

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/149

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J1-0317
Naslov projekta	Karakterizacija interakcij ligand-receptor
Vodja projekta	8329 Simona Golič Grdadolnik
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	4.170
Cenovni razred	D
Trajanje projekta	02.2008 - 01.2011
Nosilna raziskovalna organizacija	104 Kemijski inštitut
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Družbeno-ekonomski cilj	13. Splošni napredek znanja - RiR financiran iz drugih virov (ne iz splošnih univerzitetnih fondov - SUF)

1.1. Družbeno-ekonomski cilj¹

Šifra	13.01
Naziv	Naravoslovne vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)

2. Sofinancerji²

1.	Naziv	
	Naslov	
2.	Naziv	
	Naslov	
3.	Naziv	
	Naslov	

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta³

Projekt je bil usmerjen v vpeljavo in razvoj metodologije za določanje interakcij ligand-receptor. Poznavanje konformacijskih lastnosti liganda in vezavnega mesta receptorja ter njunih interakcij v kompleksu ligand-receptor je bistveno za racionalno načrtovanje novih molekul z ugodnejšo interakcijsko energijo funkcionalnih skupin liganda in receptorja, ki vodi do visoke vezavne afinitete in visoke selektivnosti novih spojin vodnic. NMR spektroskopija in rentgenska difrakcija sta najzmogljivejši fizikalni orodji za prepoznavanje in karakterizacijo narave interakcij med ligandi in receptorji v širokem območju vezavnih afinitet. Obe metodi nudita eksperimentalno osnovo odkrivanja zdravil z metodo fragmentov, ki zahteva težavno detektiranje šibkih interakcij med proteinsko tarčo in molekulami z nizko molekularno maso. Čeprav rentgenska difrakcija ni omejena z velikostjo proteinov kot mnogo NMR metod, pa je NMR spektroskopija prepoznana kot bolj primerna za natančno analizo interakcij ligand-receptor v okolju, ki je bližje fiziološkemu pogojem v živi celici. Poleg tega omogoča NMR spektroskopija študije dinamičnih procesov v molekulah in molekulskih kompleksih. Poznano je, da lahko konformacijska dinamika močno vpliva na stabilnost kompleksov ligand-protein. S stališča koncepta inducirane prilagoditve liganda v vezavno mesto receptorja pridobimo s študijami konformacijske dinamike komplementarno informacijo študijam relacije med aktivnostjo in strukturo ter študijam kristalnih struktur. Zato smo v naših raziskavah interakcij ligand-receptor kot osnovno eksperimentalno metodo uporabili NMR spektroskopijo.

Raziskali smo uporabnost NMR metod za natančno določanje konstante disociacije in funkcionalnih skupin ligandov, ki temeljijo na opazovanju signalov liganda. Te so primerne za raziskave vezavnih interakcij ligandov z zmerno vezavno afiniteto. Uporabili smo metode prenosa saturacije (STD), diferencialnega širjenja linij in longitudinalnega relaksacijskega časa. Pokazali smo, da je STD metoda bistveno natančnejša od slednjih dveh metod, ker ni tako močno odvisna od uravnavanja nehomogenosti magnetnega polja ali prisotnosti paramagnetnega kisika. Raziskali smo vpliv specifičnih relaksacijskih lastnosti liganda na STD faktorje ojačanja in določili primerne eksperimentalne parametre za "epitope mapping" s STD metodo, ki omogoča ugotavljanje intenzivnosti interakcije posameznih delov novih ligandov z vezavnim mestom proteina. Ugotovili smo, da v literaturi pogosto ne navajajo relaksacijskih lastnosti ligandov in pri STD meritvah predpostavljajo, da je longitudinalni čas ligandov uniformen. Naši rezultati so pokazali, da je longitudinalni relaksacijski čas protonov tudi v primeru majhnih ligandov izrazito ne-uniformen in močno vpliva na jakost STD amplifikacijskih faktorjev. Zato v primeru standardnih eksperimentalnih parametrov STD metode, ki so objavljeni v literaturi, povzroči nepravilno določitev za vezavo pomembnih funkcionalnih skupin liganda.

Z optimiziranimi eksperimentalnimi parametri STD metode smo določali jakost interakcije funkcionalnih skupin serije novih derivatov naftalen-N-sulfonyl-D-glutaminske kisline z encimom MurD ligazo (1). Nove MurD ligande so načrtovali in sintetizirali v Lek farmacevtski družbi. Izkazali so zmerno inhibitorno aktivnost z IC_{50} vrednostmi v območju od 100 do 810 μ M in so primerni za načrtovanje novih antibakterijskih učinkovin. S STD metodo smo pokazali pomembno vlogo hidrofobnih interakcij ligand-receptor na povečano inhibitorno aktivnost novih ligandov in definirali molekularne segmente, ki jih tvorijo. Z NMR metodo prenesenega NOE efekta smo prepoznali konformacijsko fleksibilnost novih inhibitorjev v vezavnem mestu encima in jo nadalje raziskali z računalniškimi simulacijami kompleksov ligand-receptor. Določili smo vpliv fleksibilnosti na posamezne interakcije ligand-receptor. Ugotovili smo, da je stopnja fleksibilnosti povezana s specifičnimi elementi molekularne strukture ligandov in z razlikami v njihovi inhibitorni aktivnosti. S kombinacijo obeh NMR metod, STD in prenesenega NOE efekta, ki temeljita na opazovanju signalov liganda ter računalniških simulacij molekularne dinamike, smo dobili nov vpogled v vezavne lastnosti novih inhibitorjev (1), ki lahko bistveno nadgradi racionalno načrtovanje novih učinkovin

osnovano le na študijah rigidne kristalne strukture kompleksov ligand-receptor.

Določili smo primerno kombinacijo izotopskega označevanja in NMR metode za sledenje vezave novih vrst ligandov na MurD ligazo z opazovanjem NMR signalov proteina. Te metode so pomembne za ugotavljanje vezavnih mest ligandov s popolnoma drugačnimi strukturnimi lastnostmi in določanje funkcionalnih skupin receptorja, kar na podlagi opazovanja resonanc ligandov ni mogoče. Zaradi velike molske mase MurD (47.7 kDa) se je kombinacija cenejšega ^{15}N izotopskega označevanja MurD in ^{15}N editiranih NMR metod izkazala za neprimerno. Tudi z uporabo TROSY tehnike ločljivost signalov v ^1H - ^{15}N heterokorelacijskih spektrih ni bila zadostna za sledenje vezave novih vrst ligandov. Zato smo po predhodni optimizaciji postopkov izotopskega označevanja MurD encima v smeri večjih izkoristkov pripravili ustrezne količine dražjega ^{13}C selektivno označenega encima na mestih metilnih skupin stranskih verig Leu, Val in Ile aminokislinskih ostankov.

Zaradi nizkih izkoristkov pri začetnih pripravah encima in s tem povezane večje uporabe dragih ^{13}C izotopsko označenih kemikalij smo na posameznih stopnjah postopka izolacije in čiščenja encima preiskusili več faktorjev, ki bi lahko zmanjšali obarjanje encima, npr. spreminjanje pH pufru ali odstranjevanje imidazola z ultrafiltracijo in dializo pred postopkom koncentriranja vzorca. V zadnjih izolacijah smo natančno sledili koncentracijo encima na vseh stopnjah procesa in za čiščenje ter analizo encima uporabili gelsko kromatografijo s FPLC, ki omogoča precizno zbiranje posameznih frakcij. Z optimiziranim postopkom smo dobili zadovoljive izkoristke pri pripravi ^{13}C selektivno označenega encima (2,3). Tako označen protein omogoča detekcijo metilnih skupin s ^{13}C editiranimi heterokorelacijskimi metodami.

Ugotovili smo, da je zaradi boljših relaksacijskih lastnosti metilnih skupin, ločljivost signalov v ^1H - ^{13}C heterokorelacijskih spektrih MurD ustrezna za sledenje vezave novih vrst ligandov. Kemijske premike metilnih skupin smo izmerili z $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC metodo. Asignacijo signalov metilnih skupin v ATP in UDP vezavnih mestih smo izvedli s primerjavo vzorcev sprememb kemijskih premikov metilnih skupin ob vezavi ligandov z različnimi funkcionalnimi skupinami, z uporabo podatkov o vezavnih interakcijah v objavljenih kristalnih ali NMR strukturah encima z inhibitorji in na podlagi primerjave s teoretično izračunanimi kemijskimi premiki s programom SHIFTS (2,3,4,5).

Z merjenjem sprememb kemijskih premikov metilnih skupin encima smo določili vezavna mesta novih vrst potencialnih MurD inhibitorjev, ki so jih sintetizirali na Fakulteti za farmacijo, UL. Dokazali smo, da se novi rodaninski derivati vežejo le v vezavno mesto UDP substrata in ugotovili, da so locirani v uracilnem delu vezavnega mesta (4). Na podlagi študij tridimenzionalne strukture UDP in ATP vezavnih mest ter molekularne strukture rodaninskih derivatov je bila predvidena možnost vezave v obe vezavni mesti. Z NMR študijami smo ovrgli možnost vezave v ATP vezavno mesto. Na enak način smo raziskali tudi vezavo novih naftalen-*N*-sulfonil derivatov z rigidnimi mimetiki D-Glu dela. Pokazali smo, da rigidni mimetiki interagirajo z D-Glu vezavnim mestom (5). Tako smo pri obeh vrstah novih MurD ligandov določili njihovo lego v vezavnem mestu receptorja in omogočili načrtovanje novih bolj aktivnih analogov na podlagi optimizacije interakcij s funkcionalnimi skupinami vezavnega mesta. Z NMR metodami in simulacijami molekularne dinamike smo raziskali dinamične procese ligand-MurD kompleksov novih derivatov z rigidnimi mimetiki D-Glu dela (3). Poleg konformacijske fleksibilnosti novih inhibitorjev v vezavnem mestu encima smo ugotovili tudi časovno odvisne variacije v medsebojni legi posameznih domen encima MurD. Določili smo vpliv posameznih interakcij ligand-receptor na dinamične procese v kompleksu in povezali razlike strukturno-dinamičnih lastnosti kompleksov z razikami v biološki aktivnosti novih derivatov.

S kombinacijo NMR metod (STD, NOESY, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC) in teoretičnih metod (sidranje v vezavno mesto in molekularno dinamiko) smo določili vezavno mesto novega

indoliliden-rodaninskega inhibitorja ligaze MurD in kvantitativno ovrednotili njegove nekovalentne interakcije pri tvorbi kompleksa z MurD receptorjem (3). Novi inhibitor so odkrili z metodo virtualnega reševanja v Lek farmacevtski družbi. Zaradi novega strukturnega skeleta in zmerne mikrobiološke aktivnosti nam novi inhibitor predstavlja dobro izhodišče za strukturne variacije pri odkrivanju novih spojin vodnic z visoko vezavno afiniteto in dobro mikrobiološko aktivnostjo. Ugotovili smo, da je za razliko od večine naftalen-*N*-sulfonil derivatov stabilno zasidran v vezavno mesto in pokazali možne strukturne variacije pri načrtovanju novih analogov z boljšo interakcijsko energijo in višjo vezavno afiniteto.

V sodelovanju z grškimi in ciprskimi raziskovalnimi skupinami (Univerza v Atenah, Univerza v Patrasu, Nacionalni helenski inštitut in Center za aplikativne raziskave in tehnologijo v Nikoziji) smo raziskovali vezavne interakcije EAE agonistov in antagonistov s T-celičnim receptorjem ter vezavne interakcije AT₁ antagonistov z AT₁ receptorjem.

EAE antagonisti inhibirajo modelni eksperimentalni sistem EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) za študij skleroze multipleks. Postavili smo robustno metodo za določanje možne bioaktivne konformacije lineranih peptidnih analogov mielinskega proteina in pokazali, da generira primerne začetne konformacije za raziskave njihovih interakcij s T-celičnim receptorjem (6). Ugotovili smo, da imajo antagonisti zaradi drugačne topologije aminokislinskih ostankov, ki se zasidrajo v T-celični receptor (TCR), manj hidrofobnih interakcij s TCR kot nativni agonist. Predpostavljamo, da izguba hidrofobnih interakcij preprečuje aktivacijo T-celic in definira antagonistično delovanje lineranih peptidnih analogov mielinskega proteina. Z enako metodologijo smo določili vezavne interakcije dveh novih sintetičnih peptidnih EAE antagonistov z receptorjema HLA-DR in TCR (7). Ugotovili smo razlike v njunem načinu vezave, predvsem na TCR receptor, ki vplivajo na biološko aktivnost. Pokazali smo, da že substitucija ene aminokislinske močno vpliva na biološko aktivnost peptidnih analogov mielinskega proteina.

Inhibicija transmembranskega AT₁ receptorja je nov uspešen način zdravljenja visokega krvnega pritiska. Z NMR konformacijskimi študijami valsartana v topilu in simulacijami molekularne dinamike kompleksa valsartan-AT₁ receptor v membranskem okolju smo pridobili nov vpogled v mehanizem delovanja AT₁ antagonistov (8). Ugotovili smo, da membransko okolje poveča vezavne interakcije valsartana z AT₁ receptorjem in stabilizira ligand v aktivnem mestu receptorja. Potrdili smo našo hipotezo, da je interakcija z membranskim okoljem eden izmed ključnih vidikov pri načrtovanju novih AT₁ antagonistov. Predpostavili smo model delovanja AT₁ antagonistov, pri katerem učinkovina proti visokemu krvnemu pritisku najprej interagira z membrano in potem laterarno difundira do vezavnega mesta, transmembranskega AT₁ receptorja. Načrtovali in sintetizirali smo novo vrsto AT₁ antagonistov z znatnim antihipertenzivnim učinkom, ki imajo drugačne strukturne lastnosti kot znani ne-peptidni AT₁ antagonisti (SARTANi). Uporabili smo kombinacijo eksperimentalnih (NMR, Raman, DSC, ozkokotno rentgensko sipanje) in teoretičnih (*in silico* umestitev v vezavno mesto in molekularno dinamiko) metod za natančno določitev interakcij učinkovina-membrana in učinkovina-aktivno mesto receptorja za novo vrsto AT₁ antagonista (9), ki jo potrebujemo za načrtovanje analogov z izboljšanim biološkim profilom. Pokazali smo, da aktivnost nove vrste antagonistov lahko izboljšamo na dva načina: z upoštevanjem termodinamskih efektov na lipidne dvosloje in s prilagajanjem stereoelektronskim lastnostim aktivnega mesta receptorja.

S kombinacijami eksperimentalnih in teoretičnih metod smo uspešno določali strukturne in dinamične lastnosti kompleksov različnih vrst novih biološko aktivnih

učinkovin s proteinskimi tarčami in ovrednotili interakcije ligand-receptor. Postavili smo strategije za racionalno načrtovanje aktivnejših analogov (10). Pri študijah novih inhibitorjev Mur ligaz, ki so usmerjene v razvoj novih protibakterijskih učinkovin, smo sodelovali z raziskovalci iz Lek farmacevtske družbe in pripomogli k uspešni izvedbi Lekovih razvojnih projektov. Razvoj protibakterijskih učinkovin je čedalje pomembnejši zaradi pojava bakterijske rezistence, ki se v zadnjih letih izrazito stopnjuje po svetu in je marsikdaj, zlasti v bolnišnicah, kritična. S študijami novih EAE in AT₁ antagonistov smo poglobili naše mednarodno sodelovanje in prispevali k razvoju učinkovin za zdravljenje visokega krvnega pritiska in multiple skleroze. Zaradi naše eksperitize za karakterizacijo ligand-receptor interakcij, ki smo jo izpopolnili v okviru tega projekta, smo bili povabljeni k sodelovanju pri prijavah več evropskih projektov. Eden izmed projektov (FP7-2009-REGPOT-1, ARCADE, št. 245866), pri katerem smo partner, je že sprejet.

1. M. Simčič, M. Hodošček, J. Humljan, K. Kristan, U. Urleb, D. Kocjan, S. Golič Grdadolnik. NMR and molecular dynamics study of the binding mode of naphthalene-N-sulfonyl-D-glutamic acid derivatives: novel MurD ligase inhibitors. *J. Med. Chem.* 2009, 52, 2899-2908. [COBISS.SI-ID [4121626](#)]
2. M. Simčič, I. Sosič, M. Hodošček, S. Gobec, S. Golič Grdadolnik. 2011. The effect of conformationally rigid D-Glu mimetics on the binding mode of second generation of MurD sulfonamide inhibitors: NMR and Molecular Dynamics Study. *J. Med. Chem.* 2011, poslano v recenzijo.
3. M. Simčič, K. Lotrič, K. Kristan, U. Urleb, D. Kocjan, and S. Golič Grdadolnik. Protein-inhibitor binding by NMR spectroscopy, molecular dynamics study and enzyme inhibition evaluation of a new rhodanine analogue on UDP-N-acetylmuramyl-l-alanine: D-glutamate (MurD) ligase. *J. Biol. Chem.* 2011, poslano v recenzijo.
4. T. Tomašić, N. Zidar, A. Kovač, S. Turk, M. Simčič, D. Blanot, M. Müller-Premru, M. Filipič, S. Golič Grdadolnik, A. Zega, M. Anderluh, S. Gobec, D. Kikelj, and L. Peterlin Mašič. 5-Benzylidenethiazolidin-4-ones as multitarget inhibitors of bacterial Mur ligases. *ChemMedChem*. 2010, 5, 286-295. [COBISS.SI-ID [2743921](#)]
5. I. Sosič, H. Barreateau, M. Simčič, R. Šink, J. Cesar, A. Zega, S. Golič Grdadolnik, C. Contreras-Martel, A. Dessen, A. Amoroso, B. Joris, D. Blanot, S. Gobec. Second-generation sulfonamide inhibitors of D-glutamic acid-addong enzyme: activity optimisation with conformationally rigid analogues of D-glutamic acid. *Eur. J. Med. Chem.* 2011, v tisku.
6. E. D. Mantzourani, T. V. Tselios, K. Blokar, J. Matsoukas, J. A. Platts, A. Brancale, J. Matsoukas, T. Mavromoustakos, S. Golič Grdadolnik. A combined NMR and molecular dynamics simulation study to determine the conformational properties of agonists and antagonists against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16, 2171-2182. [COBISS.SI-ID [3843610](#)]
7. C. Potamitis, M. Matsoukas, T. Tselios, T. Mavromoustakos, S. Golic Grdadolnik. Conformational Analysis of the Peptide Analogues [Phe⁹¹]MBP₈₃₋₉₉ and [Tyr⁹¹]MBP₈₃₋₉₉ and study of their interactions with HLA-DR2 receptor using Molecular Dynamics. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2011, v recenziji.
8. C. Potamitis, M. Zervou, V. Katsiaras, P. Zoumpoulakis, S. Durdagi, MG. Papadopoulos, JM. Hayes, S. Golič Grdadolnik, I. Kyrikou, D. Argyropoulos, G. Vatougia, T. Mavromoustakos. Antihypertensive drug valsartan in solution and at the AT₁ receptor: conformational analysis, dynamic NMR spectroscopy, in silico docking, and molecular dynamics simulations. *J. Chem. Inf. Mod.*, 2009, 49, 726-739. [COBISS.SI-ID [4115994](#)]
9. C. Fotakis, S. Gega, E. Siapi, C. Potamitis, K. Viras, P. Moutevelis-Minakakis, C.G. Kokotos, S. Durdagi, S. Golič Grdadolnik, B. Sartori, M. Rappolt, T. Mavromoustakos.

Interactions at the bilayer interface and receptor site induced by the novel synthetic pyrrolidinone analog MMK3. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 2010, 1798, 422-432. [COBISS.SI-ID [4385050](#)]
 10. T. Mavromoustakos, S. Durdagi, C. Koukoulitsa, M. Simčič, M. G. Papadopoulos, M. Hodošček, S. Golič Grdadolnik. Strategies in the Rational Drug Design. *Curr. Med. Chem.* 2011, 18, v tisku.

4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

Ocenjujemo, da so raziskovalni cilji projekta v celoti realizirani. Raziskave smo raširili še z računalniškimi simulacijami molekularne dinamike kompleksov ligand-receptor, ki prvotno niso bile načrtovane. Začetne simulacije so pokazale zelo dobro ujemanje z NMR eksperimentalnimi podatki, zato smo predvidevali, da bomo z metodami molekularnega modeliranja lahko podkrepili nove vidike v načinu vezave MurD inhibitorjev, ki smo jih ugotovili z analizo NMR eksperimentalnih podatkov. Postavili smo metodologijo za določanje načina vezave novih inhibitorjev velike proteinske tarče, encima MurD, za široko območje vezavnih afinitet ligandov. Te raziskave so bile podprte tudi s strani Lek farmacevtske družbe. V sodelovanju z mednarodnimi partnerji smo razvili metodologije za določanje interakcij ligand-receptor in ligand-membrana v kompleksnih molekularnih sistemih.

Izvedli smo primerjalne študije najpogostejše uporabljenih NMR metod za določanje konstante disociacije in pokazali, da je za ligande z zmerno vezavno afiniteto najprimernejša metoda prenosa saturacije (STD).

Optimizirali smo eksperimentalne parametre STD metode za določanje relativne jakosti interakcij ligand-receptor in izključili vpliv specifičnih relaksacijskih lastnosti ligandov na izmerjene vrednosti STD parametrov.

Določili smo primerno kombinacijo NMR metode in načina izotopskega označevanja za določanje vezavnih mest novih MurD ligandov preko opazovanja signalov proteina.

Optimizirali smo postopke za izotopsko označevanje MurD ligaze in izolirali ustrezne količine selektivno ¹³C označenega encima na metilnih skupinah stranskih verig Leu, Val in Ile aminokislinskih ostankov.

S kombinacijo NMR metod in molekularnega modeliranja smo določili konformacijske in dinamične lastnosti serije novih inhibitorjev MurD ligaze (derivatov naftalen-*N*-sulfonil-D-glutaminske kisline) v vezavnem mestu encima in njihov vpliv na interakcije ligand-receptor.

Določili smo vezavno mesto novih rodaninskih derivatov in njihovo lego v vezavnem mestu. Pokazali smo, da se vežejo le v UDP vezavno mesto in določili njihov način vezave.

Ugotovili smo, da togi mimetiki D-glutaminske kisline interagirajo z D-Glu vezavnim mestom. Določili smo vpliv togih mimetikov na dinamične lastnosti kompleksov ligand-encim in na vezavne lastnosti novih ligandov.

S kombinacijo NMR in teoretičnih metod smo določili način vezave novih EAE antagonistov v tri-molekularnem kompleksu z receptorjema HLA-DR in TCR.

S kombinacijo eksperimentalnih in teoretičnih metod smo določili vezavne intrakcije novih AT₁ antagonistov s transmembranskim receptorjem v membranskem okolju.

Pokazali smo pomembno vlogo dinamičnih lastnosti kompleksa ligand-receptor na interakcije ligand-receptor in s tem povezano biološko aktivnost ligandov. To je pomemben vidik za načrtovanje novih biološko aktivnih učinkovin, ki ga ne moremo

raziskati z rentgensko difrakcijo kristalnih kompleksov.
--

5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁵

Bistvenih odstopanj od predvidenega programa raziskovalnega projekta ni bilo.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

Znanstveni rezultat			
1.	Naslov	SLO	Nov vpogled v načrtovanje protibakterijskih učinkovin osnovan na strukturno-dinamičnih študijah kompleksov novih ligandov z MurD ligazo.
		ANG	New insight into design of antibacterial drugs based on structure-dynamic studies of complexes of novel ligands with MurD ligase.
	Opis	SLO	S kombinacijo NMR študij in računalniških simulacij molekularne dinamike novih ligand-MurD kompleksov smo dobili vpogled v dinamične lastnosti kompleksov, ki lahko bistveno nadgradi racionalno načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin osnovano le na študijah rigidne kristalne strukture. Prepoznali smo konformacijsko fleksibilnost novih ligandov v vezavnem mestu in določili njen vpliv na posamezne ligand-receptor interakcije. Ugotovili smo, da je stopnja fleksibilnosti povezana s specifičnimi elementi molekularne strukture ligandov in z razlikami v njihovi inhibitorni aktivnosti.
		ANG	The NMR studies and molecular dynamics simulations of ligand-MurD complexes have been performed to obtain the insight into dynamic properties of novel complexes, which can significantly upgrade the drug design studies that are based solely on the static crystal structures. The results have revealed the differing degrees of ligand flexibility and their effect on particular ligand-enzyme contacts. The degree of conformational flexibility depends on the specificity of the ligand molecular structure and can be related to the differences in their inhibitory activities.
	Objavljeno v		SIMČIČ, M., HODOŠČEK, M., HUMLJAN, J., KRISTAN, K., URLEB, U., KOCJAN, D., GOLIC GRDADOLNIK, S. NMR and molecular dynamics study of the binding mode of naphthalene-N-sulfonyl-D-glutamic acid derivatives: novel MurD ligase inhibitors. J. Med. Chem., 2009, vol. 52, str. 2899-2908. JCR IF: 4.802
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
COBISS.SI-ID		4121626	
2.	Naslov	SLO	Določitev interakcije novega sintetičnega AT1 antagonista z modelnim membranskim sistemom in aktivnim mestom encima.
		ANG	A thorough investigation of the interaction of novel synthetic AT1 antagonist with the model membrane system and the receptor active site.
	Opis	SLO	Načrtovali in sintetizirali smo novo vrsto AT1 antagonistov z znatnim antihipertenzivnim učinkom, ki imajo drugačne strukturne lastnosti kot znani ne-peptidni AT1 antagonisti. S kombinacijo eksperimentalnih in teoretičnih metod smo določili interakcije učinkovina-membrana in učinkovina-aktivno mesto receptorja za novo vrsto AT1 antagonista. Pokazali smo, da aktivnost novih antagonistov lahko izboljšamo z upoštevanjem termodinamskih efektov na lipidne dvosloje in s prilagajanjem stereoelektronskim lastnostim aktivnega mesta receptorja.
		ANG	A new type of AT1 antagonists have been designed and synthesized, which have different structural features from the known non-peptide AT1 antagonists and have significant antihypertensive activity. With a combination of experimental and theoretical methods we have determined ligand-membrane and ligand-receptor interactions of new type of AT1 antagonist. We have shown that activity of new antagonists can be improved through the thermodynamic effects on the lipid bilayers and through the stereoelectronic active site requirements.
		FOTAKIS, Charalambos, GEGA, S., SIAPI, Eleni, POTAMITIS, Konstantinos, VIRAS, Kyriakos, MOUTEVELIS MINAKAKIS, Panayiota, KOKOTOS, George, DURDAGI, Serdar, GOLIC GRDADOLNIK, Simona, SARTORI, B., RAPPOLT,	

	Objavljeno v		Michael, MAVROMOUSTAKOS, Thomas. Interactions at the bilayer interface and receptor site induced by the novel synthetic pyrrolidinone analog MMK3. Biochim. Biophys. Acta, Biomembr., 2010, vol. 1798, str. 422-432. JCR IF (2009): 3.988
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		4385050
3.	Naslov	SLO	Študija konformacijskih lastnosti EAE agonistov in antagonistov z uporabo metod NMR spektroskopije in molekularnega modeliranja
		ANG	A combined NMR and molecular dynamic study of conformational properties of EAE agonists and antagonists
	Opis	SLO	Postavili smo robustno metodo za določanje možne bioaktivne konformacije linearnih peptidnih analogov mielinskega proteina, ki inducirajo EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) eksperimentalni sistem za študij skleroze multipleks ter njihove konformacijske in vezavne lastnosti primerjali z lastnostmi EAE antagonistov. Pokazali smo specifične strukturne lastnosti EAE agonistov in antagonistov, ki določajo razlike v njihovih interakcijah s T-celičnim receptorjem.
		ANG	A robust method is proposed for identifying the putative bioactive conformation of linear peptide analogues of myelin basic protein, which induce the EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) instructive model for the investigation of multiple sclerosis. Their conformational and binding properties were compared with the properties of EAE antagonist. Specific conformational properties of EAE agonist and antagonist were elucidated, which determine differences in their interactions with T-cell receptor.
	Objavljeno v		MANTZOURANI, E. D., BLOKAR, K., TSELIOS, T. V., MATSOUKAS, J., PLATTS, J. A., MAVROMOUSTAKOS, T., GOLIC GRDADOLNIK, S. A combined NMR and molecular dynamics simulation study to determine the conformational properties of agonists and antagonists against experimental autoimmune encephalomyelitis. Bioorg. Med. Chem., 2008, vol. 16, no. 5, str. 2171-2182. JCR IF: 3.075
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		3843610
4.	Naslov	SLO	Vloga lipidnih dvoslojev pri interakciji valsartana z AT1 receptorjem.
		ANG	Role of lipid bilayers at valsartan - AT1 receptor interaction.
	Opis	SLO	NMR konformacijskimi študijami valsartana v topilu in simulacijami molekularne dinamike valsartan - AT1 receptor kompleksa v prisotnosti lipidnih dvoslojev smo raziskali vezavne interakcije valsartana z AT1 receptorjem. Valsartan preko inhibicije AT1 receptorja učinkovito deluje proti visokemu krvnemu pritisku. Ugotovili smo, da membransko okolje poveča vezavne interakcije valsartana z AT1 receptorjem in stabilizira ligand v aktivnem mestu receptorja ter pokazali na pomembno vlogo membranskega okolja v mehanizmu delovanja AT1 antagonistov.
		ANG	Binding interactions of valsartan, a potent antihypertensive drug, with membrane embedded AT1 receptor have been determined by application of NMR spectroscopy of valsartan in solvent environment and theoretical simulations of molecular dynamics of valsartan-AT1 receptor complex in lipid bilayer environment. Enhancement of binding interactions and stabilization of drug at the active site upon membrane environment have been observed pointing to a crucial role of lipid bilayers in the mechanism of action of AT1 antagonist.
	Objavljeno v		POTAMITIS, K., ZERVOU, M., KATSIARAS, V., DURDAGI, S., PAPADOPOULOS, M. G., HAYES, J. M., GOLIC GRDADOLNIK, S., KYRIKOU, I., ARGYROPOULOS, D. S., VATOUGIA, G., MAVROMOUSTAKOS, T. Antihypertensive drug valsartan in solution and at the AT1 receptor : conformational analysis, dynamic NMR spectroscopy, in silico docking, and molecular dynamics simulations. J. Chem. Inf. Mod., 2009, vol. 49, str. 726-739. JCR IF: 3.882
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		4115994

5.	Naslov	SLO	Določitev vezavnega mesta novih rodaninskih inhibitorjev MurD encim.
		ANG	Determination of binding site of novel rhodanine MurD inhibitors.
	Opis	SLO	Z NMR metodami smo pokazali, da se novi rodaninski inhibitorji MurD vežejo le v vezavno mesto substrata UDP in ugotovili, da so locirani v uracilnem delu vezavnega mesta. Na podlagi študij tridimenzionalne strukture vezavnih mest UDP in ATP ter molekularne strukture rodaninskih derivatov je bila predvidena možnost vezave v obe vezavni mesti. S primerjalnimi študijami sprememb kemijskih premikov metilnih skupin encima MurD ob vezavi poznanih inhibitorjev, substrata in AMPPCP smo ovrgli možnost vezave novih inhibitorjev v vezavno mesto ATP.
		ANG	By application of NMR methods we have shown that novel rhodanine MurD inhibitors interact with binding site of UDP substrate and are located in the uracil-binding pocket. The possibility of binding to UDP and ATP binding sites have been proposed, which is based on the molecular structure of rhodanine derivatives and studies of tridimensional structure of UDP and ATP binding sites. Comparison studies of chemical shift perturbations of MurD methyl groups upon binding of known inhibitors, UDP substrate, and AMPPCP have excluded the binding of novel inhibitors to ATP binding site.
	Objavljeno v		TOMAŠIČ, Tihomir, ZIDAR, Nace, KOVAČ, Andreja, TURK, Samo, SIMČIČ, Mihael, BLANOT, Didier, MÜLLER-PREMRU, Manica, FILIPIČ, Metka, GOLIC GRDADOLNIK, Simona, ZEGA, Anamarija, ANDERLUH, Marko, GOBEC, Stanislav, KIKELJ, Danijel, PETERLIN-MAŠIČ, Lucija. 5-benzylidenethiazolidin-4-ones as multitarget inhibitors of bacterial Mur ligases. ChemMedChem., 2010, vol. 5, str. 286-295. JCR IF (2009): 3.232
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
COBISS.SI-ID		2743921	

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine⁶

Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat			
1.	Naslov	SLO	NMR-podprto načrtovanje zdravilnih učinkovin
		ANG	NMR-assisted drug discovery
	Opis	SLO	Predstavili smo zmogljivosti in omejitve NMR metod pri raziskavah interakcij ligand-receptor. Lastnosti in uporabnost NMR metod, ki temeljijo na opazovanju signalov liganda ali proteina, smo razložili s prikazom dveh naših NMR študij novih inhibitorjev atraktivnih proteinskih tarč za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Posebej smo poudarili prednost NMR spektroskopije pri študijah dinamičnih procesov v molekularnih kompleksih. Pokazali smo vpliv konformacijske dinamike na stabilnost ligand-receptor interakcij in na inhibitorno aktivnost novih ligandov.
		ANG	The capabilities and limitations of NMR methods for the investigation of ligand-receptor interactions were presented. Two of our case-studies of NMR-assisted discovery of novel inhibitors of attractive antibacterial targets were used to explain the application of ligand-based and protein-based NMR methods. Special attention was given to the advantage of NMR spectroscopy for the studies of dynamic processes in molecular complexes. The influence of conformational dynamics on the stability of ligand-receptor interactions and on the inhibitory activities of novel ligands was presented.
	Šifra		B.04 Vabljen predavanje
	Objavljeno v		GOLIČ GRDADOLNIK, S. NMR-assisted discovery of novel DNA gyrase and muramyl ligase inhibitors. V: Hungarian-Austrian-Czech-German-Greek-Italian-Polish-Slovak-Slovenian Joint meeting on medicinal chemistry [also] JMMC 2009: Budapest, Hungary, 24-27 June, 2009 : book of abstracts. Budapest: Hungarian Chemical Society, 2009, str. 56.
Tipologija		1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
COBISS.SI-ID		4174618	
2.	Naslov	SLO	Raziskave vezave novih MurD ligandov z uporabo NMR metod, ki temeljijo na opazovanju signalov liganda
			Investigation of binding of novel MurD ligands using the ligand-observed

		ANG	NMR methods.
	Opis	SLO	Predstavili smo raziskave interakcij novih inhibitorjev MurD ligaze z vezavnim mestom encima. Osredotočili smo se na NMR metode, ki ne zahtevajo izotopskega označevanja proteina. Te metode so osnovane na opazovanju signalov liganda. Za določanje konstante disociacije (KD) novih ligandov smo uporabili metode diferencialnega širjenja linij, longitudinalnega relaksacijskega časa in prenosa saturacije (STD). Z metodo nelinearne regresije smo iz NMR parametrov določili KD vrednosti. Naši rezultati so pokazali, da je za določanje KD najbolj natančna STD metoda.
		ANG	The investigation of interaction of novel MurD inhibitors with the enzyme was presented. We were focused on the NMR methods, which do not require isotope enrichment of the protein. These methods are based on the observation of ligand signals. We used differential line broadening, longitudinal relaxation time and saturation transfer difference (STD) experiments to determine the ligand dissociation constants (KD). A nonlinear regression analysis was applied to extract the KD values from the NMR parameters. Our results indicate that the most accurate KD values are obtained by the STD method.
	Šifra		B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci
	Objavljeno v		SIMČIČ, M., HUMLJAN, J., KRISTAN, K., KOCJAN, D., URLEB, U., GOLIC GRDADOLNIK, S. Investigation of binding of novel MurD ligands using the ligand observed NMR methods. V: JURGA, Stefan (ur.). AMPERE NMR School, 19-28 June 2008, Poznan, Poland. Abstracts. Poznan [Poland]: Adam Mickiewics University, 2008, str. 47.
	Tipologija		1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
	COBISS.SI-ID		3954202
3.	Naslov	SLO	NMR spektroskopija kompleksov MurD ligaze z novimi inhibitorji
		ANG	NMR spectroscopy of MurD complexes with novel inhibitors
	Opis	SLO	Postavili smo NMR metodologijo za prepoznavanje vezave in določanje vezavnih interakcij novih ligandov MurD ligaze z vezavno afiniteto v submilimolarnem območju, ki so jih sintetizirali v Lek farmacevtski družbi d.d..
		ANG	We implemented the NMR methodology for the identification of binding and for the determination of binding interactions of novel MurD ligands with moderate binding affinity, which were synthesized in Lek pharmaceuticals d.d..
	Šifra		F.17 Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso
	Objavljeno v		Nosilec industrijske naloge Simona Golič Grdadolnik. Naročnik Lek d.d., pogodba št. 213/2008. Dokumentacija o pogodbi je na voljo na Kemijskem inštitutu. Rezultati so tajni in so bili posredovani naročniku.
	Tipologija		2.13 Elaborat, predštudija, študija
	COBISS.SI-ID		0
4.	Naslov	SLO	NMR študije Lekovih derivatov zdravilnih učinkovin.
		ANG	NMR studies of drug derivatives from LEK pharmaceuticals d.d..
	Opis	SLO	Izvedli smo NMR študije konfiguracije in konformacije izbranih Lekovih derivatov zdravilnih učinkovin in dokazali predpostavljene razlike v njihovi molekularni strukturi. Uporaba visokih magnetnih polj in določitev prostorskih konektivnosti je bila odločilna za pojasnitev vrste transformacije molekularnega ogrodja derivatov.
		ANG	The NMR studies of configuration and conformation of selected drug derivatives from the LEK pharmaceuticals d.d. were performed to prove the differences in their molecular structure. The application of high magnetic fields and determination of molecular spatial connectivities were crucial for the elucidation of type of molecular framework transformation.
	Šifra		F.17 Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso
	Objavljeno v		GOLIČ GRDADOLNIK, S. NMR spectroscopic analysis of vancomycin and teicoplanin derivatives: final report (LEK, d.d., contract 20/2008). Ljubljana:

		Kemijski inštitut, 2009. 24 f.
	Tipologija	2.12 Končno poročilo o rezultatih raziskav
	COBISS.SI-ID	4309530
5.	Naslov	<i>SLO</i> Mentorstvo podiplomskim študentom
		<i>ANG</i> Tutoring of postgraduate students
	Opis	<i>SLO</i> Sem mentor dveh mladih raziskovalcev (M. Simčič in U. Zelenko), ki ju vpeljujem v raziskave konformacije, dinamike in interakcij v kompleksnih molekularnih sistemih z NMR metodami. M. Simčič raziskuje vezavne lastnosti novih inhibitorjev muramilnih ligaz. U. Zelenko sodeluje pri raziskavah vezave novih inhibitorjev membransko asociiranega receptora Cyp51. Bila sem raziskovalni mentor Š. Klofutar za magistrsko delo, ki je osnovano na NMR študijah strukturnih in dinamičnih lastnosti proteinov.
		<i>ANG</i> I am mentor of two young researchers (M. Simčič and U. Zelenko). I am guiding them in the studies of conformation, dynamics and interactions in complex molecular systems using the NMR methods. M. Simčič is involved in the studies of binding properties of novel muramyl ligase inhibitors. U. Zelenko is participating in the research of novel inhibitors of membrane associated Cyp51 receptor. I was mentor of Špela Klofutar for her master thesis, which is based on the NMR studies of structural and dynamic properties of proteins.
	Šifra	D.09 Mentorstvo doktorandom
	Objavljeno v	KLOFUTAR, Špela. Struktura in dinamika native oblike himere A37B (aAbbbb) med stefimona A in B v raztopini : magistrsko delo = Solution structure and dynamics of a chimeric proteins A37B (aAbbbb) between human stefins A and B : master thesis. Ljubljana: [Š. Klofutar], 2009. XII, 119 str.
	Tipologija	2.09 Magistrsko delo
	COBISS.SI-ID	23454247

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

Izvirni znanstveni članki v tisku:

I. Sosič, H. Barreteau, M. Simčič, R. Šink, J. Cesar, A. Zega, S. Golič Grdadolnik, C. Contreras-Martel, A. Dessen, A. Amoroso, B. Joris, D. Blanot, S. Gobec. Second-generation sulfonamide inhibitors of D-glutamic acid-addong enzyme: activity optimisation with conformationally rigid analogues of D-glutamic acid. Eur. J. Med. Chem. 2011, v tisku.

T. Mavromoustakos, S. Durdagi, C. Koukoulitsa, M. Simčič, M. G. Papadopoulos, M. Hodošček, S. Golič Grdadolnik. Strategies in the Rational Drug Design. Curr. Med. Chem. 2011, 18, v tisku.

Izvirni znanstveni članki v recenziji:

C. Potamitis, M. Matsoukas, T. Tselios, T. Mavromoustakos, S. Golic Grdadolnik. Conformational Analysis of the Peptide Analogues [Phe91]MBP83-99 and [Tyr91]MBP83-99 and study of their interactions with HLA-DR2 receptor using Molecular Dynamics. J. Comput. Aided Mol. Des., 2011, v recenziji.

Izvirni znanstveni članki poslani v recenzijo:

M. Simčič, I. Sosič, M. Hodošček, S. Gobec, S. Golič Grdadolnik. 2011. The effect of conformationally rigid D-Glu mimetics on the binding mode of second generation of MurD sulfonamide inhibitors: NMR and Molecular Dynamics Study. J. Med. Chem. 2011, poslano v recenzijo.

M. Simčič, K. Lotrič, K. Kristan, U. Urleb, D. Kocjan, and S. Golič Grdadolnik. Protein-inhibitor binding by NMR spectroscopy, molecular dynamics study and enzyme inhibition evaluation of a new rhodanine analogue on UDP-N-acetylmuramyl-l-alanine: D-glutamate (MurD) ligase. J. Biol. Chem. 2011, poslano v recenzijo.

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

9.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

Rezultati projekta prispevajo k razumevanju interakcij ligand-receptor, ki so nujno navzoče v bioloških procesih in imajo tudi pomembne aplikacije v biotehnologiji. Nizkoenergijska raven bioloških procesov izvira iz nekovalentnih interakcij med molekulami. Narava in energetika teh interakcij je slabo poznana. Natančno ovrednotenje interakcij med ligandi in receptorji prispeva k razvoju algoritmov za napovedovanje tridimenzionalnih struktur biomolekularnih sistemov, kot so kompleksi ligand-receptor in substrat-encim, ki bodo izboljšali obstoječo metodologijo za načrtovanje zdravilnih učinkovin. Načrtovanje novih učinkovin je pogosto neuspešno, ker obstoječi algoritmi uporabljajo model delovanja učinkovin "ključ - ključavnica", ki je za mnoge biomolekularne sisteme preveč poenostavljen. Ta model ob vezavi ligandov na proteinske tarče ne upošteva konformacijskih sprememb receptorja, ki ga lahko povzročajo ligand-receptor interakcije. Natančno poznavanje interakcij ligand-receptor je pomembno za razumevanje funkcije in aktivnosti vrste bioloških sistemov in lahko znatno prispeva k raziskavam na drugih področjih kot so biologija, medicina in farmacija.

ANG

Results of project contribute to understanding of ligand-receptor interactions, which are ubiquitously essential in biological processes and have also important applications in biotechnology. The low energy level of biological processes is a consequence of non-covalent interactions between molecules. The nature and energetics of those non-covalent interactions are still poorly understood. The accurate assessment of ligand-receptor interactions contributes to development of structure prediction algorithms for modelling bio-molecular systems like ligand-receptor and enzyme-substrate complexes, which will improve the existent drug-design methodologies. The current drug-design algorithms are largely unsuccessful due to the approximations imposed by the simple "lock and key" model of drug action, which are not considering the conformational changes imposed by the interactions of receptor and ligand molecules. The detailed knowledge of ligand-receptor interactions is important for understanding the function and activity of variety of biological systems and can significantly contribute to the research in other fields, as are biology, medicine and pharmacy.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Projekt sloni na sodelovanju raziskovalcev iz inštituta, univerze in industrije in je usklajen s prioritetami, ki so definirane v Nacionalnem raziskovalnem in razvojnem programu Republike Slovenije. Novi bolj učinkoviti pristopi za odkrivanje zdravilnih učinkovin lahko pospešijo in pocenijo postopke razvoja učinkovin za zdravljenje človeku nevarnih bolezni in so lahko koristni za slovensko farmacevtsko industrijo. Implementirano metodologijo uporabljamo za izvedbo konkretnih industrijskih projektov. Rezultate raziskav objavljamo v najuglednejših mednarodnih znanstvenih revijah, s čimer Slovenijo promoviramo v svetovnih znanstvenih krogih. Pri raziskavah sodelujejo mladi raziskovalci, ki pridobivajo znanje NMR spektroskopije visoke ločljivosti, molekularnega modeliranja in metodologij za racionalno načrtovanje novih učinkovin. Pridobivajo tudi splošno znanje, ki je potrebno za izpeljavo temeljnih raziskovalnih projektov kot tudi razvojnih projektov v farmacevtski industriji. Vključeni so v sodelovanje z raziskovalci iz univerze in industrije in si odpirajo različne možnosti bodoče zaposlitve.

ANG

Project is based on the collaboration of researchers from the institute, university and industry and is harmonized with the National Research and Development Project. New more efficient approaches for drug discovery can accelerate the development of new drugs against human diseases and can reduce the cost of development of new drugs. Therefore these approaches can be useful also for the Slovenian pharmaceutical industry. Implemented methodology is used for realization of actual industrial projects. Results are published in the world recognized top scientific journals and promote Slovenian science in the world. Young researchers (Ph. D students) are part of the research team and are able to gain general knowledge of high-resolution NMR spectroscopy, molecular modelling and the rational drug design methodologies. They gain important knowledge required for realization of basic research project as well as development project in pharmaceutical industry. They collaborate with researchers from university and industry and obtain various perspectives for their future employment.

10. Samo za aplikativne projekte!

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

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

F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	

	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

Komentar

--

11. Samo za aplikativne projekte!

Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visoko-šolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	

G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☐	☐	☐	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☐	☐	☐	☐	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☐	☐	☐	☐	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☐	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	☐	☐	☐	☐	
G.02.07.	Večji delež izvoza	☐	☐	☐	☐	
G.02.08.	Povečanje dobička	☐	☐	☐	☐	
G.02.09.	Nova delovna mesta	☐	☐	☐	☐	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	☐	☐	☐	☐	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	☐	☐	☐	☐	
G.02.12.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	☐	☐	☐	☐	
G.03.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	☐	☐	☐	☐	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	☐	☐	☐	☐	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	☐	☐	☐	☐	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	☐	☐	☐	☐	
G.04.06.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete	☐	☐	☐	☐	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj	☐	☐	☐	☐	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	☐	☐	☐	☐	

G.09.	Drugo:		☐	☐	☐	☐	
--------------	---------------	--	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	--

Komentar

--

12. Pomen raziskovanja za sofinancerje, navedene v 2. točki [12](#)

1.	Sofinancer		
	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			
2.	Sofinancer		
	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			
3.	Sofinancer		
	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			

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, za objavo 6., 7. in 8. točke na spletni strani <http://sicris.izum.si/> 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:

Simona Golič Grdadolnik	in	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseba RO

Kraj in datum:

Ljubljana

21.4.2011

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/149

¹ Zaradi spremembe klasifikacije družbeno ekonomskih ciljev je potrebno v poročilu opredeliti družbeno ekonomski cilj po novi klasifikaciji. [Nazaj](#)

² Samo za aplikativne projekte. [Nazaj](#)

³ Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja ter rezultate in učinke raziskovalnega projekta. Največ 18.000 znakov vključno s presledki (približno tri strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta (obrazložitev). V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁶ Navedite največ pet najpomembnejših znanstvenih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov v slovenskem in angleškem jeziku (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki) v slovenskem in angleškem jeziku, navedite, kje je objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote.

Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>.

PRIMER (v slovenskem jeziku):

Naslov: Regulacija delovanja beta-2 integrinskih receptorjev s katepsinom X;

Opis: Cisteinske proteaze imajo pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju raka. Zadnje študije kažejo njihovo povezanost s procesi celičnega signaliziranja in imunskega odziva. V tem znanstvenem članku smo prvi dokazali... (največ 600 znakov vključno s presledki)

Objavljeno v: OBERMAJER, N., PREMŽL, A., ZAVAŠNIK-BERGANT, T., TURK, B., KOS, J.. Carboxypeptidase cathepsin X mediates $\beta 2$ - integrin dependent adhesion of differentiated U-937 cells. Exp. Cell Res., 2006, 312, 2515-2527, JCR IF (2005): 4.148

Tipologija: 1.01 - Izvirni znanstveni članek

COBISS.SI-ID: 1920113 [Nazaj](#)

⁷ Navedite največ pet najpomembnejših družbeno-ekonomsko relevantnih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki), izberite ustrezen rezultat, ki je v Šifrantu raziskovalnih rezultatov in učinkov (Glej: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/sif-razisk-rezult.asp>), navedite, kje je rezultat objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote.

Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>. [Nazaj](#)

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta 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. [Nazaj](#)

⁹ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

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

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

¹² Rubrike izpolnite/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](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2011-1 v1.01

E0-52-99-B3-D1-3E-EB-93-42-F5-AF-D9-F6-37-08-CE-AF-BD-81-CA