

Oznaka poročila: ARRS-RPROG-ZP-2015/6



## ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROGRAMA

(za obdobje 1. 1. 2009 - 31. 12. 2014)

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROGRAMU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem programu

<b>Šifra programa</b>	P1-0207
<b>Naslov programa</b>	Toksini in biomembrane Toxins and Biomembranes
<b>Vodja programa</b>	412 Igor Križaj
<b>Obseg raziskovalnih ur (vključno s povečanjem financiranja v letu 2014)</b>	67320
<b>Cenovni razred</b>	
<b>Trajanje programa</b>	01.2009 - 12.2014
<b>Izvajalci raziskovalnega programa (javne raziskovalne organizacije - JRO in/ali RO s koncesijo)</b>	106 Institut "Jožef Stefan" 103 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo 481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
<b>Raziskovalno področje po šifrantu ARRS</b>	1 NARAVOSLOVJE 1.05 Biokemija in molekularna biologija
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	07. Zdravje
<b>Raziskovalno področje po šifrantu FOS</b>	1 Naravoslovne vede 1.06 Biologija

### B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROGRAMA

#### 2. Povzetek raziskovalnega programa<sup>1</sup>

SLO

Temeljni namen raziskav programske skupine je bil pridobivanje novih spoznanj na

področju človeške in živalske patofiziologije v korist izboljšanja zdravja ljudi in živali. Del svojih aktivnosti smo posvetili tudi pridobivanju ekonomsko pomembnih bioproductov s pomočjo mikroorganizmov. Poudarek naših raziskav v preteklem obdobju je bil na raziskavah toksinov, ki vplivajo na živčni in krvožilni sistem. Raziskave molekularnega mehanizma delovanja nevrotoksičnih sekretornih fosfolipaz A2 (sPLA2) smo poglobili in razširili na študij delovanja in regulacije človeških ortologov. Še posebej smo se ukvarjali z raziskavami vloge človeških sPLA2 pri raku na dojki. Na molekularnem nivoju smo opisali komponente modrasovega strupa, ki so najbolj odgovorne za porušenje hemostaze pri človeku. Nekateri od teh molekul predstavljajo zelo obetavno osnovo za razvoj zdravih učinkovin (anti-trombotika in anti-koagulantov). Na področju raziskav molekularne organizacije lipidnih mikro- in nanodomov smo se posvečali preučevanju specifičnih interakcij proteinskih tvorcev transmembranskih por z lipidnimi komponentami umetnih lipidnih in celičnih membran ter z mehanizmi njihovega vpliva na morfologijo in funkcionalnost membran. Nekateri toksini-tvorci por se zelo selektivno vežejo na holesterol/sfingomielinska področja v bioloških membranah in so se izkazali kot zelo uporabna molekularna orodja za označevanje membranskih lipidnih domen. Raziskovali smo farmakološko zanimive snovi iz morskih organizmov, predvsem spužev, s protibakterijsko ali antiholinesterazno aktivnostjo, na osnovi katerih si obetamo razvoj nove vrste antibiotika in učinkovine za nadzor delovanja holinergičnega sistema. Med drugim smo raziskovali smo zaviralni učinek polialkilpiridinijevih soli iz spužve na delitev tumorskih celic. Raziskovali smo vlogo presnove in signalizacije lipidov pri patofizioloških procesih pri človeku. Spremembe v lipidnem metabolizmu so namreč ključnega pomena pri najbolj pereh sodobnih boleznih, kot so metabolični sindrom, diabetes, kardiovaskularne bolezni in rak. Preučevali smo vlogo encimov sPLA2, še zlasti človeške sPLA2 iz skupine X (hGX), pri presnovi maščobnih kislin in kopičenju lipidov na ravni organizma. Eno od pomembnih odkritij na tem področju je, da hGX deluje kot pomemben modulator osnovnega lipidnega metabolizma in preživetja rakavih celic. Raziskovali in pojasnili smo nastanek, evolucijo in funkcionalno diverzifikacijo različnih komponent v genomih prokariotov in evkariotov, evolucijo genomov po velikih ekoloških katastrofah ter nastanek in evolucijo proteinskih družin, ki so pridobile pomembne regulatorne vloge. Med obetavnimi alternativnimi viri za energetiko in kemijsko industrijo so lipidi, pridobljeni z mikroorganizmi iz lignocelulozne biomase. S pomočjo doma razvite tehnike določanja kazalnih genov za poligeneske lastnosti, kakršna je tudi sposobnost kopičenja lipidov, smo začeli preučevati sposobnost industrijskih sevov mikroorganizmov (pretežno kvasovk) za pretvorbo lignocelulozne biomase v, na primer, biodizel.

ANG

The main purpose of the proposed programme was acquisition of new knowledge about mammalian pathophysiology with the aim to improve human and animal health. Part of the activities was dedicated also to acquisition of economically important bioproducts using microorganisms. The emphasis of our research was on toxins that interfere with nervous and haemato-vascular system. Our studies of the molecular mechanism of action of neurotoxic secreted phospholipases A2 (sPLA2s) were deepened and expanded also to studying the function and regulation of their human orthologues. On the molecular level, we described the main components of the nose-horned viper venom responsible to interfere with the human haemostatic system. In the area of research of molecular organisation of membrane lipid micro- and nanodomains we continued to study the specific interactions of pore-forming proteins with lipids in artificial and natural

cell membranes, and mechanisms of their effects on remodelling and functionality of the membranes. We found that some of the pore-forming toxins bind very selectively to cholesterol/sphingomyelin-enriched areas in biological membranes rendering them very useful molecular tools to label membrane rafts. We studied pharmacologically interesting compounds from sea organisms, primarily sponges, with antibacterial and anticholinesterase activity. These are potential leads to develop novel antibiotics or pharmaceuticals to control the cholinergic system. Among other we studied inhibitory effect of sponge polyalkylpyridinium salts on tumour cell proliferation. We studied the role of lipid metabolism and signalling in human health and disease. Alterations in lipid metabolism are crucial determinants of the most widespread modern diseases in humans, such as metabolic syndrome, diabetes, cardiovascular disease and cancer. We studied the role of sPLA2 enzymes, in particular human group X sPLA2 (hGX), in whole-body fatty acid metabolism and lipid accumulation. An important finding in this area of our research is that hGX acts as an important modulator of the basic lipid metabolism and survival of cancer cells. We explored and provided new insights into the origin, evolution and functional diversification of diverse components in the genomes of prokaryotes and eukaryotes, impact of large ecological catastrophes on genome evolution and the origin and evolution of protein families that acquired important regulatory roles. Among the promising alternative energy and chemical industry sources are lipids, produced by microorganisms from lignocellulosic biomass. We have developed an improved method to detect causal genes for polygenic traits, such as lipid storage capacity, and using it, we initiated the study of the capabilities of strains of industrial microorganisms (mainly yeasts) for transformation of lignocellulosic biomass into, for example, biodiesel.

### 3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem programu, (vključno s predloženim dopolnjenim programom dela v primeru povečanja financiranja raziskovalnega programa v letu 2014)<sup>2</sup>

SLO

Obseg poročila je zelo omejen, zato navajamo le najpomembnejše dosežke na posameznih področjih delovanja PS v preteklem obdobju. Reference dosežkov so navedene kot identifikacijske številke iz sistema Cobiss (COBISS.SI-ID). Raziskovali smo farmakološko aktivne substance iz različnih naravnih virov: živalskih strupov, spuzev, gliv, bakterij in človeka, še posebej tiste z nevrotoksičnim ali genotoksičnim delovanjem, z vplivom na strjevanje krvi, prevajanje ionskih kanalčkov in integriteto bioloških membran. Kot prvi smo uspeli dokazati, da lahko nevrotoksična sekretorna fosfolipaza A2 (sPLA2) amoditoksin (Atx) iz celičnega okolja preide v citosol in mitohondrije tarčne celice [22771239, 27817767]. Ugotovili smo, da vezava Atx, pa tudi sesalskih sPLA2, na kalmodulin v citosolu, pozitivno vpliva na stabilnost in aktivnost teh molekul [23138087, 23512103]. Tako smo odkrili možnost novega načina regulacije delovanja teh encimov in z njimi povezanih procesov v citosolu sesalskih celic. Opisali smo mehanizem, po katerem Atx inhibira endocitozo v celicah kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* in v sesalskih motoričnih nevronih [5026074, 26545959]. Na molekularnem nivoju smo opisali komponente modrasovega strupa, ki so najbolj odgovorne za porušenje hemostaze pri človeku [26474535, 27268903, 27046439]. Izvedli smo integralno proteomsko analizo visokomolekulskih komponent vsebine strupnega kanala in strupa morskega polža *Conus consors* [26042407]. Delo predstavlja prvo integralno proteomsko raziskavo, ki je bila v celoti izvedena s strani slovenskih raziskovalcev v Sloveniji (**izjemni dosežek 2012 – NAMA**). Pri študijah (pato)fiziološkega delovanja sPLA2 smo ugotovili, da človeška sPLA2 iz skupine X (hGX) izzove nastanek citosolnih lipidnih kapljic v visoko tumorigenih celicah raka dojke, s čimer vzpodbudi celično delitev in podaljša preživetje celic izpostavljenih metaboličnemu stresu. Za biogenezo lipidnih kapljic in celično preživetje so predvsem

odgovorne proste maščobne kisline, zlasti oleinska, ki se sprostijo iz membranskih fosfolipidov zaradi encimskega delovanja hGX. Mehanizem sinteze lipidnih kapljic in preprečevanja celične smrti, ki ga sproža hGX, je povezan s spremembami v izražanju ključnih encimov pri lipogenezi in  $\beta$ -oksidaciji, kot tudi z modulacijo signalnih poti, ki jih uravnavata z AMP aktivirana proteinkinaza in protein kinaza B/Akt. S tem smo prvič pokazali, da hGX deluje kot pomemben modulator osnovnega lipidnega metabolizma in preživetja rakavih celic, kar bi lahko bilo velikega pomena pri pojasnitvi vloge hGX in drugih sPLA2 pri raku in drugih patoloških spremembah [27087655]. Ugotovili smo tudi, da se izražanje mRNA hGIIA, hGIII in hGX razlikuje tako v celicah raka dojke kot v tumorskih biopsijah. V primeru najbolj agresivnih trojno negativnih rakastih celic so njihovi geni epigenetsko utišani s hipermetilacijo DNA in deacetilacijo histonov [27489831]. Kot strokovnjake na področju raziskav (pato)fiziologije sPLA2 so nas v dveh uglednih znanstvenih revijah povabili k objavi preglednih člankov, enega na temo vloge sPLA2 v raku [28006695], drugega pa na temo vloge teh encimov v imunskem sistemu človeka [27893799].

Epitelijska celična adhezijska molekula (EpCAM), modularen transmembranski glikoprotein, je že nekaj desetletij znan kot zelo pomemben tumorski označevalec, saj se na površini rakastih celic pojavlja v bistveno večjih količinah kot na površini normalnih celic. Zato ga lahko uporabimo tudi za ciljno dostavo zdravilnih učinkovin na mesto karcinoma. Razvoj molekul in dostavnih sistemov, ki temeljijo na specifičnosti za EpCAM, je zaradi pomanjkanja strukturnih podatkov za EpCAM do danes potekal večinoma po principu poskusa in napake. Z namenom, da se omogoči bolj načrten pristop k delu, smo določili tridimenzionalno (3D) zgradbo zunajceličnega dela EpCAM. Pokazali smo, da molekula na celični površini tvori dimer, s pomočjo molekulske dinamike pa preučili dimerizacijo transmembranskega dela EpCAM in predstavili model medcelične tetramerne enote. Naš dosežek je izjemno pomemben, saj natančno poznavanje 3D strukture EpCAM omogoča ciljanje točno določenih regij na površini te molekule ter s tem načrtovanje učinkovitejših dostavnih sistemov, prav tako pa naši rezultati nudijo vpogled v osnovne funkcije te molekule - vlogo pri vzpostavljanju interakcij med celicami in pri signaliziranju, povezanem s pospešeno rastjo celic. Velik pomen dosežka potrjuje dejstvo, da smo ga uspeli objaviti v prestižni reviji ***Nature Communications*** [1764911]. Na področju raziskav transpozicijskih elementov (TE) smo v preglednem članku [23528999] in v poglavju v knjigi [26112039] prikazali trenutno poznavanje TE pri plazilcih in ptičih. Raziskave genov, ki so pri sesalcih nastali iz ostankov retroelementov, so nam omogočile dokazati precej obsežen vnos intronov v na novo nastale gene [25309479]. S pomočjo filogenomske analize genov, ki so pri vretenčarjih nastali iz ostankov retroelementov, pa smo pojasnili nastanek teh genov in njihovo regulatorno omreženje – ti geni so uporabili različne načine za pridobitev promotorskih regij [26492711] (**izjemni dosežek 2013 – NAMA**). Na področju molekularne evolucije toksinov smo sodelovali pri raziskavah konopeptidov [24015911, 25407527, 26042407], tetrodotoksina [25404199] in evolucije sPLA2 iz strupenih živali [23636263, 25408295]. Na področju raziskav proteinskih naddružin smo s filogenomsko analizo pojasnili nastanek, evolucijo in izjemno funkcionalno diverzifikacijo cistatinske naddružine pri evkariontih in prokariontih [23152679]. Na področju proteinskih tvorcev por smo pojasnili mehanizem nastanka por ekvinatoksina [2152527, 5209626, 2836815, 5475098, 5633306] in treh MACPF/CDCproteinov: listeriolizina [4881690], perforina in bikomponentnega tvorca por ostreolizina A/pleurotolizina B (OlyA/PlyB) [26868007, 2958415], ter naredili obsežen pregled razširjenosti, bioaktivnosti in uporabnosti proteinov iz naddružin egerolizinov in MACPF/CDC (5475610, 5475354, 3121999) Opisali smo tudi tvorbo membranskih por na stičnih površinah protein-lipid (5633562). Raziskali smo dejavnike, ki vplivajo na aktivnost perforina [2243663, 4783130, 2282319]. Še posebno pomembno je odkritje, da perforin povzroči preoblikovanje membran [2493519] (**izjemni dosežek 2011 – NAMA**).

OlyA in ekvinatoksin, ki se zelo selektivno vežeta na holesterol/sfingomielin, smo uporabili za označevanje membranskih lipidnih domen [2185551, 2219855, 4782874, 5025562, 3072591]. Na področju neproteinskih membransko aktivnih snovi iz morskih organizmov smo sintetizirali analoge polialkilpiridinijevih soli (pAPS) [2185807] in testirali njihovo kardiotoksično [3364218], permeabilizacijsko [2500687], antibakterijsko [2500943] in biocidno aktivnost [3095119]. Zlasti je pomembno odkritje, da pAPS zelo

specifično inhibirajo mišične nikotinske acetilholinske receptorje [3598970, 3587706, 2854223] (**izjemni dosežek 2012 – Biotehnika**) [3731322]. Hemolitično aktivnost smo zasledili tudi v vrsti morskih organizmov [2378575, 2214223, 2395471, 2610511, 2762319, 3066191] in filamentoznih gliv [3158095]. Pomembno smo prispevali tudi na področju razvoja analiznih metod. Še posebej velja omeniti prispevek pri razvoju metod za študij interakcij med molekulami na osnovi površinske plazmonske resonance [2219343, 2219599, 26953767, 5266714, 2990671, 5633050, 37292293], modelov umetnih lipidnih membran [36978693, 5308186] in pri razvoju integrativnega pristopa k obdelavi podatkov v funkcijski genomiki, ki upošteva njihov biološki kontekst [23789607]. Metoda je dostopna tudi na spletu [http://www.aialab.si/perturbagen]. Pomemben je tudi prispevek članice naše programske skupine v skupini iz Univerze v Torontu, Kanada, pri razvoju sesalskega membranskega dvohibridnega sistema za določanje interakcij membranskih proteinov v človeških celicah, ki je bil objavljen v prestižni reviji **Nature Methods** [28044839]. S svojimi ekspertizami smo sodelovali tudi pri številnih raziskavah, ki vsebinsko ne spadajo v osnovna raziskovalna področja PS. Če se omejim le na najpomembnejša dosežka, predlagali smo nov pristop k boju proti bakterijskim okužbam [26953767], v reviji **Nature Neuroscience** pa smo objavili raziskavo vloge proteina TDP43 v amiotrofični lateralni sklerozi in proteinopatijah [8278100].

#### 4. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem programu in zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>3</sup>

SLO

Zastavljeni programski cilji so bili praktično v celoti doseženi, na več področjih (npr. na področju raziskav perforina) pa celo preseženi.

#### 5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega programa oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave programske skupine v letu 2014<sup>4</sup>

SLO

Sprememb načrta raziskovalnega programa ni bilo.

#### 6. Najpomembnejši znanstveni rezultati programske skupine<sup>5</sup>

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	26492711	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Nastanek in regulatorna evolucija domesticiranih genov
		ANG	Genesis and regulatory wiring of retroelement-derived domesticated genes
	Opis	SLO	Za pojasnitev izvora in evolucije multigenskih družin udomačenih genov, nastalih iz retroelementov Metaviridae smo uporabili filogenomsko analizo 90 različnih genomov strunarjev in široko taksonomsko vzorčenje. Dokazali smo, da je večina udomačenih genov nastala v predniku placentalnih sesalcev. S filogenomsko analizo udomačenih genov in njihovih izvornih retroelementov smo dokazali, da so udomačeni geni nastali kot posledica več neodvisnih dogodkov molekularne udomačitve, nastale genske družine pa so se povečevale z genskimi duplikacijami. Dokazali smo, da so tako udomačeni geni kot njihove kromosomske lokacije močno ohranjeni znotraj placentalnih sesalcev, kar nakazuje na močno adaptivno evolucijo in hitro fiksacijo teh genov v predniku placentalnih sesalcev. Dokazali smo, da so udomačeni geni nastali iz ostankov nekoč aktivnih retroelementov, ter da so svoje regulatorne in promotorske regije pridobili na novo. Pridobitev in evolucija regulatornih zaporedij udomačenih genov sta igrali pomembno vlogo pri adaptivni evoluciji teh genov ter sta pomembni za pojasnitev tkivno, vrstno in časovno specifičnih vzorcev izražanja teh genov.

		<p>We traced the genesis and regulatory wiring of the Metaviridae-derived domesticated genes (DGs) through phylogenomic analysis, using whole-genome information from more than 90 chordate genomes. Mammalian retroelement-derived DGs (RDDGs) have been shown to originate in several steps by independent domestication events and to diversify later by gene duplications. Analysis of syntenic loci has shown that diverse RDDGs and their chromosomal positions were fully established in the ancestor of placental mammals. By analysis of active Metaviridae lineages in amniotes, we have demonstrated that RDDGs originated from retroelement remains. During the domestication process, de novo acquisition of regulatory regions is shown to be a prerequisite for the survival of the DGs. The origin and evolution of de novo acquired promoters and untranslated regions in diverse mammalian RDDGs have been explained by comparative analysis of orthologous gene loci. The origin of placental mammal-specific innovations and adaptations, such as placenta and newly evolved brain functions, was most probably connected to the regulatory wiring of DGs and their rapid fixation in the ancestor of placental mammals.</p>
	ANG	
	Objavljeno v	The University of Chicago Press; Molecular biology and evolution; 2013; Vol. 30, issue 5; str. 1015-1031; Impact Factor: 14.308; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.723; A': 1; A': 1; WoS: CQ, HT, KM; Avtorji / Authors: Kokošar Janez, Kordiš Dušan
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	27367975 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<p>SLO Različni mehanizmi delovanja vretenčarskih proteinov AID/APOBEC pri inhibiciji retrotranspozicije elementov LINE1 in LINE2</p> <p>ANG Differential inhibition of LINE1 and LINE2 retrotransposition by vertebrate AID/APOBEC proteins</p>
	Opis	<p>SLO Proteini AID/APOBEC so citidin deaminaze, ki v okviru prirojene imunosti ščitijo celico pred škodljivimi učinki retroelementov. Delovanje proteinov APOBEC se odraža v hipermutacijah v nukleotidnih zaporedjih sesalskih retroelementov, njihov vpliv na evolucijo genomov in mehanizmi njihovega delovanja pri drugih vretenčarjih pa so neznani. V naši raziskavi smo s pomočjo genomske analize odkrili prve sledove citidin deaminazne aktivnosti že v vretenčarskih genomih prednikov sesalcev, in sicer v elementih LINE v genomu zelenega kuščarja anoli, pri katerem je bil odkrit trenutno najstarejši znani protein APOBEC1 (A1). Kuščarjev protein A1 je pokazal visoko deaminazno aktivnost in učinkovito delovanje proti retroelementom. Primerjava mehanizmov delovanja kuščarjevih in človeških proteinov APOBEC je razkrila, da je mehanizem inhibicije elementov LINE s strani proteinov A1 evlucijsko ohranjen in da se bistveno razlikuje od mehanizma delovanja humanih proteinov A3. Skupaj s hipermutacijami, ki smo jih zaznali v vretenčarskih elementih LINE, naša raziskava nakazuje, da inhibitorna aktivnost proteinov AID/APOBEC proti retroelementom izvira pri zgodnjih vretenčarjih. Naša odkritja odpirajo nove perspektive v raziskavah proteinov AID/APOBEC in pomembno prispevajo k razkrivanju njihove fiziološke vloge in razumevanju vpliva na evolucijo genomov vretenčarjev.</p> <p>AID/APOBEC proteins are cytidine deaminases, which act within the innate immune response to protect the genome against the harmful effects of retroelements. The protective activity of mammalian APOBEC proteins is evident from clusters of hypermutations present in retroelements of mammalian genomes, but their role in host defense and their impact on genome evolution in other vertebrates is not known. In this study, we report the first evidence of cytidine deaminase activity in nonmammalian vertebrates, in the green anole lizard genome, where the</p>

		ANG	oldest known APOBEC1 (A1) protein was recently discovered. Our results confirm that the lizard A1 protein is a potent cytidine deaminase and an inhibitor of retrotransposition. Our comparative analysis of the antiretroelement activity of lizard and human APOBEC proteins showed that the mechanism of A1-induced LINE inhibition is evolutionary conserved and significantly different from that of human A3 proteins. Together with the editing detected in vertebrate LINE elements, our study indicates that AID/APOBEC antiretroelement activity originates in early vertebrates. Our findings open new perspectives in AID/APOBEC protein research and are an important contribution to our understanding of their physiological roles and their impact on the evolution of vertebrate genomes.
	Objavljeno v		BioMed Central; Retrovirology; 2013; Vol. 10, art. no. 156; str. 1-16; Impact Factor: 4.767; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.341; A': 1; WoS: ZE; Avtorji / Authors: Lindič Nataša, Budič Maruška, Petan Toni, Knisbacher Binyamin A., Levanon Erez Y., Lovšin Nika
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
3.	COBISS ID	27087655	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Sekretorna fosfolipaza A2 skupine X izzove nastanek lipidnih telesc in podaljša preživetje celic raka dojke
		ANG	Group X secreted phospholipase A2 induces lipid droplet formation and prolongs breast cancer cell survival
	Opis	SLO	Ugotovili smo, da človeška sekretorna fosfolipaza A2 skupine X (hGX sPLA2) izzove nastanek lipidnih telesc ali lipidnih kapljic (LD, angleško "lipid droplets") v visoko tumorigenih celicah MDAMB231 raka dojke v odvisnosti od svoje encimske aktivnosti. S tem vzpodbudi celično delitev in občutno podaljša preživetje celic v pogojih stresa, sproženega s pomanjkanjem hranilnih snovi (seruma). Rezultati kažejo, da so za biogenezo LD in celično preživetje odgovorne predvsem proste maščobne kisline, še zlasti oleinska kislina, ki se sprostijo iz membranskih fosfolipidov kot posledica encimskega delovanja hGX sPLA2. Prav tako smo ugotovili, da je s hGX sprožen mehanizem celičnega preživetja in kopičenja lipidov povezan s spremembami v izražanju ključnih encimov pri lipogenezi in βoksidaciji, kot tudi z modulacijo signalnih poti z AMPaktivirano proteinsko kinazo (AMPK) in proteinsko kinazo B/Akt. Protumorigene učinke, sprožene s hGX sPLA2, smo lahko preprečili z dodatkom inhibitorja etomoksira, kar kaže ključno vlogo βoksidacije tako pri tvorbi LD na račun encimskega delovanja hGX sPLA2 kot pri celičnem preživetju celic raka dojke. S tem smo dokončno potrdili delovanje hGX sPLA2 kot modulatorja osnovnega lipidnega metabolizma in preživetja rakavih celic. Omenjeno odkritje bi lahko imelo pomemben vpliv na pojasnitev vloge hGX in ostalih sPLA2, kot na primer hGV in hGIII, pri raku in patofizioloških spremembah nasploh.
		ANG	We were able to show for the first time that human group X secreted phospholipase A2 (hGX sPLA2) induces lipid droplet (LD) formation in the highly tumorigenic MDAMB231 breast cancer cells in an enzyme activity-dependent manner, thereby stimulating cell proliferation and significantly prolonging cell survival under serum deprivation-induced stress. Our results suggested that free fatty acids, in particular oleic acid, released from membrane phospholipids by the action of hGX sPLA2, are substantially responsible for LD biogenesis and cell survival. It was also demonstrated that the mechanism of hGX-induced cell survival and lipid accumulation is associated with alterations in the expression of key lipogenic and βoxidation enzymes, and modulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and protein B/Akt kinase signalling pathways. The protumorigenic effects induced by hGX sPLA2 were abolished by etomoxir, suggesting a critical role for βoxidation

			in hGXinduced LD formation and cell survival in breast cancer cells. The ability of hGX sPLA2 to act as a modulator of basic lipid metabolism and cancer cell survival is thus well established. This could have important implications in elucidating the role of hGX and other sPLA2s, such as hGV and hGIII, in cancer and human pathophysiology in general.
	Objavljeno v	BioMed Central; Molecular cancer; 2013; Vol. 12, art. no. 111; str. 1-23; Impact Factor: 5.397; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 4.412; A': 1; WoS: CQ, DM; Avtorji / Authors: Pucer Janež Anja, Brglez Vesna, Payré Christine, Pungerčar Jože, Lambeau Gérard, Petan Toni	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
4.	COBISS ID	26042407	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Proteomika strupa polža <i>Conus consors</i> predlaga nove funkcije, poti in proteinske družine vključene v strupni sistem
		ANG	<i>Conus consors</i> snail venom proteomics proposes functions, pathways and novel families involved in its venomous system
	Opis	SLO	<p>Že nekaj desetletij poznamo peptide iz strupov polžev stožcev, t.i. konopeptide, ki izražajo celo paleto farmakoloških aktivnosti. Malo pozornosti pa je bilo namenjene proteinom z večjo molekularno maso (HMM) iz strupov mehkužcev. Da bi bolje raziskali te proteine, smo se v tej študiji posvetili poglobljeni karakterizaciji teh molekul v strupu piscivornega polža <i>Conus consors</i>, in sicer v strupu iz strupne žleze (nezrel strup) in tistemu, ki ga polž injicira v žrtev (zrel strup). HMM smo ločili s pomočjo dvodimenzionalne elektroforeze (2DPAGE) in posamezne komponente analizirali z masno spektroskopijo (MS). MS rezultate smo interpretirali z analizo po sekvenčni bazi UniProt, <i>C. consors</i> EST knjižnicah strupnega izvodila in žleze slinavke ter genomskih sekvenc. V lumnu izvodila strupa smo identificirali številne proteinske družine, jim pripisali biološko funkcijo in predlagali njihovo vlogo v procesu tvorbe in zorenja strupa. Zanimivo je, da smo odkrili tudi proteine, ki ne spadajo v nobeno od že opisanih družin, tako da je njihova funkcija zaenkrat še neznan. Le dve skupini HMM sta prešli selekcijski proces in se znašli tudi v injiciranem strupu. To so ehotoksini in hialuronidaze. To nakazuje tudi njun prispevek v procesu zastrupitve. Naša analiza pomeni velik korak naprej pri opisu nabora proteinov, ki jih uporablja polž stožec pri sintezi strupa, njegovem zorenju in delovanju.</p> <p>Delo predstavlja prvo integralno proteomsko raziskavo, ki je bila v celoti izvedena s strani slovenskih raziskovalcev, na opremi instalirani v Sloveniji! Po izboru ARRS je bil ta dosežek proglašen kot izjemen znanstveni dosežek na področju NAMA v RS.</p>
		ANG	<p>For some decades, cone snail venoms have been providing peptides, generally termed conopeptides, that exhibit a large diversity of pharmacological properties. However, little attention has been devoted to the high molecular mass (HMM) proteins in venoms of mollusks. In order to shed more light on cone snail venom HMM components, the proteins of dissected and injected venom of a fishhunting cone snail, <i>Conus consors</i>, were extensively assessed. HMM venom proteins were separated by twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis and analyzed by mass spectrometry (MS). The MS data were interpreted using UniProt database, EST libraries from <i>C. consors</i> venom duct and salivary gland, and their genomic information. Numerous protein families were discovered in the lumen of the venom duct and assigned a biological function, thus pointing to their potential role in venom production and maturation. Interestingly, the study also revealed original proteins defining new families of unknown function. Only two groups of HMM proteins passing the venom selection process – echotoxins and hyaluronidases – were clearly present in the injected</p>



		venom. They are suggested to contribute to the envenomation process. This newly devised integrated HMM proteomic analysis is a big step towards identification of the protein arsenal used in a cone snail venom apparatus for venom production, maturation and function. This work represents the first integral proteomic study performed exclusively by Slovenian researchers, on equipment installed in Slovenia. By the Slovenian Research Agency, this work was proclaimed as exceptional scientific achievement in 2012 in the field of NaturalMathematical Sciences in RS.
	Objavljeno v	American Chemical Society; Journal of proteome research; 2012; Vol. 11, no. 10; str. 5046-5058; Impact Factor: 5.056;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.089; A': 1; WoS: CO; Avtorji / Authors: Leonardi Adrijana, Biass Daniel, Kordiš Dušan, Stöcklin Reto, Favreau Philippe, Križaj Igor
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
5.	COBISS ID	2493519 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Perforin povzročča membranske invaginacije in tvorbo veziklov
		<i>ANG</i> Perforin activity at membranes leads to invaginations and vesicle formation
	Opis	<i>SLO</i> Pokazali smo, da proteinski tvorec por perforin (PFN) lahko povzroči tvorbo invaginacij in celo veziklov v notranjosti orjaških in velikih unilamelarnih lipidnih veziklov. Meritve kapacitivnosti membran so pokazale, da PFN lahko poveča membransko površino, ne da bi tvoril pore v planarnih lipidnih membranah. Tudi v Jurkat celicah je PFN tvoril intracelularne vezikle pred porami in sprožil endocitozi podoben proces. Po izboru ARRS je bil ta dosežek proglašen kot izjemen znanstveni dosežek leta 2011 na področju NAMA v RS.
		<i>ANG</i> We showed that the poreforming protein perforin (PFN) is able to induce invaginations and formation of complete internal vesicles in giant and large unilamellar vesicles. Membrane capacitance measurements showed that PFN is able to increase a planar lipid membrane surface area in the absence of pore formation. Addition of PFN to Jurkat cells caused the formation of internal vesicles prior to pores and triggered an endocytosislike event in addition to pore formation. By the Slovenian Research Agency, this work was proclaimed as exceptional scientific achievement in 2011 in the field of NaturalMathematical Sciences in RS.
	Objavljeno v	National Academy of Sciences; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 2011; Vol. 108, no. 52; str. 21016-21021; Impact Factor: 9.681;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.271; A'': 1;A': 1; WoS: RO; Avtorji / Authors: Praper Tilen, Kladnik Aleš, Anderluh Gregor
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek

## 7.Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati programske skupine<sup>6</sup>

	Družbeno-ekonomski dosežek	
1.	COBISS ID	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	<i>SLO</i> Infastrukturalni center za površinsko plazmno resonanco.
		<i>ANG</i> Infrastructural centre for surface plasmon resonance.
	Opis	<i>SLO</i> Organizacija in vodenje nacionalnega infastrukturalnega centra za površinsko plazmno resonanco za študij kinetike medmolekulskih interakcij v realnem času. Center je sestavni del Mreže raziskovalnih infastrukturalnih centrov Univerze v Ljubljani MRIC

		UL (več o centru se lahko prebere na: <a href="http://www.bf.unilj.si/bi/biokemija/SPR/SPR.html">http://www.bf.unilj.si/bi/biokemija/SPR/SPR.html</a> ).
	ANG	Organization and leading of the national infrastructural centre for surface plasmon resonance aimed to study the kinetics of molecular interactions. The centre is an integral part of the network of infrastructural centres at the University of Ljubljana. (more about the centre one can find at: <a href="http://www.bf.unilj.si/bi/biokemija/SPR/SPR.html">http://www.bf.unilj.si/bi/biokemija/SPR/SPR.html</a> ).
	Šifra	D.07 Vodenje centra/laboratorija
	Objavljeno v	<a href="http://web.bf.unilj.si/bi/sprcenter/indexeng.html">http://web.bf.unilj.si/bi/sprcenter/indexeng.html</a>
	Tipologija	3.25 Druga izvedena dela
2.	COBISS ID	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO Soustanovitelji in partnerji Centra odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov (CIPKeBiP). ANG Co-founders and partners of the Centre of Excellence for Integrated Approaches in Chemistry and Biology of Proteins (CIPKeBiP).
	Opis	SLO CIPKeBiP povezuje znanje, izkušnje in tehnologije vrhunskih slovenskih raziskovalnih skupin, ki se ukvarjajo z raziskovanjem proteinov ter njihovih lastnosti in funkcij. Center vključuje deset organizacij iz centralne in severovzhodne Slovenije, med njimi pet podjetij. Partnerji se osredotočamo na specifične biološke probleme visoke znanstvene in biomedicinske relevance (infekcijske bolezni, signalne poti) in pomembne za okolje (adaptacija ekstremofilnih organizmov). Izsledke in znanja iz raziskav bomo uporabili pri razvoju procesov in znanja pri skupnih projektih z industrijskimi partnerji. ANG CIPKeBiP is connecting the top available expertise, knowhow, and technology of Slovenian research laboratories in protein science, thus emphasizing biomedical relevance of the applied project (priority health and life sciences). The Centre includes ten partner institutions from central and northeastern region of Slovenia, among them five industrial entities. We are focused on specific biological issues of high scientific relevance and of high biomedical (infectious diseases, signaling pathways) and environmental (adaption mechanisms of extremophiles) importance.
	Šifra	D.02 Ustanovitev raziskovalnega centra, laboratorija, študija, društva
	Objavljeno v	<a href="http://www.cipkebip.org/">http://www.cipkebip.org/</a>
	Tipologija	3.25 Druga izvedena dela
3.	COBISS ID	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO Vodstvo Mednarodnega toksinološkega združenja. ANG Leadership of the International Society on Toxinology.
	Opis	SLO Igor Križaj je bil v letu 2009 ponovno izvoljen na položaj sekretarja Evropske sekcije Mednarodnega toksinološkega združenja (IST) in za člana sveta krovne organizacije IST. To ugledno združenje je bilo ustanovljeno leta 1962. Združuje znanstvenike in klinične strokovnjake, zainteresirane za napredek in razvoj znanosti o naravnih toksinih. Poslanstvo združenja je poglobljanje znanja o lastnostih toksinov in antitoksinov in krepitev sodelovanja in komunikacije med znanstveniki, ki jih ta problematika s kakršnegakoli vidika zanima. IST ima tri regionalne sekcije, Evropsko, Pan Ameriško in AzijskoPacifiško. Danes združuje več sto članov. Igor Križaj was reelected in 2009 as the Secretary of European Section of the International Society on Toxinology (IST) and as a member of the

		ANG	IST Council. This respectable Society was founded in 1962. It is comprized of scientists and clinicians interested in advancing the science of toxinology. The purpose of the IST is advancing knowledge on the properties of toxins and antitoxins and to bring together scholars interested in these substances through a common Society. The IST is organized in three regional sections, European, Pan American and AsiaPacific. Today the Society gathers several hundreds members.
	Šifra	D.03	Članstvo v tujih/mednarodnih odborih/komitejih
	Objavljeno v	http://toxinology.org/	
	Tipologija	3.25	Druga izvedena dela
4.	COBISS ID	259405312	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Kjer se življenje začne.
		ANG	Where the life starts.
	Opis	SLO	Učbenik obravnava vsebine iz biologije celice in genetike za gimnazije. Avtorji v skladu z učnim načrtom in opaznim osebnim pristopom na zanimiv in ilustrativen način podajajo vsebine, ki so za gimnazijce nedvomno težke, a jih avtorji predstavijo tako, da omogočajo razumevanje kompleksnih pojavov v življenju celice tudi tistim dijakom, ki jih biološke vsebine sicer ne zanimajo. Prav zato sta združenje evropskih založnikov šolske literature (European Education Publishing Group, EEPG) in združenje IARTEM (International Association for Research on Textbooks and Educational Media) na frankfurtskem knjižnem sejmu leta 2012 učbeniku podelilo bronasto priznanje (Best European Schoolbook Awards) v kategoriji srednješolskih učbenikov.
		ANG	The textbook includes chapters on cell biology and genetics for the highschool students. The authors used a personalized and inovative approach to explain complex cell life which is usually abstract and difficult to understand for the highschool students, especially those which are not interested in biology. This didactical approach was recognized by the jury of European Education Publishing Group (EEPG) and International Association for the Research on Textbooks and Educational Media (IARTEM). According to their decission in 2012 at the Frankfurter book fair the textbook was awarded bronze medal in the highschool textbook category.
	Šifra	D.10	Pedagoško delo
	Objavljeno v	Rokus Klett; 2012; 297 str.; Avtorji / Authors: Dermastia Marina, Komel Radovan, Turk Tom	
	Tipologija	2.04	Srednješolski, osnovnošolski ali drugi učbenik z recenzijo
5.	COBISS ID	65067591835012	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO	Članstvo v uredniških odborih mednarodnih revij Analytical Biochemistry in Toxicon.
		ANG	Membership in the Editorial Boards of international journals Analytical Biochemistry and Toxicon.
	Opis	SLO	Gregor Anderluh je bil leta 2010 imenovan kot član uredniškega odbora znanstvene revije Analytical Biochemistry (ISSN: 00032697) še za tri leta. Med člani uredniškega odbora je edini Slovenec, v njem je samo nekaj evropskih članov. Analytical Biochemistry je pomembna revija na področju analitske kemije (JCR uvrstitev 32/76) in biokemijske metodologije (40/78). Med revijami s področja biokemije in molekularne biologije je 189. med 291 revijami. Trenutni faktor vpliva (2013) je 2.305. Letno izide 22 števil.

		<p>Toxicon (ISSN: 00410101). Faktor vpliva revije (2013) je 2.581. Toxicon je vodilna revija na področju toksinologije v svetu in med boljšimi revijami na področju toksikologije (35/87).</p>
	ANG	<p>Gregor Anderluh was named in 2010 for three years as a member of the editorial board of the scientific journal Analytical Biochemistry (ISSN: 00032697). He is the only Slovenian and one of the few European researchers in the editorial board. The impact factor of the journal (2013) is 2.305. Analytical Biochemistry is an important journal in the field of analytical chemistry (JCR ranking 32/76) and biochemical research methods (40/78). In the field of biochemistry and molecular biology is ranked 166 of 290 journals. Twenty two numbers are issued annually.</p> <p>Igor Križaj is a member of the Editorial Board of Toxicon (ISSN: 00410101) which impact factor (2013) is 2.581. Toxicon is the leading toxinology journal and among the best journals in the field of toxicology (35/87).</p>
Šifra	C.04	Uredništvo mednarodne revije
Objavljeno v	<a href="http://www.elsevier.com/wps/find/journaleditorialboard.cws_home/622781/">http://www.elsevier.com/wps/find/journaleditorialboard.cws_home/622781/</a> , <a href="http://www.journals.elsevier.com/toxicon/editorialboard/">http://www.journals.elsevier.com/toxicon/editorialboard/</a>	
Tipologija	4.00	Sekundarno avtorstvo

## 8. Drugi pomembni rezultati programske skupine<sup>2</sup>

Izjemnih znanstvenih dosežkov je bilo v naši PS kar nekaj, pa nam po kriterijih ARRS, tudi to ni pomagalo do dodatnega programskega financiranja, niti do šestletnega financiranja v naslednjem programskem obdobju ne!

- Odkritje, da perforin povzroči preoblikovanje membran [COBISS ID: 2493519] (izjemni dosežek 2011 – NAMA).  
Predstavitev: [http://videlectures.net/znanstveni\\_dosezki2011\\_anderluh\\_aktivnost/](http://videlectures.net/znanstveni_dosezki2011_anderluh_aktivnost/)
- Prva integralna proteomska raziskava, v celoti izvedena s strani slovenskih raziskovalcev v Sloveniji [COBISS ID: 26042407] (izjemni dosežek 2012 – NAMA).  
Predstavitev: [http://videlectures.net/znanstveni\\_dosezki2012\\_krizaj\\_polz/](http://videlectures.net/znanstveni_dosezki2012_krizaj_polz/)
- Odkritje, da pAPS zelo specifično inhibirajo mišične nACh receptorje [COBISS ID: 3731322] (izjemni dosežek 2012 – Biotehnika).  
Predstavitev: [http://videlectures.net/znanstveni\\_dosezki2012\\_frangez\\_mehanizem/](http://videlectures.net/znanstveni_dosezki2012_frangez_mehanizem/)
- Pojasnitev nastanka in evolucije multigenjskih družin udomačenih genov, ki so nastali iz RE [COBISS ID: 26492711] (izjemni dosežek 2013 - NAMA).  
Predstavitev: [http://videlectures.net/odlicnivznanosti2013\\_kordis\\_primerjalna\\_genomika/](http://videlectures.net/odlicnivznanosti2013_kordis_primerjalna_genomika/)
- Člani PS smo sodelovali pri treh objavah v revijah iz družine revij Nature:  
Nature Methods [COBISS ID: 28044839] (IF2013 = 25.953)  
Nature Neuroscience [COBISS ID: 8278100] (IF2011 = 15.531)  
Nature Communications [COBISS ID: 1764911] (IF2013 = 10.742).
- Organizacija in vodenje laboratorija za visokozmogljivostno genetiko kvasovke na IJS. Laboratorij je nacionalnega pomena, saj v njem poteka več nacionalnih raziskovalnih projektov s področij od računalništva do okoljskih znanosti.  
Šifra: D.07 Vodenje centra/laboratorija  
Objavljeno: <http://bio.ijs.si/tox/>
- Pedagoško delo (D.10)  
Vsi člani PS z BF in FKKT so polno angažirani na dodipl., podipl. in doktorskem študiju na UL. Pedagoško aktivnih je tudi pet članov PS z IJS. Predavajo 13 različnih predmetov na različnih visokošolskih inštitucijah v Sloveniji. K. Sepčič predava tudi na Univerzi v Reki, Hrvaška. itd.

## 9. Pomen raziskovalnih rezultatov programske skupine<sup>3</sup>

### 9.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>3</sup>

SLO

Raziskave, ki jih izvajamo v okviru programske skupine, lahko v grobem razdelimo na toksinološke raziskave, raziskave sesalskih sPLA2 in tvorcev por, fenomiko kvasovk in analizo genomov, tj. sklopov, ki se med seboj prepletajo in dopolnjujejo. Na področju toksinologije smo usmerjeni v analizo molekularnih mehanizmov delovanja različnih komponent živalskih strupov z namenom razvoja novih molekularnih orodij za raziskave v fiziologiji in medicini, za razvoj inovativnih bioloških zdravil (antitrombotiki, citostatiki, analgetiki, imunotoksini) in obrambo pred delovanjem strupov (detekcija in terapija, tako v povezavi z medicino kot bioterrorizmom). Toksini, ki jih raziskujemo, delujejo na različne načine in na različne tipe celic. Poudarek je na študiju mehanizma delovanja nevrotoksinov, zlasti presinaptično nevrotoksičnih sPLA2, citolizinov, zlasti tvorcev por in miotoksičnih sPLA2, ter komponent strupov, ki vplivajo na hemostazo. Dognanja na molekularni ravni bodo po pričakovanju imela velik pomen pri raziskavah strukture in dinamike bioloških membran (npr. regulirane ekso- in endocitoze), usmerjanja proteinov v celicah ter pri iskanju novih poti za terapijo tromboemboličnih bolezni npr. akutnega srčnega infarkta, pljučne embolije, kapi in periferne arterijske okluzije. Naše raziskave so usmerjene v pojasnjevanje in zdravljenje nevroloških motenj, ki so posledica nepravilnosti cikla sinaptičnih veziklov, in uravnavanje hemostaze. sPLA2 so prožilci signalnih kaskad (lipidno signaliziranje) in ključen dejavnik v metabolizmu lipidov pri sesalcih. Poznavanje uravnavanja teh procesov je ključnega pomena za razumevanje bolezni in motenj metabolizma, kot so nekatere nevrološke bolezni, npr. Zelwegerjev sindrom, Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen, kardiovaskularna obolenja, ateroskleroza, diabetes tipa 2 in debelost. Membranski rafti so udeleženi v številnih ključnih bioloških procesih v zdravem organizmu, saj delujejo kot platforme za ustaljene signalizacijske poti, obenem pa njihova disfunkcionalnost/okvara privede do različnih bolezenskih stanj. Za membranske rafte je tako bilo ugotovljeno, da igrajo pomembno vlogo v nevroloških, (Alzheimerjeva, Parkinsonova in prionske bolezni) in kardiovaskularnih boleznih, v karcinogenezi in pri imunskih boleznih kot je sistemski lupus eritematosus ter pri okužbi z virusom HIV, kar naredi membranske rafte izjemno zanimive tarče v luči farmakoloških pristopov za zdravljenje in preprečevanje teh bolezni. V okviru PS smo razvili stabilno, netoksično rekombinantno fluorescenčno različico proteina ostreolizina A za katerega smo pokazali, da se veže na s holesterolom in sfingomielinom bogata področja v membranah celic. Z omenjenim označevalcem smo tudi dokazali obstoj teh domen v celicah in spremljali njihovo dinamiko potovanja po celici. Razvita molekula bi lahko v prihodnosti služila kot ključno (in do sedaj edino) orodje v bazičnih in aplikativnih biomedicinskih raziskavah biologije membranskih raftov in z njimi povezanih patoloških stanj. Raziskave delovanja proteinov egerolizinske družine, ki so potencialni virulenčni dejavniki pri okužbah z oportunistično patogenimi plesnimi, lahko prispevajo k boljšemu razumevanju patogeneze in vloge toksinov v razvoju obolenja, kot tudi k terapiji in predvsem pri preprečevanju bolezni pri živalih in človeku. Raziskave genov beljakovin modrasovega strupa so tudi pomembne za pojasnitev mehanizma pospešene ali adaptivne evolucije mnogih proteinskih družin v živalskih strupih. Raziskave bodo med drugim pokazale, kateri deli toksinskih molekul so dostopni za razvoj novih funkcij, ne da bi se njihova 3D-struktura porušila. Na osnovi teh podatkov bo možno načrtovati beljakovine z novimi lastnostmi, kar je ključnega pomena za razvoj novih učinkovin. Raziskovalna problematika skupine je zelo aktualna, naši rezultati pa mednarodno odmevni.

ANG

Our research activities can broadly be classified as 1) toxinology-related research, 2) studies of mammalian sPLA2s, 3) pore forming proteins research, 4) yeast phenomics and 5) genome analysis – these are complementary and interwoven topics that together build a coherent and powerful research programme. In the field of toxinology our research is focused on the mechanism of action of different components of animal venoms with the aim of developing new molecular tools for physiology and medical research, innovative biological drugs (antithrombics, cytostatics, analgetics, immunotoxins), and for new anti-venomation approaches (both in terms of detection and prevention/therapy) for medical or anti-bioterrorism applications. The toxins that we study have different modes of action and target different cells. We are focused on the mechanism of action of presynaptically neurotoxic sPLA2s, cytolysins (especially pore-forming proteins and myotoxic sPLA2s), and the venom components affecting haemostasis. The findings on their action on the molecular level are expected to provide an important contribution also in the more basic research of the structure and dynamics of biomembranes (e.g. regulated exocytosis and endocytosis) and protein targeting. They will also contribute to finding new ways

to treat thrombo-embolic diseases such as acute heart failure, pulmonary embolism, stroke, and peripheral arterial occlusion. In addition, our research will be aimed at understanding and treating of neurological disorders which result as a consequence of abnormal synaptic vesicle cycling, and regulation of haemostasis. Secreted PLA2s are triggers of signalling cascades (lipid-mediated signalling) and one of the key factors in lipid metabolism in mammals. Understanding these processes is essential for higher-level complexity understanding of diseases and disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease, Zellweger syndrome, cardiovascular diseases, atherosclerosis, type 2 diabetes and obesity. Membrane rafts participate in numerous biological processes where they serve as platforms for biochemical signaling pathways. Their defects can lead to different pathological states and diseases. Membrane rafts have been shown to be involved in neurological (Alzheimer, Parkinson, and prion diseases) and cardiovascular diseases, in carcinogenesis, in immune diseases like systemic lupus erythematosus, and in various virus infections (e.g. HIV), which proposes these membrane domains as interesting targets for pharmacological approaches to cure these diseases. Within the programme, we developed a non-toxic recombinant fluorescently labeled protein, ostreolysin A. This protein was shown to bind to cholesterol- and sphingomyelin-enriched membrane domains. It enabled us to prove the existence of these domains in cells, and to study their dynamics in cells. The developed molecule could serve as a crucial, and the only current tool in basic and applicative biomedical researches for the estimation of overall biological role of membrane rafts, and their involvement in several pathologies. Studying of mechanisms of action of aegerolysin-like proteins that are proposed as putative virulence factors of opportunistically pathogenic moulds might lead to better understanding of the pathogenesis, and to its prevention and therapy. Studying the genes encoding long-nosed viper's venom toxins is also important for explaining the mechanism of enhanced and adaptive evolution of various animal venom protein families. Our research will, among other, show which regions of the toxin molecules are amenable for development of new functions, without disrupting their 3D structure. Based on these data it will be possible to design proteins with new characteristics, which is crucial for the development of new biologically active molecules. The research topics of our program group are very relevant and up to date. The results published are internationally recognized for their importance.

## 9.2. Pomen za razvoj Slovenije<sup>10</sup>

SLO

Raziskave programske skupine so tako bazičnega kot aplikativnega značaja. Poleg tega, da prispevajo v svetovno zakladnico znanja, imajo tudi praktično vrednost. Tako npr. razvijamo postopke za pridobivanje bolj učinkovitih in varnih protistrupov, alternativnih protitumorskih sredstev, antikoagulantnih učinkovin, antitrombotikov in učinkovin za transfekcijo celic s tujerodno DNA (alkilpiridinijeve soli). Razvijamo tudi netoksične antivegetativne premaze (antifouling) za zaščito podvodnih površin. Zelo pomemben vidik naših raziskav je usvajanje najnovejših tehnologij, zlasti na področjih funkcijske genomike. V okviru naših raziskav tako uvajamo v svojih laboratorijih tehnologijo DNA-mikromrež, tehnologijo sistematičnega določanja genetskih interakcij (SGA), najnovejše bioinformacijske metode in proteomiko. Ob tem tudi aktivno sodelujemo pri razvoju najnovejših raziskovalnih metod. V sodelavi z domačim visokotehnološkim podjetjem smo razvili manipulator za avtomatsko replikacijo urejenih kolonij mikroorganizmov (kvasovk), ki nam bo omogočil konkurenčnost v evropskem merilu pri analizi proteinskih toksinov in drugih biološko aktivnih snovi na genomski ravni, sodelujemo pri razvoju novih bioinformatičnih orodij za analizo rezultatov genomskih poskusov in razvijamo nove metode za študij interakcij med proteini in lipidnimi membranami na osnovi SPR. Kot taka, naša skupina predstavlja jedro, iz katerega izhajajo kadri, usposobljeni za delo z najnovejšimi tehnikami biokemije, farmakologije, molekularne biologije in genetike. Dejavnost skupine je pomembna tudi za postavitev sodobnih, na biotehnologiji temelječih podjetij in laboratorijev kot sestavnega dela slovenskega gospodarstva. Zato naše največje farmacevtsko podjetje Lek-Novartis z našo skupino intenzivno sodeluje. Naša dejavnost je prav tako pomembna za zdravstvo in obrambo - interes za delovanje na slednjem področju se kaže v podpori NATA našim raziskavam, povezanih z bojem proti bioterorizmu, in pa zanimanju MORS za naš razvoj biosenzorjev za občutljivo, hitro in mobilno detekcijo kemijskih in bioloških toksinov na terenu. Zelo pomembna je sodelava pri vzgoji mladih raziskovalcev in posredovanje v raziskavah pridobljenih znanj slovenskim študentom. Večina članov programske skupine je intenzivno vpeta v pedagoško delo na dodiplomskem in podiplomskem nivoju: na UL, UM, UNG in na

Mednarodni podiplomski šoli Jožefa Stefana. Nekateri člani programske skupine so nosilci prenove visokošolskih programov v skladu z bolonjsko reformo. Vrsta mladih raziskovalcev, ki se je usposabljala ob naših raziskavah (izdelava diplomskih, magistrskih in doktorskih del) je odšla v raziskovalne laboratorije različnih raziskovalnih inštitutov in univerz, medicinske klinične laboratorije in v farmacevtsko industrijo. S številnimi objavami v visoko citiranih mednarodnih znanstvenih revijah, s predavanji na mednarodnih kongresih in akademskih institucijah ter v industriji in z organizacijo mednarodnih znanstvenih srečanj naša raziskovalna skupina nedvomno prispeva k uveljavitvi slovenske znanosti, tega pomembnega dela nacionalne kulture in samobitnosti, v svetu. Skupina je vzpostavila in vzpostavlja mednarodne sodelave z vrsto uglednih raziskovalcev in institucij širom sveta. Člani naše skupine so opravljali ali opravljajo nekatere vodilne funkcije v organih evropskih in svetovnih strokovnih združenj (trenutno dr. Igor Križaj opravlja nalogo sekretarja Evropske sekcije IST in člana sveta Mednarodne IST), kar vse dodatno krepi našo nacionalno identiteto in prepoznavnost v svetu. Del naših raziskav prispeva tudi k ohranjanju bogastva naravne dediščine naše avtohtone favne in k razumevanju njene relativno velike biološke raznovrstnosti, ki je ena od pomembnih značilnosti majhne Slovenije.

ANG

Our investigations not only contribute into the world`s treasury of knowledge, but have also practical values. We develop procedures for production of more efficient and safer antivenoms, novel tumour chemotherapeutics, anticoagulant substances and antithrombotics as well as new tools for intracellular delivery of DNA (alkylpyridinium salts). With the same substances (alkylpyridinium salts) we develop non-toxic antifouling agents for the protection of the submerged surfaces. Very important aspect of our investigations is introducing and applying the latest research technologies, such as DNA microarrays, technology of systematic determination of genetic interactions (SGA), latest bioinformatics methods and proteomics. We actively participate in the development of new research methods. In collaboration with the Slovenian high-tech company we developed a manipulator for the automatic replica plating of ordered yeast colonies that will enable us technological advantage and competitiveness at the European level in the analysis of protein toxins and other bioactive substances at the genome level. We participate actively in the development of new bioinformatics tools for the analysis of the results of the genome research activities. We also develop new SPR-based methods for the study of interactions between proteins and lipid membranes. Our research group therefore represents innovative milieu, producing young researchers that are well trained with the latest research techniques in biochemistry, pharmacology, molecular biology and genomics. In such a manner the sphere of activity of our research group is very important for Slovenian economy in the form of setting up modern, biotechnology-based companies and laboratories. Therefore our largest pharmaceutical company Lek-Novartis collaborates intensively with our program group. Our research activity is important also for health and defence – in the later we had NATO support for part of our research connected with the war against bioterrorism. Very important is our participation in the education of young researchers and in the transfer of research-based knowledge to the Slovenian students. Majority of members of our research group is strongly involved into the teaching activities at undergraduate and postgraduate levels, at the Universities of Ljubljana, Maribor and Nova Gorica as well as at the Jožef Stefan International Postgraduate School. Some members of our research group are holders of Bologna reform-based renovation of faculty programs. A number of young researchers have been raised in our group, by making their BS, MSc and PhD theses, and moved later into the research labs of diverse research institutes and universities, medical clinical laboratories and to the pharmaceutical companies. By numerous publications in high-impact scientific journals, invited talks at international conferences, in academic institutions and in industry as well as with the organization of international scientific meetings our research group contributes to the international reinforcement of the reputation of Slovenian science (important part of national culture and originality). Our research group established numerous international collaborations with respectable investigators and institutions around the world. Members of our research group performed and perform some of the leading functions in the committees of European and international professional societies (at the moment Dr. Igor Križaj has a function of a secretary of the European section of IST and is the member of the board of IST), which helps in the international recognition of Slovenian science and in strengthening our national identity. A part of our investigations contributes to the preservation of the richness of our national heritage (of our autochthonic fauna) and to the understanding of our large biodiversity, one of the important

characteristics of small Slovenia.
------------------------------------

## 10. Zaključena mentorstva članov programske skupine pri vzgoji kadrov v obdobju 1.1.2009-31.12.2014<sup>11</sup>

### 10.1. Diplome<sup>12</sup>

vrsta usposabljanja	število diplom
bolonjski program - I. stopnja	36
bolonjski program - II. stopnja	12
univerzitetni (stari) program	54

### 10.2. Magisterij znanosti in doktorat znanosti<sup>13</sup>

Šifra raziskovalca	Ime in priimek	Mag.	Dr.	MR	
31914	Katja Ota	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
31915	Nejc Rojko	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
30876	Janez Kokošar	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
29474	Maja Anko	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
31862	Marjana Grandič	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
26231	Borut Jerman	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
29601	Ana Zovko	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
27839	Tanja Botič	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	
30888	Tamara Sajevec	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
27539	Biserka Bakrač	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
24291	Katja Rebolj	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
26507	Jure Pohleven	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
29424	Tilen Praper	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
27751	Andrej Bavdek	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
0	Barbara Tavčar	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	
24263	Zala Jenko Pražnikar	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
26460	Mojca Mattiazzi Ušaj	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
18802	Adrijana Leonardi	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	
25628	Lidija Kovačič	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
33313	Vesna Brglez	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
33137	Matej Skočaj	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
33470	Barbara Drašler	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	
36850	Tina Mesarič	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	

Legenda:

**Mag.** - Znanstveni magisterij  
**Dr.** - Doktorat znanosti  
**MR** - mladi raziskovalec

## 11. Pretok mladih raziskovalcev – zaposlitev po zaključenem usposabljanju<sup>14</sup>

--	--	--	--	--	--



Šifra raziskovalca	Ime in priimek	Mag.	Dr.	Zaposlitev
30876	Janez Kokošar	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	C - Gospodarstvo
31914	Katja Ota	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	E - Tujina
31915	Nejc Rojko	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	A - raziskovalni zavodi
29474	Maja Anko	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	A - raziskovalni zavodi
31862	Marjana Grandič	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	A - raziskovalni zavodi
26231	Borut Jerman	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	C - Gospodarstvo
29601	Ana Zovko	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	E - Tujina
27839	Tanja Botič	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	A - raziskovalni zavodi
30888	Tamara Sajevec	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	C - Gospodarstvo
27539	Biserka Bakrač	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	C - Gospodarstvo
24291	Katja Rebolj	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	A - raziskovalni zavodi
26507	Jure Pohleven	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	A - raziskovalni zavodi
29424	Tilen Praper	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	C - Gospodarstvo
27751	Andrej Bavdek	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	E - Tujina
24263	Zala Jenko Pražnikar	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	D - Javni zavod
26460	Mojca Mattiazzi Ušaj	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	A - raziskovalni zavodi
18802	Adrijana Leonardi	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	A - raziskovalni zavodi
25628	Lidija Kovačič	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	E - Tujina
33313	Vesna Brglez	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	E - Tujina
33137	Matej Skočaj	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	A - raziskovalni zavodi
33470	Barbara Drašler	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	A - raziskovalni zavodi
36850	Tina Mesarič	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	A - raziskovalni zavodi

Legenda zaposlitev:

- A** - visokošolski in javni raziskovalni zavodi
- B** - gospodarstvo
- C** - javna uprava
- D** - družbene dejavnosti
- E** - tujina
- F** - drugo

## 12. Vključenost raziskovalcev iz podjetij in gostovanje raziskovalcev, podoktorandov ter študentov iz tujine, daljše od enega meseca, v obdobju 1.1.2009-31.12.2014

Šifra raziskovalca	Ime in priimek	Sodelovanje v programski skupini	Število mesecev
0	Chiara Gambardella	B - uveljavljeni raziskovalec	2
0	Silvia Henriques	C - študent - doktorand	1
0	Adriana Oana Cuzman	B - uveljavljeni raziskovalec	1

0	Angelica Ganga	B - uveljavljeni raziskovalec	1	
0	Sofia Dashko	C - študent - doktorand	2	
0	Berta Avila Garatacos	C - študent - doktorand	6	
0	Kristina Radošević	D - podoktorand	3	
0	Vasili Atanasov	D - podoktorand	1	

Legenda sodelovanja v programski skupini:

- A** - raziskovalec/strokovnjak iz podjetja
- B** - uveljavljeni raziskovalec iz tujine
- C** - študent - doktorand iz tujine
- D** - podoktorand iz tujine

### 13. Vključevanje v raziskovalne programe Evropske unije in v druge mednarodne raziskovalne in razvojne programe ter drugo mednarodno sodelovanje v obdobju 1.1.2009-31.12.2014<sup>15</sup>

SLO

1. CONCO; 6. okvirni program EC, integrirani projekt; 037592, LSHBCT200703792:  
"Aplikativna venomika polža *Conus consors* za pospešeno, cenejšo, bolj varno in etično pridobivanje inovativnih biomedicinskih zdravil."  
Vodja v programski skupini (PS): Igor Križaj.
2. FP7: BIONMR00135: "Strukturna razlaga visokega dviga encimske aktivnosti sekretornih fosfolipaz A2 v kompleksu s kalmodulinom z NMR visoke ločljivosti".  
Vodja v PS: Lidija Kovačič.
3. FP7 YesVitE; 7. okvirni program EC, FP7PEOPLE2013 IRSES, Grant Agreement Number 612441: "Kvasovke za trajnostno vinogradništvo in vinarstvo".  
Vodja v PS: Uroš Petrovič.
4. BI-AT/09-10-019: "Identifikacija esencialnih proteinov, vključenih v nastanek peroksisomov in lipidnih telesc (Identification of essential proteins involved in peroxisome and lipid droplet biogenesis in yeast)".  
Vodja v PS: Uroš Petrovič.
5. BI-FR/08-09-PROTEUS-007: "Biokemijske in strukturne raziskave viperidnih fosfolipaz A2 v kompleksih z njihovimi vezavnimi proteini (Biochemical and structural characterization of phospholipases A2 from viperids in complexes with their binding proteins)".  
Vodja v PS: Igor Križaj.
6. BI-IT/05-08-021: "Vloga sekrecijskih fosfolipaz A2 pri delovanju in v boleznih mitohondrijev (The role of secreted phospholipases A2 in mitochondrial function and dysfunction)".  
Vodja v PS: Igor Križaj.
7. 021-0212432-2033 (hrvaški nacionalni raziskovalni projekt): "Imunogeničnost komponenti kompleksnih antigenov".  
Vodja v PS: Igor Križaj.
8. USA-SLO 510-75/2009: "Struktura, funkcija in možne aplikacije proteinov egerolizinske družine (Structure, function and putative applications of aegerolysin-like proteins)"

Vodja v PS: Kristina Sepčič.

9. BI-IT/05-08-025: "Toksini, ki tvorijo pore kot koristna orodja v biotehnologiji- molekularni mehanizmi delovanja (Pore forming toxins as useful tools in biotechnology- molecular mechanism of action)"

Vodja v PS: Gregor Anderluh.

10. The Royal Society International Joint Project: "Strukturne lastnosti perforinskih por (Structural properties of perforin pores)".

Vodja v PS: Gregor Anderluh.

11. BI-CRO/10-11-025: "Izolacija komponent strupa modrasa (*Vipera ammodytes ammodytes*) in analiza njihove imunogenosti (Isolation of long-nosed viper (*Vipera ammodytes ammodytes*))".

Vodja v PS: Igor Križaj.

12. BI-AT/11-12-014: "Genomski pristopi za povečanje sposobnosti biosinteze triacilglicerolov kvasovke (A genome-scale approach to maximization of triacylglycerol biosynthesis in yeast)".

Vodja v PS: Igor Križaj.

13. BI-BG/11-12-006: "Primerjalna študija dveh strukturno različnih nevrotoksičnih fosfolipaz A2, amoditoksina iz modrasa (*Vipera ammodytes ammodytes*) in vipoxina iz bolgarskega gada (*Vipera ammodytes meridionalis*) (Comparative study of two structurally diverse neurotoxic phospholipases A2, ammodytoxin from the long-nosed viper (*Vipera ammodytes ammodytes*) and vipoxin from the Bulgarian sand viper (*Vipera ammodytes meridionalis*) venoms)".

Vodja v PS: Igor Križaj.

14. BI-US/11-12-030: "Spremembe v prostorsko-časovni dinamiki endocitoze ob perturbaciji membrane (Changes in spatiotemporal dynamics of endocytosis upon membrane perturbation)".

Vodja v PS: Igor Križaj.

15. BI-US/510-75: "Struktura, funkcija in možne aplikacije proteinov egerolizinske družine (Structure, function, and possible applications of aegerolysin-like proteins)".

Vodja v PS: Kristina Sepčič.

16. BI-IT/11-13-010: "Ovrednotenje možnosti uporabe antivegetativnih premazov na osnovi naravnih snovi za zaščito kulturne dediščine (Evaluation of possibilities for the application of antifouling coatings based on natural compounds in protection of cultural heritage)".

Vodja v PS: Tom Turk.

17. BI-US/12-13-043: "Alkilpiridinijeve spojine kot antagonisti nikotinskih ACh receptorjev-potencialna sredstva za zdravljenje nekaterih oblik pljučnega raka (Alkylpyridinium compounds antagonists of nACh receptors-potential chemotherapeutics for treatment of certain lung cancer types)".

Vodja v PS: Tom Turk.

18. BI-US/12-13-014: "Monoklonska protitelesa za modulacijo aktivnosti človeškega perforina (Monoclonal antibodies for human perforin modulation)".

Vodja v PS: Gregor Anderluh.

19. Proteus: FR 2012-6: "Towards the identification of N-type sPLA2 receptors".

Vodja v PS: Jože Pungerčar.

20. BI-US/510-75/2009: "Structure, function, and possible applications of aegerolysinlike proteins".

Vodja v PS: Kristina Sepčić.

21. BI-HR/12-13-025: "Molecular interactions in protein synthesis".

Vodja v PS: Gregor Anderluh.

22. BI-JP/13-15-001: "Molecular dissection of the distribution and the dynamics of membrane sphingomyelin".

Vodja v PS: Gregor Anderluh.

**14. Vključenost v projekte za uporabnike, ki so v obdobju trajanja raziskovalnega programa (1.1.2009–31.12.2014) potekali izven financiranja ARRS<sup>16</sup>**

SLO

1. L2-1112-1539-08: Tehnologije znanj za odkrivanje novih zdravilnih učinkovin: analiza in načrtovanje eksperimentov v visokozmogljivostni genetiki. Partnerji: Lek-Novartis, UL/FRI (nosilec), IJS.

2. BIO 01/2009: Analiza N-terminalnih zaporedij proteinov. Naročnik: Lek-Novartis.

3. Sodelovanje v okviru Infrastrukturnega centra za površinsko plazmno resonanco s farmacevtskim podjetjem Lek-Novartis.

4. BIO38/2009: Pogodba o sodelovanju z Lek farmacevtska družba d.d.

5. Delo za zunanje uporabnike, podjetje AdriaCell.

6. Opravljanje komercialnih analiz določanja N-terminalnega aminokislinskega zaporedja polipeptidov po Edmanovi metodi (naročniki: LEK d.d. Ljubljana; Biotehniška fakulteta; Kemijski inštitut ...)

7. Pogodba za merjenje molekularnih interakcij (BIO 4/2012) s Farmacevtsko družbo LEK.

**15. Ocena tehnološke zrelosti rezultatov raziskovalnega programa in možnosti za njihovo implementacijo v praksi (točka ni namenjena raziskovalnim programom s področij humanističnih ved)<sup>17</sup>**

SLO

Nekateri rezultati naše skupine so potencialno zanimivi za nadaljnjo razvojno dejavnost.

1. Alkilpiridinijeve polimere razvijamo v smeri uporabe pri transfekciji celic oziroma za izdelavo premazov in barv za preprečevanje naseljevanja organizmov na podvodne površine. Sintetični alkilpiridinijevi polimeri so se izkazali tudi kot zelo učinkoviti inhibitorji nikotinskega tipa acetilholinskih receptorjev, ki so povezani z uravnavanjem apoptoze pljučnih rakavih celic. Kot takšni so potencialno zanimivi za razvoj novega tipa protitumorskih zdravil.

2. Raziskave proteina ostreolizina A iz gobe *Pleurotus ostreatus* so pokazale, da bi utegnil biti ta protein zelo uporaben v citokemiji in celični biologiji kot dokaj specifičen označevalec celičnih membranskih domen, ki so obogatene s holesterolom in sfingomielinom. Podobno velja za drug protein, ekvinatoksin iz strupa konjske vertnice *Actinia equina*, ki specifično prepoznava sfingomielin.

3. Na temelju našega odkritja mehanizma antikoagulantnega delovanja sPLA2 iz modrasovega strupa (AtxA) razvijamo nov tip učinkovin, antikoagulantov z antiprotrombinaznim delovanjem. Antitrombotiki so nujno potrebni v kliničnih primerih, v katerih je potreben nadzor nad strjevanjem krvi oziroma nastajanje krvnih strdkov ni zaželeno.

4. Na temelju našega odkritja netoksične fibrinogenaze v strupu modrasa razvijamo rekombinanten encim za lokalno preprečevanje nastajanja fibrinskih strdkov.

5. Izboljšava metode 'XQTL' za določanje kavzalnih genov pri poligenskih lastnostih omogoča lažji prenos in natančnejše načrtovanje takšnih lastnosti, med katere sodijo večinoma vse biotehnoško pomembne lastnosti, pri industrijskih mikroorganizmih.

Vsi opisani primeri tehnološko obetavnih rezultatov programske skupine so še v eksperimentalni oziroma predklinični fazi. Razvoj v smeri produktov na osnovi raziskav pod točko 1 je zanimiv za industrijo premazov in barv, produktov pod točko 1 in 2 za raziskovalne in klinične laboratorije, produktov pod točkami 1, 3 in 4 pa za uporabo v medicini. Razvoj metode pod točko 5 je potencialno izjemnega pomena za področje industrijske mikrobne biotehnologije.

**16. Ocenite, ali bi doseženi rezultati v okviru programa lahko vodili do ustanovitve spin-off podjetja, kolikšen finančni vložek bi zahteval ta korak ter kakšno infrastrukturo in opremo bi potrebovali**

možnost ustanovitve spin-off podjetja	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
potrebni finančni vložek	EUR
ocena potrebne infrastrukture in opreme <sup>18</sup>	

**17. Izjemni dosežek v letu 2014<sup>19</sup>**

**17.1. Izjemni znanstveni dosežek**

[COBISS.SI-ID 1764911] EpCAM je zelo pomemben tumorski označevalec, saj se na površini rakastih celic pojavlja v bistveno večji množini kot na površini zdravih celic. Zato je zelo primerna molekula tudi za ciljno dostavo zdravilnih učinkovin na mesto karcinoma. Razvoj dostavnih sistemov, ki temeljijo na EpCAM, je zaradi pomanjkanja strukturnih podatkov do sedaj potekal večinoma po principu poskusov in napak. Določitev terciarne in kvartarne strukture EpCAM, ki smo jo objavili (glej Sliko 1 v priponki), je omogočila načrtovan pristop k snovanju učinkovitih dostavnih sistemov, kot tudi vpogled v vlogo EpCAM pri medceličnih interakcijah in signaliziranju, prav tako povezanem s pospešeno rastjo celic. Velik pomen dosežka potrjuje dejstvo, da smo ga uspeli objaviti v prestižni reviji Nature Communications.

**17.2. 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 in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS;
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v papirnati obliki;
- so z vsebino poročila seznanjeni in se strinjajo vsi izvajalci raziskovalnega programa.

**Podpisi:**

*zastopnik oz. pooblaščen oseba  
matične RO (JRO in/ali RO s  
koncesijo):*

in

*vodja raziskovalnega programa:*

Institut "Jožef Stefan"

Igor Križaj

**ŽIG**

Kraj in datum:

Ljubljana

12.3.2015

**Oznaka poročila: ARRS-RPROG-ZP-2015/6**

<sup>1</sup> Napišite povzetek raziskovalnega programa v slovenskem jeziku (največ 3.000 znakov vključno s presledki – približno pol strani, velikost pisave 11) in angleškem jeziku (največ 3.000 znakov vključno s presledki – približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>2</sup> Napišite kratko vsebinsko poročilo, v katerem predstavite raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega programa in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. V primeru odobrenega povečanja obsega financiranja raziskovalnega programa v letu 2014 mora poročilo o realizaciji programa dela zajemati predložen program dela ob prijavi in predložen dopolnjen program dela v letu 2014. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>3</sup> Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>4</sup> V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa dela raziskovalnega programa, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega programa oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave programske skupine v zadnjem letu izvajanja raziskovalnega programa, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, navedite: "Ni bilo sprememb.". Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>5</sup> Navedite znanstvene dosežke (največ pet), ki so nastali v okviru izvajanja raziskovalnega programa. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja programa 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](#)

<sup>6</sup> Navedite družbeno-ekonomske dosežke (največ pet), ki so nastali v okviru izvajanja raziskovalnega programa. Družbeno-ekonomski dosežek iz obdobja izvajanja programa 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 programa ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

<sup>7</sup> Navedite rezultate raziskovalnega programa iz obdobja izvajanja programa v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki (približno 1/3 strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

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

<sup>9</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki (približno 2/3 strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>10</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki (približno 2/3 strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>11</sup> Upoštevajo se le tiste diplome, magisteriji znanosti in doktorati znanosti (zaključene/i v obdobju 1.1.2009–31.12.2014), pri katerih so kot mentorji sodelovali člani programske skupine. [Nazaj](#)

Vpišite število opravljenih diplom v času izvajanja raziskovalnega programa glede na vrsto usposabljanja. [Nazaj](#)

<sup>13</sup> Vpišite šifro raziskovalca in/ali ime in priimek osebe, ki je v času izvajanja raziskovalnega programa pridobila naziv magister znanosti in/ali doktor znanosti ter označite doseženo izobrazbo. V primeru, da se je oseba usposabljala po programu Mladi raziskovalci, označite "MR". [Nazaj](#)

<sup>14</sup> Za mlade raziskovalce, ki ste jih navedli v tabeli 11.2. točke (usposabljanje so uspešno zaključili v obdobju od 1.1.2009 do 31.12.2014), izberite oz. označite, kje so se zaposlili po zaključenem usposabljanju. [Nazaj](#)

<sup>15</sup> Navedite naslove projektov in ime člana programske skupine, ki je bil vodja/koordinator navedenega projekta. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>16</sup> Navedite naslove projektov, ki ne sodijo v okvir financiranja ARRS (npr: industrijski projekti, projekti za druge naročnike, državno upravo, občine idr.) in ime člana programske skupine, ki je bil vodja/koordinator navedenega projekta. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>17</sup> Opišite možnosti za uporabo rezultatov v praksi. Opišite izdelke oziroma tehnologijo in potencialne trge oziroma tržne niše, v katere sodijo. Ocenite dodano vrednost izdelkov, katerih osnova je znanje, razvito v okviru programa oziroma dodano vrednost na zaposlenega, če jo je mogoče oceniti (npr. v primerih, ko je rezultat izboljšava obstoječih tehnologij oziroma izdelkov). Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>18</sup> Največ 1.000 znakov vključno s presledki (približno 1/6 strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

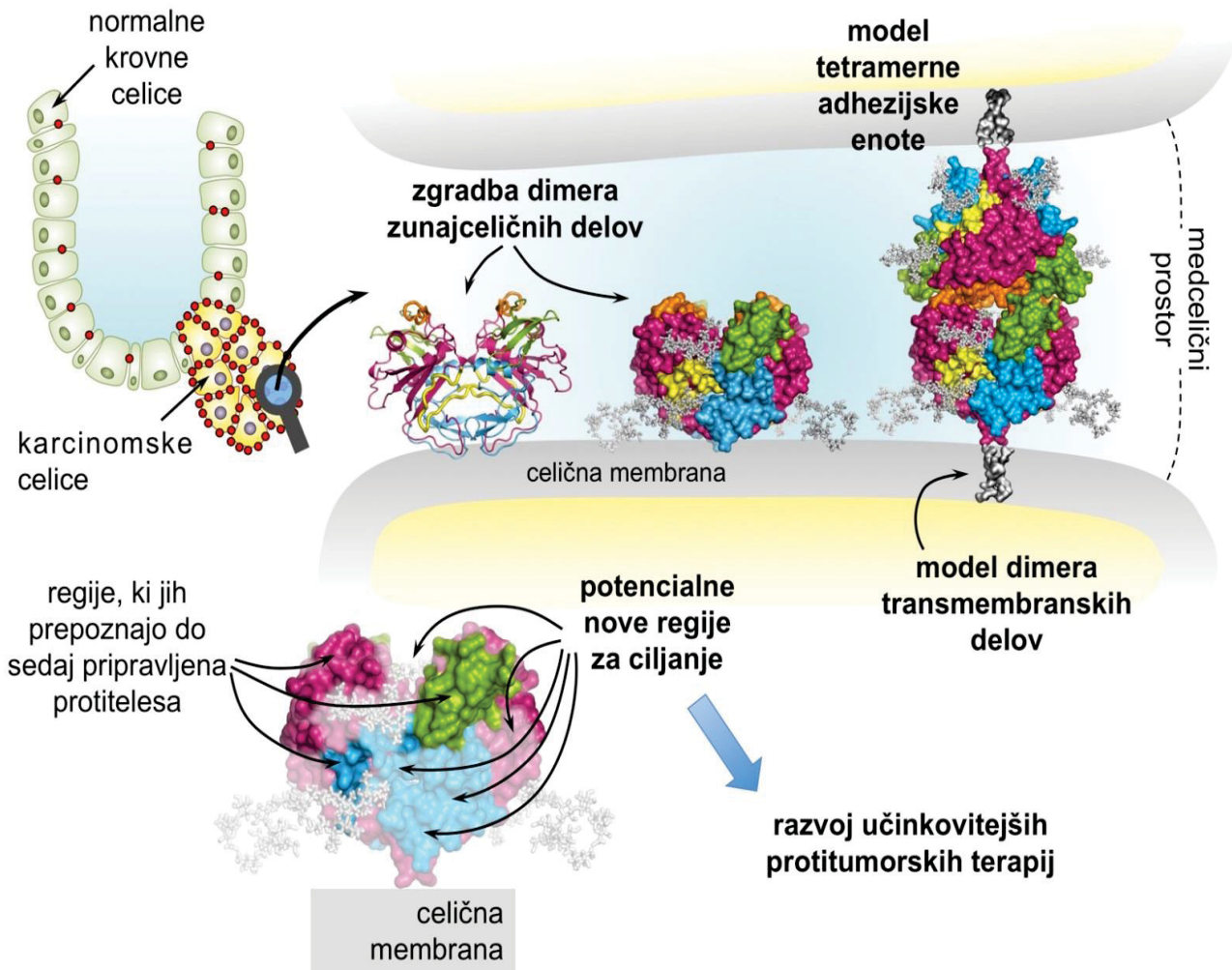
<sup>19</sup> Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega programa v letu 2014 (največ 1000 znakov, vključno s presledki, velikost pisave 11). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (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-RPROG-ZP/2015 v1.00b

03-38-9D-26-8B-14-2E-D0-C1-BF-76-00-1A-54-C7-01-82-FC-A6-39

## **Priloga 1**





**Slika 1. Epitelijska celična adhezijska molekula – biološka vloga in pomen poznavanja njene tridimenzionalne strukture.** Epitelijska celična adhezijska molekula (EpCAM), modularen transmembranski glikoprotein, je že nekaj desetletij znan kot zelo pomemben tumorski označevalec, saj se na površini rakastih celic pojavlja v bistveno večjih količinah kot na površini normalnih celic. Zato ga lahko uporabimo tudi za ciljano dostavo zdravilnih učinkovin na mesto karcinoma. Razvoj molekul in dostavnih sistemov, ki temeljijo na specifičnosti za EpCAM, je zaradi pomanjkanja strukturnih podatkov za EpCAM do danes potekal večinoma po principu poskusa in napake. Z namenom, da se omogoči bolj načrten pristop k delu, smo določili 3D zgradbo zunajceličnega dela EpCAM. Pokazali smo, da molekula na celični površini tvori dimer, s pomočjo molekulske dinamike pa preučili dimerizacijo transmembranskega dela EpCAM in predstavili model medcelične tetramerne enote. Naš dosežek je izjemno pomemben, saj natančno poznavanje 3D strukture EpCAM omogoča ciljanje točno določenih regij na površini te molekule ter s tem načrtovanje učinkovitejših dostavnih sistemov, prav tako pa naši rezultati nudijo vpogled v osnovne funkcije te molekule - vlogo pri vzpostavljanju interakcij med celicami in pri signaliziranju, povezanem s pospešeno rastjo celic. Velik pomen dosežka potrjuje dejstvo, da smo ga uspeli objaviti v prestižni reviji *Nature Communications* [Pavšič et al. (2014) *Nature Communications* 5, 4764].