. 293-299, doi: 10.1016/j.molmed.2011.02.005. [COBISS.SI-ID 24607527], [JCR, SNIP, WoS do 11. 11. 2014: št. citatov (TC): 7, čistih citatov (CI): 4, kategorija: 1A1 (Z, A", A', A1/2); uvrstitev: SCI, Scopus, MBP; tipologijo je verificiral OSICN točke: 182.85

in POLAJNAR, Mira, ŽEROVNIK, Eva. Impaired autophagy : a link between neurodegenerative and neuropsychiatric diseases. Journal of Cellular and Molecular Medicine, ISSN 1582-4934, 2014, vol. 18, issue 9, str. 1705-1711, doi: 10.1111/jcmm.12349. [COBISS.SI-ID 27886375], [JCR, SNIP, WoS do 2. 2. 2015: št. citatov (TC): 1, čistih citatov (CI): 1, čistih citatov na avtorja (CIAu): 1.00, kategorija: 1A1 (Z, A', A1/2); uvrstitev: SCI, Scopus, MBP; tipologijo je verificiral OSICN točke: 101.88, št.

13.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Naša poglavja v knjigah kažejo, da se modelni sistem oligomer stefina B uveljavlja. To pomeni promocijo in priznanje za slovensko znanost.

ŽEROVNIK, Eva. On possible function and toxicity of multiple oligomeric/conformational states of a globular protein human stefin B. V: UVERSKY, Vladimir N. (ur.), LYUBCHENKO, Yury (ur.). Bio-nanoimaging : protein misfolding & aggregation. Amsterdam [et al.]: Elsevier, 2014, str. 263-270, doi: 10.1016/B978-0-12-394431-3.00024-9. [COBISS.SI-ID 27360295], [Scopus do 4. 8. 2014: št. citatov (TC): 0, čistih citatov (CI): 0, čistih citatov na avtorja (CIAu): 0, normirano št. čistih citatov (NC): 0] kategorija: 3B (Z, A', A1/2); tipologijo je verificiral OSICN točke: 30, št. avtorjev: 1/1

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"

Eva Žerovnik

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana

10.3.2015

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/45

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 / prepišite 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 2014 (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 priložitev/-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/2015 v1.00a

1F-D0-55-A0-B7-3C-5B-DF-03-70-FF-68-DE-1F-D7-E3-6B-E2-18-32