

Oznaka poročila: ARRS-RPROG-ZP-2014/62



## ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROGRAMA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROGRAMU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem programu

<b>Šifra programa</b>	P1-0048	
<b>Naslov programa</b>	Strukturna biologija	
<b>Vodja programa</b>	4988	Dušan Turk
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	39950	
<b>Cenovni razred</b>	C	
<b>Trajanje programa</b>	01.2009 - 12.2013	
<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
<b>Raziskovalno področje po šifrantu ARRS</b>	1	NARAVOSLOVJE
	1.05	Biokemija in molekularna biologija
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	13.01	Naravoslovne vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)
<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

Dostopnost 3-dimenzionalne strukture makromolekule in njenih kompleksov pri atomskih resolucijah je danes neizogiben, standarden del raziskav, ki proučujejo mehanizme bioloških procesov. Je bistvenega pomena za načrtovanje nadaljnjih raziskav in njihovemu koriščenju pri odkrivanju novih zdravil in zaščitnih sredstev za pridelke. Raziskave programa Strukturna biologija so pretežno vključevale študije mehanizmov kontrole aktivnosti proteaz s proteinskimi inhibitorji. Predvsem smo raziskovali lastnosti dejavnikov procesa adaptivnega imunskega odziva vključenih v porcese endozomskega procesiranja antigenov. Objavili smo strukture proteinskih inhibitorjev kot so stefini in  $\beta$ -trefoil inhibitorji v kompleksih s proteazo ali pa same (Renko et al, 2010; Sabotic et al., 2012; Pohleven et al., 2012; Renko et al.; 2012). Dodatne objave so v teku.

Trenutni izziv študije proteolize je pridobiti vpogled v mehanizme in specifičnost interakcij med proteazami in njihovimi substrati. V sodelovanju s skupino K. Brix smo proučevali specifičnost proteolitčne razgradnje s katepsini pri *in vitro* pogojih. V delu objavljenim v sodelavi s skupino B. Turka pa smo pokazali, da prolinske mutacije v regiji propeptida ne preprečijo cepitve propeptida in s tem aktivacije katepsina B. Vpogled na področje smo objavili skupaj z B. In V. Turkom in sodelavci v dveh preglednih člankih v EMBO J. In BBA. V sodelavi z E. Žerovnik iz skupine B. Turka in J. Walthom in R. Staniforth iz Sheffielda smo objavili več del, ki podajajo vpogled v mehanizem formiranja amiloidnih

fibril.

Kot je bilo že omenjeno v predlogu, smo med potekom študija razširili seznam proučevanih proteinov na proteine iz površine bakterij. Te raziskave so še v teku.

Računalniške metode makromolekularne kristalografije smo razvijali z namenom, da podpremo določevanje struktur in njihovo analizo. Članek Praznikar in sod. (2010) opisuje izboljšano metodo računanja map elektronske gostote, medtem ko drugi daje vpogled v dobri dve desetletji lastnega razvoja računalniških metod makromolekularne kristalografije (Turk, 2013).

ANG

The availability of 3-dimensional structure of a macromolecule and its complexes at atomic level is nowadays an essential, standard part of research tackling the mechanisms of biological processes and is of the key relevance for planning further research steps and their technological exploitation in drug discovery and protection of environment and crops. The Structural biology program research predominately involved studies of the mechanisms of control of proteolytic activity by protein inhibitors. In particular, players of adaptive immunity involved in endosomal processing of antigens were studied. Several crystal structures of protein inhibitors such as stefins and  $\beta$ -trefoil inhibitors were determined either alone or in complexes with endosomal protease (Renko et al, 2010; Sabotic et al., 2012; Pohleven et al., 2012; Renko et al.; 2012). Additional works are pending.

The current challenge in the studies of proteolysis is to gain insight into the mechanisms and specificity of interactions between proteases and their protein substrates. In collaborative work with K. Brix we addressed the specificity of proteolytic degradation by cathepsins in *in vitro* environments. In additional publication in collaboration with B. Turk, we showed that mutations in the propeptide region do not abolish proteolytic processing and activation of the enzyme. The area in general was addressed in two review papers written together with B. and V. Turk published in EMBO J. and BBA. Together with the same group with E. Žerovnik and collaborators J. Waltho and R. Staniforth from Sheffield we published several papers providing insight into the mechanism of amyloid fibril formation.

As specified in the proposal, the need for understanding these molecular mechanisms was however expanded the list of investigated molecules and processes into related areas of bacterial surface proteins. This work is still in progress.

The purpose of development of computational tools was to support structure determination and analysis. The purpose of the first paper described a new improved way of calculating electron density maps (Praznikar et al., 2010), whereas the second provides an overview into over two decades of the author contribution to development of computational methods for macromolecular crystallography (Turk, 2013).

### 3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem programu<sup>2</sup>

SLO

Program Strukturna biologija obravnava strukturo proteinov ter mehanizme interakcij z ligandi z namenom pojasnjevanja in odkrivanja njihove vloge v različnih bioloških procesih. V podporo reševanju struktur in njihovi analizi smo razvijali tudi računalniška orodja.

Dela dr. Dušana Turka (vodje programa) so bila citirana cca. 6000-krat in imajo H-indeks 40 (WoS).

Programska skupina je v tem obdobju dela na programu objavila 31 publikacij ter vrsto posterjev na domačih in mednarodnih konferencah. Vodja programa je bil pogosto vabljeni predavatelj na mednarodnih konferencah in univerzah v tujini. Glavnino raziskav zajemajo:

1. Cisteinski kathepsini in njihovi inhibitorji ter določanje specifičnosti in mehanizmov interakcij.

Kristalni strukturi klitocipina v kompleksu s kathepsinom V in makrocipina sta bili določeni v sodelovanju s skupino J. Kosa. Omogočili sta razlago mehanizma vezave teh proteinov v aktivno mesto cisteinskih proteaz in nakazali na mehanizem interakcije Kunitzovih inhibitorjev tipa II z  $\beta$  triperesnim zvitjem z drugimi družinami proteaz, kot so tripsinu podobne serinske proteaze in legumain (Renko in sod., J. Biol. Chem. 2010). Temu delu je sledila določitev kristalne strukture kospina, inhibitorja serinskih proteaz (Sabotič in sod., 2012) in kompleksa lektina z enakim zvitjem iz iste gobe v kompleksu z galaktozo (Pohleven in sod., 2012). Biokemijska raznovrstnost teh proteinov temelji na uporabi različnih zank posamezno ali v paru, ki izhajajo iz  $\beta$ -triperesnega zvitja (pregled v Renko in sod., 2012).

Kristalna struktura stefina B v kompleksu s katepsinom B (Renko in sod., FEBS J. 2010) je prva kristalna struktura katepsina B s človeškim cistatinskim inhibitorjem in nadalje pojasnjuje razlike pri interakcijah med temi proteini.

Trenutni izziv na tem področju je dobiti vpogled v specifičnosti in mehanizem interakcij med proteazami in njihovimi proteinskimi substrati. V sodelovanju s skupino prof. K. Brix iz Univerze v Bremnu (Jordans in sod., 2009) smo na primeru procesiranja tiroglobulina s cisteinskimi katepsini v fiziološkem okolju pokazali na variabilnosti posameznih katepsinov. Poskus blokade avtokatalitičnega procesiranja prokatepsina B (Pungerčar in sod., 2009) je razkril, da je uvedba posameznih prolinskih točkovnih mutacij zamaknila mesto procesiranja, ni pa preprečila aktivacije encima. Pregledni članek (B. Turk, D. Turk in V. Turk, 2012) je podal vpogled v proteolitične cepitve kot nepovratne signalne dogodke, pregledni članek (V. Turk... D. Turk, 2012) pa opisuje stanje na področju raziskav cisteinskih katepsinov ter inhibitorjev, njihovih interakcij ter vloge v normalnih in patoloških procesih.

Kristalna struktura kompleksa fragmenta invariantne verige (Ii) p41 s katepsinom L (G. Gunčar... D. Turk, EMBO J. 1999) nas je usmerila v študije MHC molekul II. razreda. V sodelavi s skupino J. Neefjesa (NCI, Amsterdam) smo okarakterizirali stehiometrijo vezave topnih molekul MHC razreda II s p31/p41 oblikama Ii. Pokazali smo, da trimeri Ii lahko vežejo tudi eno, dve ali tudi tri dimere MHC molekul razreda II. Ti rezultati so ovrgli dosedaj uveljavljeno dogmo o nonamerni stehiometriji kompleksov (trije MHC dimeri razreda II vezani na trimerni kompleks Ii). Izraženi kompleksi so se uspešno transportirali preko endoplazemskega retikuluma in Golgijevega aparata v zunaj celični prostor (Majera in sod., 2012) in so s tem primerni za nadaljnje študije.

## 2. Študije tvorbe amiloidnih fibril

Posamezni koraki mehanizma nastanka amiloidnih fibril so opisani v publikacijah, ki so nastale v sodelovanju z E. Žerovnik (IJS) in J. Waltho (University of Sheffield) (Smajlović in sod.; 2009; Škrget in sod., 2009; Jelinska in sod., 2011; Žerovnik in sod., 2011; Žerovnik in sod., 2010). Članek o strukturi stefina B pa je bil ob koncu leta sprejet v tisk in je ob pisanju poročila že objavljen v ugledni reviji Acta crystallogr. D (IF 14.103, prva v področju).

## 3. Razvoj metod računalniške kristalografije

Članek "Averaged kicked maps" (Pražnikar in sod., 2009), objavljen v sodelovanju s skupino P. Adamsa (UC Berkley), predstavlja nov način obdelave naključnih napak v mapah elektronske gostote. Nadalje je bil pravkar objavljen članek v izjemno ugledno reviji Acta crystallogr. D (IF 14.1, prva v področju), ki opisuje naš 20 letni razvoj programske opreme MAIN (D. Turk, 2013).

## 4. Delo v teku

V preteklem obdobju smo zaradi izdatnih investicij v opremo v okviru projekta Centra odličnosti CIPKEBIP, ponovno ujeli korak s svetom. Zato smo v raziskovalni program vključili sezname skupin proteinov, ki so vpleteni oziroma povezani z endosomsko razgradnjo proteinskih substratov in predstavitvijo antigenov. Rezultatih dela teh raziskav so v fazi zaključnih študij in pisanja člankov, kar kaže na to, da je od začetka raziskave do končne objave na tem področju potrebno od 3 do 5 let. Prvi članki z razširjenega seznama bodo posvečeni strukturi in funkciji lizosomskih hidrolaz, avtolizinov bakterije Staphylococcus aureus in površinskih proteinov bakterije Clostridium difficile.

Iz seznama 30ih človeških proteinov smo določili strukturi dveh človeških glikozidaz:  $\alpha$ -fukozidaze (FUCA1) in DiNacetylhitobiazze (CTBS). Katalitične domene obeh encimov zavzamejo zvitje  $\alpha/\beta$  sodčkov, imenovanih tudi TIM sodčki. Članka sta v pripravi.

S seznama 50ih proteinov bakterije *S. aureus* jih je 5 uspešno kristaliziralo. Iz njih smo posneli nativne difrakcijske podatke. Kot prvo smo določili strukturo autolizina E in komplekse s fragmenti substrata. Jedro strukture je razkrilo podobnost s strukturo lizocima, vendar je na strukturi temelječa poravnava aminokislinskih zaporedij pokazala, da imata le en identičen katalitični ostanek, E138. Članek je v zaključni fazi priprav.

Izmed 20-ih proteinov bakterije *C. difficile* smo večino uspešno izrazili in uspeli pridobiti kristale 6-ih proteinov. V teku je določevanje kristalne strukture 2 proteinov. Pričakujemo, da bosta strukturi omogočili vpogled v strukturo osnovnih gradnikov in arhitekturo površinske plasti (S-layer) številnih bakterijskih vrst.

V teku so študije substratne specifičnosti katepsinov s komplementarnimi pristopi proteomike, strukturne biologije, bioinformatike in organske sinteze. Delo poteka v lokalni in mednarodni sodelavi s skupinami B. Turka (IJS), K. Gaevert (Uni Gent), M. Drag (Krakov).

#### 4. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem programu in zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>2</sup>

SLO

Raziskovalni program zajema študije proteinov, ki sodelujejo pri endosomski razgradnji in predstavitvi antigenov. Dobro izhodišče predstavljajo dolgoletne raziskave lizosomalnih katepsinov.

Odkritje invariantne verige Ii p41 MHC molekul II. razreda kot inhibitorja cisteinskih katepsinov (Bevec et al., J. Exper. Med. 1996) ter določitev kristalne strukture tega inhibitorja v kompleksu z

katepsinom L (Gunčar et al., EMBO J. 1999) je bilo pomembno dejstvo na usmeritev teh predloženih raziskav na celoten endosomski sistem.

MHC molekule II. razreda in kompleksi z invariantno verigo (Ii) so bili izraženi in karakterizirani (Majera in sod, 2012). Izkazalo se je, da so kompleksi izraženi v HEK293 in HEK293S celičnih linijah heterogeni v stehiometriji tvorjenih kompleksov.

Študij specifičnosti cisteinskih katepsinov zahteva nove pristope in so zato v teku študije specifičnosti s proteomskimi pristopi in testiranja po modularnih knjižnicah. Študije proteinskih inhibitorjev in njihovih kompleksov so bile objavljene v nekaj publikacijah.

Iz seznama novih (glede na prejšnje obdobje) endosomalnih encimov smo bili uspešni z lizozomskima glikozidazama FUCA1 in CTBS, medtem ko se ostali proteini ali niso izrazili v zadostnih količinah ali pa niso tvorili kristalov, ki sipajo do zadovoljive resolucije.

Delo na razvoju računalniških metod je uspešno in je objavljeno v dveh člankih. Zadnji članek zajema programsko opremo MAIN, ki je bila objavljena v reviji z impakt faktorjem 14, kar je najvišji faktor za metode na tem področju. J. Pražnikar se je ponovno pridružil skupini z delno zaposlitvijo in nadaljuje z delom na razvoju metod strukturnega "refinementa".

Če povzamemo v celoti, vidimo, da je bila več kot realizirana začetna hipoteza, ki pa je hkrati odprla

nove možnosti. Na začetku izvajanja tega programa je delo teklo več kot uspešno, do zaostajanja pa

je prišlo v letu 2010 zaradi dokončne okvare 14 let starega difraktometra. Naj omenim, da so ocenjevalci tega programa leta 2008 izpostavili kot pomembno hibo in grožnjo za uspešno izvedbo

programa, pomanjkanje opreme in njeno starost. Nova oprema vključno z novim difraktometrom pa

nam je v tem obdobju omogočila ujeti korak z znanostjo v razvitem svetu ob implementaciji visoko

prepustnih tehnologij in z uvedbo znanj, ki smo jih pridobili pri v svetu vodečih skupinah. Zaradi tega

smo, sicer z manjšo zakasnitvijo, lahko razširili seznam tarčnih proteinov. Objave rezultatov, na

osnovi za nas novih pristopov, pa so še v teku.

Tovrstne raziskave zahtevajo sodelovanje različnih interdisciplinarni skupin. Pri uspešnosti programa je bila pomembna finančna podpora za materialne stroške, ki smo jih pridobili v okviru

infrastrukturnega Centra za proizvodnjo in strukturo proteinov na IJS (30k EUR letno) ter oprema

nabavljena preko CO CIPKEBIP.

Lahko ugotovimo, da so bili izpolnjeni zastavljeni cilji. Kjer pa je prišlo do sprememb, so to narekovale raziskave v svetu.

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

Programsko skupino je zapustil Gregor Gunčar, ki je sprejel mesto predavatelja na FKKT. Nadomestil ga je Miha Renko.

Mladi raziskovalec Leon Bedrač je na mojo zahtevo sporazumno zamenjal raziskovalno skupino.

Pridružila se je Aleksandra Usenik, ki je v začetku nadomeščala sodelavko na porodniškem dopustu, Katarino Črnigoj Kristan. Katarina Črnigoj Kristan si je po zaključku porodniške našla novo delovno mesto v gospodarstvu.

V skupino je prišla nova mlada raziskovalka Sara Pintar.

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

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	23263527	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Raznolike zanke pri mikocipinih inhibirajo tri različne družine proteaz
		ANG	Versatile loops in mycocypins inhibit three protease families
	Opis	SLO	Mikocipini so inhibitorji cisteinskih proteaz, izolirani iz gob <i>Clitocybe nebularis</i> in <i>Macrolepiota procera</i> . Kristalne strukture klitocipina, makrocipin in klitocipina v kompleksu s katepsinom V so potrdile, da je inhibicija posledica doslej še neodkrita mehanizma inhibicije. Vezava inhibitorja je povezana s spremembo konformacije peptidne vezi, ki se dogodi pred ali sočasno z vezavo inhibitorja. Mikrocipini so s svojo sposobnostjo, da inhibirajo tri različne družine proteaz, dobro izhodišče, katerega bi se dalo uporabiti za pripravo transgenih rastlin.
		ANG	Mycocypins are cysteine protease inhibitors isolated from the mushrooms <i>Clitocybe nebularis</i> and <i>Macrolepiota procera</i> . The crystal structures of the complex of clitocypin with the papainlike cysteine protease cathepsin V, macrocypin and clitocypin alone have revealed yet another motif of binding to papainlike cysteine proteases. The binding loops present a versatile surface with the potential to bind to additional classes of proteases. When appropriately engineered, they could provide the basis for possible exploitation in crop protection.
	Objavljeno v	American Society of Biological Chemists.; The Journal of biological chemistry; 2010; vol. 285, no. 1; str. 308-316; Impact Factor: 5.328; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.787; A': 1; WoS: CQ; Avtorji / Authors: Renko Miha, Sabotič Jerica, Mihelič Marko, Brzin Jože, Kos Janko, Turk Dušan	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
2.	COBISS ID	25347623	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Cisteinski katepsini: od strukture, funkcije in regulacije do novih mej
		ANG	Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers
		50 let je minilo od odkritja lizozoma. V obdobju, ki je sledilo, je bila hidrolitska mašinerija precej podrobno identificirana in karakterizirana. Med hidrolitskimi encimi so tudi cisteinski katepsini, člani družine papainu podobnih proteaz. Ti katepsini imajo edinstvene lastnosti reaktivnega mesta, po tkivih pa so neenakomerno izraženi. Njihova aktivnost v živih	

Opis	SLO	<p>organizmih je v občutljivem ravnovesju izražanja, usmerjanja, aktivacije proencimske oblike, inhibicije s proteinskimi inhibitorji in razgradnje. Specifičnost njihovih aktivnih mest, nabor malih sintetičnih inhibitorjev in kristalnih struktur ponuja nova orodja za raziskave in razvoj. Njihove edinstvena reaktivna mesta omogočajo omejitve usmerjanja substanc zgolj z uporabo reaktivnih skupin. Uporaba epoksisukcinilnih inhibitorjev še prevladuje, vendar se zdi uporaba nitrilnih skupin trenutno najbolj ustrezna. Pogled na cisteinske katepsine kot lizosomalne proteaze se menja, saj so na voljo jasni podatki o njihovi lokalizaciji tudi v drugih celičnih predelih. Poleg tega, da so vključeni v presnovo proteinov, predstavljajo pomemben del endosomalne antigenske prezentacije. Poleg poznavanja neendosomalnih vlog katepsinov narašča tudi poznavanje njihovih vlog pri boleznih, kot sta na primer rak in revmatoidni artritis. Prav tako so katepsini pomembni regulatorji in signalne molekule pri mnogih fizioloških procesih. Trenutni izziv je identifikacija njihovih naravnih substratov z namenom da bi pridobili vpogled v poznavanje razgradnje substratov in njihovega mehanizma. V tem preglednem članku smo izpostavili napredek znanja na področju katepsinov v zadnjih desetih letih. Članek je posvečen Nobelovcu Christianu de Duveju, prav tako tudi celotna številka BBA proteins and proteomics vol. 1824/1, 2012.</p>	
	ANG	<p>It is more than 50 years since the lysosome was discovered. Since then its hydrolytic machinery, including proteases and other hydrolases, has been fairly well identified and characterized. Among these are the cysteine cathepsins, members of the family of papainlike cysteine proteases. They have unique reactive site properties and an uneven tissue specific expression pattern. In living organisms their activity is a delicate balance of expression, targeting, zymogen activation, inhibition by protein inhibitors and degradation. The specificity of their substrate binding sites, smallmolecule inhibitor repertoire and crystal structures are providing new tools for research and development. Their unique reactive site properties have made it possible to confine the targets simply by the use of appropriate reactive groups. The epoxy succinyls still dominate the field, but now nitriles seem to be the most appropriate "warhead". The view of cysteine cathepsins as lysosomal proteases is changing as there is now clear evidence of their localization in other cellular compartments. Besides being involved in protein turnover, they build an important part of the endosomal antigen presentation machinery. Together with the growing number of nonendosomal roles of cysteine cathepsins is growing also the knowledge of their involvement in diseases, such as cancer and rheumatoid arthritis, among others. Finally, cysteine cathepsins are important regulators and signaling molecules of an unimaginable number of biological processes. The current challenge is to identify their endogenous substrates, in order to gain an insight into the mechanisms of substrate degradation and processing. In this review, some of the remarkable advances that have taken place in the past decade are presented. The article (as well as the whole issue BBA proteins and proteomics vol. 1824/1, 2012) was dedicated to Nobel laureate Christian de Duve.</p>	
	Objavljeno v	Elsevier; Biochimica et biophysica acta; 2012; Vol. 1824, no. 1; str. 68-88; Impact Factor: 3.733; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.263; A': 1; WoS: CQ, DA; Avtorji / Authors: Turk Vito, Stoka Veronika, Vasiljeva Olga, Renko Miha, Sun Tao, Turk Boris, Turk Dušan	
Tipologija	1.02 Pregledni znanstveni članek		
3.	COBISS ID	26303015	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	βtrefoil inhibitorji od Kunitza naprej	
	ANG	[beta]-trefoil inhibitors from the work of Kunitz onward	

Opis	SLO	<p>Proteinski inhibitorji so orodje narave za kontrolo aktivnosti proteolitskih encimov. Pojavljajo se v različnih oblikah in velikostih. <math>\beta</math>-trefoil (beta triperesni) proteazni inhibitorji, ki jih je kot prvi odkril Kunitz, so rastlinskega izvora. Kasneje pa so bili odkriti še v gljivah. Leti inhibirajo serinske proteaze iz družin S1 in S8, cisteinske proteaze iz družin C1 in C13 kot tudi druge tipe hidrolaz. Njihova vsestranskost je rezultat plastičnosti zank, ki izhajajo iz jedra njihovega zvitja osnovanega na <math>\beta</math>-trefoil motivu. Zaradi te osnove lahko ti inhibitorji predstavijo kar nekaj različnih mehanizmov inhibicije, ki temelji na uporabi različnih zank in njihove kombinacije. Naravna diverziteteta kot tudi začetni uspehi pri de novo proteinskemu inženiringu izpostavljajo betatrefoil proteine kot potencialno izhodišče za generiranje močnih, specifičnih inhibitorjev, ki lahko inhibirajo več različnih tarč hkrati. Tako bi hkrati inhibirali več proteaz in reagirali z ogljikovimi hidrati in molekulami DNA. Sedanja strukturna znanja odpirajo možnosti za uporabo v medicini, biotehnologiji in kmetijstvu. Članek je objavljen v posebni številki revije posvečeni 75. letnici rojstva mojega mentorja Nobelovca Roberta Huberja.</p>	
	ANG	<p>Protein inhibitors are tools of nature to control the activity of proteolytic enzymes. They come in different shapes and sizes. The <math>\beta</math>trefoil protease inhibitors originate from plants and were first discovered by Kunitz, and later complemented with representatives from higher fungi. They inhibit serine (families S1 and S8) and cysteine proteases (families C1 and C13) as well as other hydrolases. Their versatility is the result of the plasticity of the loops coming out of the stable <math>\beta</math>trefoil scaffold. For this reason, they display several different mechanisms of inhibition involving different positions of the loops and their combinations. Natural diversity, as well as the initial successes in de novo protein engineering, makes the <math>\beta</math> trefoil proteins as a promising starting point for the generation of strong, specific, multitarget inhibitors capable of inhibiting multiple types of hydrolytic enzymes and simultaneously interacting with different protein, carbohydrate, or DNA molecules. This pool of knowledge opens up new possibilities for the exploration of their naturally occurring as well as modified properties for applications in many fields of medicine, biotechnology, and agriculture. This paper was published in a special issue dedicated to 75th anniversary of my mentor Nobel laureate Robert Huber.</p>	
	Objavljeno v	Walter de Gruyter; Biological chemistry; 2012; Vol. 393, no. 10; str. 1043-1054; Impact Factor: 2.683; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.761; WoS: CQ; Avtorji / Authors: Renko Miha, Sabotič Jerica, Turk Dušan	
	Tipologija	1.02 Pregledni znanstveni članek	
4.	COBISS ID	22793511	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Iz povprečene brcnjene mape: manj šuma, več signala... in verjetno manj pristranskosti	
	ANG	Averaged kick maps: less noise, more signal... and probably less bias	
Opis	SLO	<p>Iz povprečene brcnjene (IB) mape se izračunajo iz molekularnih modelov, ki so pri vsaki mapi različno naključno premaknjeni v prostoru. Končne mape so nato seštete in normalizirane. Kot take so numerični analog map maksimalne verjetnosti. IB mape smo primerjali z uveljavljenimi računi map. Metoda je bila izvedena na težavnem primeru iz validacije struktur, kjer smo s pomočjo IB map razjasnili problematično regijo brez potrebe po prilagajanju atomarnega modela. Pokazali smo, da so mape lahko uporabne v vseh fazah določevanja struktur.</p>	

		ANG	Use of reliable density maps is crucial for rapid and successful crystal structure determination. Here, the averaged kick (AK) map approach is investigated, its application is generalized and it is compared with other map calculation methods. The conclusion is that AK maps can be useful throughout the entire progress of crystal structure determination, offering the possibility of improved map interpretation.
	Objavljeno v		Munksgaard; Acta crystallographica; 2009; Issue 9, Vol. 65; str. 921-931; Impact Factor: 2.257; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.755; A': 1; WoS: CO, CQ, DA, FI; Avtorji / Authors: Pražnikar Jure, Afonine Pavel, Gunčar Gregor, Adams Paul D., Turk Dušan
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
5.	COBISS ID	26802727	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Programska oprema MAIN za povprečenje elektronske gostote, grajenje modelov, strukturni refinement in validacija
		ANG	MAIN software for density averaging, model building, structure refinement and validation
	Opis	SLO	MAIN je interaktivna programska oprema za izvajanje kompleksnih nalog makromolekularne kristalografije. Z MAINom se lahko izvajajo postopki modifikacije elektronske gostote, manualno in polavtomatsko in avtomatsko grajenje in prenova molekularnega modela, računalniško fitanje molekularnih modelov v realnem in recipročnem prostoru, izračuni map elektronske gostote, in različne vrste validacije molekularne strukture. Trenutna dostopnost različnih analitskih orodij in vizualizacija molekul in map elektronske gostote omogočajo uporabniku učinkovito napredovati do zaključene strukture. Izredna globinska percepcija je dosežena z jasnostjo in kontrastom 3dimenzionalnih objektov ter njihove gladke rotacije. MAIN omogoča sočasno delo na več molekularnih modelih v različnih kristalnih oblikah. Moč MAIN leži v zmožnosti povprečenja map elektronske gostote in molekularnih modelov ob pristotnosti nekristalografske simetrije. Z MAINom se da optimirati parametre nekristalografske simetrije in mask in fitati strukturo na eksperimentalne podatke v eni ali več kristalnih oblikah.
		ANG	MAIN is software designed to interactively perform the complex tasks of macromolecular crystal structure determination and validation. With MAIN, it is possible to perform density modifications, manual and semi automated or automated model building and rebuilding, real and reciprocal space structure optimization and refinement, map calculations, and various types of molecular structure validation. The prompt availability of various analytical tools and immediate visualization of molecular and map objects allow a user to efficiently progress towards the completed, refined structure. The extraordinary depth perception of molecular objects in 3D that is provided by MAIN is achieved by the clarity and contrast of colors and smooth rotation of the displayed objects. MAIN allows simultaneous work on several molecular models and various crystal forms. The strength of MAIN lies in its manipulation of averaged density maps and molecular models when non-crystallographic symmetry (NCS) is present. With MAIN, it is possible to optimize NCS parameters and envelopes and to refine the structure in single or multiple crystal forms.
	Objavljeno v		Munksgaard; Acta crystallographica; 2013; Vol. 69, part 8; str. 1342-1357; Impact Factor: 14.103; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.179; A'': 1; A': 1; WoS: CO, CQ, DA, FI; Avtorji / Authors: Turk Dušan
	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> Center odličnosti CIPKEBIP
		<i>ANG</i> Center of excellence CIPKEBIP
	Opis	<i>SLO</i> CIPKeBiP povezuje znanje, izkušnje in tehnologije vrhunskih slovenskih raziskovalnih skupin, ki se ukvarjajo z raziskovanjem proteinov ter njihovih lastnosti in funkcij s poudarkom na specifične biološke probleme visoke znanstvene in biomedicinske relevance. Center koordinira Odsek za biokemijo in molekularno ter strukturno biologijo na IJS. V CO sodeluje 5 akademskih in 5 industrijskih skupin in tako pomembno povezuje industrijsko in akademsko sfero.
		<i>ANG</i> The Centre of Excellence CIPKeBiP will connect 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 is coordinated by the Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology at JSI. Five academic and five industrial groups are participating in the Centre, thereby providing an important link between academia and industry.
	Šifra	D.01 Vodenje/koordiniranje (mednarodnih in domačih) projektov
	Objavljeno v	<a href="http://www.cipkebip.org/">http://www.cipkebip.org/</a> Medijih javnega obveščanja in na WWW strani ministrstva.
Tipologija	2.14 Projektna dokumentacija (idejni projekt, izvedbeni projekt)	
2.	COBISS ID	1736572 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Proteini - nosilci življenja
		<i>ANG</i> Proteins carriers of life
	Opis	<i>SLO</i> Izvajanje raziskav v postgenomskem obdobju, predstavlja nov mejnik za vede o življenju. Naraščajoče število dostopnih genomov iz vrst različnih organizmov na novo oblikuje koncepte v raziskavah. Dostopnost celotnih seznamov genov je predočila, da za razumevanje bioloških procesov na molekularnem nivoju ne more biti izpeljana zgolj iz poznavanja aminokislinskih zaporedij zapisanih v genih. Sodobne raziskave so zato usmerjene v naraščajoče nivoje kompleksnosti bioloških procesov pri katerih pa igrajo proteini ključne vloge.
		<i>ANG</i> Research in the postgenomic era represents a new milestone in biological sciences. The availability of genomes of increasing number of organisms has started to shape the concepts of research. The availability of complete lists of gens make it quite evident that understanding of biological processes at the molecular level can not be directly deduced from the genetic sequences alone. Contemporary research is therefore targeting increasingly complex levels of physiological processes in which proteins play crucial roles.
	Šifra	B.04 Vabljen predavanje
	Objavljeno v	Zavod RS za šolstvo; Povezanost procesov; 2011; Str. 25-28; Avtorji / Authors: Turk Dušan
Tipologija	1.06 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci (vabljen predavanje)	
3.	COBISS ID	24648487 Vir: COBISS.SI
		Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov

Naslov	<i>SLO</i>	(CiPKeBIP)
	<i>ANG</i>	Knowledge harvesting: Centre of excellence CIPKEBIP
Opis	<i>SLO</i>	Predavanja v slovenskem parlamentu: CIPKEBIP načrtuje in izvaja svoje raziskave v postgenomskem obdobju, ki predstavlja novo obdobje ved o življenju. Naraščajoče število dostopnih genomov iz vrst različnih organizmov na novo oblikuje koncepte v raziskavah. Dostopnost celotnih seznamov genov je predočila, da za razumevanje bioloških procesov na molekularnem nivoju ne more biti izpeljana zgolj iz poznavanja aminokislinskih zaporedij zapisanih v genih. Sodobne raziskave so zato usmerjene v naraščajoče nivoje kompleksnosti bioloških procesov pri katerih pa igrajo proteini ključne vloge. V okviru Centra akademske in industrijski partnerji sodelujejo pro raziskavah na naslednjih področjih: mehanizmi imunskega odziva, mehanizmi intra in inter celične komunikacije in molekularne osnove za adaptacijo eukariotskih organizmov na ekstremna (halofilna) okolja.
	<i>ANG</i>	Lecture in Slovenian parliament: CIPKEBIP is shaping its research in the postgenomic era, a new age in biological sciences. The availability of genomes of increasing number of organisms has started to shape the concepts of research. The availability of complete lists of genes make it quite evident that understanding of biological processes at the Molecular level can not be directly deduced from the genetic sequences alone. Contemporary research is therefore targeting increasingly complex levels of physiological processes in which proteins play crucial roles. Within the Centre academic and industrial partners combined tackle the following areas of research: immune response mechanisms, inter and intra cellular communication and molecular basis for adaptation of eukaryotic organisms on extreme (halophilic) environment.
Šifra	B.04	Vabljen predavanje
Objavljeno v	Državni zbor; 2011; Avtorji / Authors: Turk Dušan	
Tipologija	3.16	Vabljen predavanje na konferenci brez natisa

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

V tem obdobju je bila realizirana 1 patentna prijava:

ŠNAJDER Marko, MIHELIČ Marko, TURK Dušan, POKLAR ULRIH Nataša. "Overproducing recombinant pennisine in heterologous expression systems", patentna prijava št. P-201300110. Ljubljana: Urad Republike Slovenije za intelektualno lastnino, 2013 (COBISS.SI-ID 425100).

Področje raziskav patenta vključuje izražanje rekombinantnega proteina "pennizin" iz termofilne arhee s prilagojeno sekvenco v *Escherichia coli* in njegove izolacije.

Institucije prijaviteljice patenta so:

1. Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov CIPKeBiP, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana (25% delež)
2. Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana (50% delež)
3. Institut Jožef Stefan, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana (25% delež)

## 9. Pomen raziskovalnih rezultatov programske skupine<sup>8</sup>

### 9.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>9</sup>

*SLO*

Dušan Turk je eden od najbolj citiranih raziskovalcev na področju znanosti o življenju, ki živijo in delajo v Sloveniji. Je v svetu opazen razvijalec računalniških metod strukturne biologije (Turk, 2013), s pogostimi predavanji na konferencah. V tem obdobju je skupina spet ujela

tehnološki rob tudi na eksperimentalnem področju in postala kompetitivna v svetovnem merilu (na primer predavanje v na Keystonski konferenci). To je bilo omogočeno zaradi izdatnih investicij v opremo v okviru Centra odličnosti CIPKEBIP. Vodja programske skupine je koordiniral pripravo in izvedbo tega projekta kot strokovni direktor zavoda. Objave programa so v tem obdobju večinoma še črpale iz tem regulacije in mehanizmov proteolize, ki smo jih proučevali v prejšnjem obdobju. Šlo je za objave člankov iz področja raziskav cisteinskih proteaz in njihovih inhibitorjev. Pojasnili smo strukturo klitocipinov kot nove družine proteaznih inhibitorjev z  $\beta$ -trefoil zvitjem in njihove mehanizme inhibicije cisteinskih proteaz in s tem odprli vpogled v razumevanje mehanizma s katerim inhibirajo cisteinske in serinske proteaze (Renko in sod. 2010; Renko in sod. 2012, Sabotič in sod., 2012; Pohleven in sod., 2012 ' trije članki v JBC in eden pregledni v Biological Chemistry). S pomočjo znanja in infrastrukturnega vlaganja skupina dviga kakovost in omogoča uveljavljanje tudi drugim skupinam v slovenskem prostoru (Brvar in sod., 2012; Mirković in sod., 2011). Pomembne pa so sodelave znotraj odseka za Biokemijo in molekularno in strukturno biologijo s skupino Borisa Turka.

ANG

Dušan Turk is one of the most cited researchers in the area of life sciences working and living in Slovenia. In the world he is noticeable developer of computational methods of macromolecular crystallography (Turk, 2013) as indicated by talks at international conferences. In this period the group caught the technological edge also in the experimental part of structural biology and became internationally competitive (for example talk at the Keystone conference). This was made possible by substantial investments in equipment in the frame of the Centre of excellence CIPKEBIP project. D. Turk coordinated preparation of the project and later the conducted the project as Scientific director of the Centre. Publications in this period mostly continued research from the previous period. These were studies of mechanisms of regulation of proteolysis. Published works described studies of cysteine proteases and their inhibitors. Our studies revealed the structure of clitocypins as a new family of protease inhibitors with the  $\beta$ -trefoil fold and their mechanism of inhibition of cysteine proteases. This studies provided insight into into mechanism by which the inhibitors sharing the  $\beta$ -trefoil fold inhibit also serine proteases and legumain family of cysteine proteases. There are papers published in JBC (Renko in sod. 2010; Sabotič in sod., 2012; Pohleven in sod., 2012) and review in Biological Chemistry in a dedicated issue (Renko et al., 2012). With the aid of knowhow and available infrastructure the Structural biology group elevates the level of research also other groups in the area (Brvare et al., 2012, Mirković et al., 2011). Important are also collaborations within the Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology with the group of Boris Turk.

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

SLO

Čeprav v svetu doživlja strukturna biologija kot področje razvoj vsaj zadnjih 50 let, smo v Sloveniji na tem področju zaostajali, ker smo jo pričeli razvijati šele v zadnjih 20-ih letih. Zasluge za ta razvoj pa ima ravno ta skupina, ki je pričela z določevanjem prvih proteinskih struktur pri nas. Znanje na tem področju je pridobil vodja tega programa pri Nobelovem nagrajencu Robertu Huberju na Max Planckovem Institutu v Martinsriedu pri Muenchenu. Določene so bile prve kristalne strukture cisteinskih katepsinov, njihovih proteinskih inhibitorjev stefinov in cistatinov ter mehanizmi njihove interakcije. S tem so se slovenski raziskovalci uveljavili ne le doma, pač pa tudi v tujini. Objavili so nove strukture v uglednih publikacijah z visoko citiranostjo, vključno s kristalno strukturo kompleksa katepsin LIi p41 (EMBO J., 1999). Postali so mednarodno ugledna skupina, na tem področju edina v Sloveniji, ter s tem afirmirali ugled slovenske znanosti v svetu. Kasneje so se vključili tudi v Okvirne Programe EU. Tovrstne raziskave so pomembne tudi za gospodarstvo, saj kažejo svoj potencial v farmacevtski industriji ter biotehnoloških SMEs. V preteklosti je bilo precej sodelovanja s farmacevtsko industrijo, ki je tudi sofinancirala nabavo opreme. S tem so bili postavljeni temelji strukturne biologije na Institutu Jožef Stefan, Univerzi v Ljubljani in Mednarodni podiplomski šoli

IJS. Rezultat tega so opravljena doktorska dela, magisteriji ter diplome. Nekdanji diplomanti in doktorandi so se zaposlili v industriji, institutih, dveh slovenskih univerzah, administraciji (npr. EU) in tujini.

Pomanjkanje investicij v preteklosti je resno vplivalo na naše raziskave. Razvoj na tem področju je povezan z ogromnimi vlaganji v raziskave same, kot tudi drago infrastrukturo s proizvodnjo, kristalizacijo proteinov in določanjem struktur. Z nedavnimi investicijami v opremo v okviru Centra odličnosti CIPKeBiP ter zadostnim financiranjem materialnih stroškov raziskav v letih 2010 do 2013 smo ta zaostanek delno nadoknadili (kar kaže na primer vabilo na predavanje na ugledni Keystone konferenci "High throughput Structural Biology" leta 2012, poleg tega še publikacija - prva na področju v letu 2013). Vendar velikost skupine pod kritično maso (4.7 FTE) in upadajoči stroški za materialne izdatke (30% zmanjšanje v zadnjih dveh letih, 1 FTE je sedaj vreden cca. 65 000 EUR za plače, materialne stroške, režijo itd.) so postali resna omejitev pri izvedbi raziskav na mednarodno kompetitivnem nivoju. Ne glede na navedeno, pa je razvoj področja strukturne biologije pri nas pokazal, da je to področje znanosti izjemno pomembno in da ima ta kvalitetna skupina mednarodni ugled.

ANG

The development of structural biology as a field started 50 years ago, however, in Slovenia we followed with a 30 year delay. This group made a significant contribution to the field with the determination of the first protein crystal structures in the country. Knowledge in this field was gained by the PI of this program working on his PhD thesis with Nobel laureate Robert Huber at the MaxPlanck Institute in Martinsried, Munich. The first crystal structures of cysteine cathepsins, their inhibitors stefins and cystatins, and the mechanism of their interactions were determined. With these achievements, the Slovenian researchers became recognized in their home country and internationally. They published a series of prominent publications with high citation rate including crystal structure of the complex cathepsin Lp41 Ii (EMBO J., 1999). They became a worldwide recognized group, thus contributing to the reputation of Slovenian science. Later, they also participated in the EU Framework Programmes. The obtained knowledge shows potential in the pharmaceutical industry and biotech SMEs. In the past it was an active cooperation with the pharmaceutical industry, which contributed significantly to the purchase of equipment. This research provided the basis of structural biology at the Jožef Stefan Institute, University of Ljubljana, University of Primorska, and the International Postgraduate School IJS. The research work resulted in doctoral dissertations, master's and bachelor's degrees. Former students and employees are currently employed in industry, other institutes, universities, administration (such as EU) or abroad.

Lack of investment in the past has a serious impact on our research. Development in this area is linked to significant investment in research itself, as well as in infrastructure for protein production, crystallization and structure determination. The recent and pending investments in the equipment within the Centre of Excellence CIPKeBiP now brought the equipment and achievements to the competitive level of research (as demonstrated by in the invitation to present our work at Keystone Conference "High throughput Structural Biology" 2012, and one paper first in the field, 2013). However, the size of the team below the critical mass (4.7 FTE) and the reducing resources for covering of material costs of research (30% reduction in the last two years, the value of 1 FTE is about 65 000 EUR in 2013) are now a serious limitation to perform research at the international competitive level. Nevertheless, our achievements contributed to the development of structural biology in Slovenia and internationally.

## 10. Zaključena mentorstva članov programske skupine pri vzgoji kadrov v obdobju 1.1.2009-31.12.2013<sup>11</sup>

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

vrsta usposabljanja	število diplom
bolonjski program - I. stopnja	5
bolonjski program - II. stopnja	0
univerzitetni (stari) program	16

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

Šifra raziskovalca	Ime in priimek	Mag.	Dr.	MR	
25629	Miha Renko	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
22282	Miha Andrejašič	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	
24270	Jure Pražnikar	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
0	Dušana Majera	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	
28444	Nives Škrlj	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" 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	
25629	Miha Renko	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	A - raziskovalni zavodi	
22282	Miha Andrejašič	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	C - Gospodarstvo	
24270	Jure Pražnikar	<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 1.1.2009-31.12.2013

Šifra raziskovalca	Ime in priimek	Sodelovanje v programski skupini	Število mesecev	
34422	Piotr Sosnowski	C - študent - doktorand	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 1.1.2009-31.12.2013 z vsebinsko obrazložitvijo porabe dodeljenih sredstev iz naslova dodatnega letnega sofinanciranja mednarodnega sodelovanja na podlagi pozivov za EU vpetost.<sup>15</sup>**

SLO

Naslov: Funkcionalno in vivo spremljanje encimov povezanih z boleznimi, temelječimi na svetlobi (Lightbased Functional in Vivo Monitoring of Diseases Related Enzymes)

LIVIMODE

7. okvirni program

Številka: 241919

Trajanje: 1.11.2009-30.4.2013

Koordinator: prof. ddr. Boris Turk, nosilec pogodbe za IJS

Neformalne mednarodne sodelave v teku s skupinami:

1. Wladek Minor – University of Virginia, Charlottesville;
2. Andrej Sali – UC San Francisco;
3. Gerhard Klebe – Uni Marburg;
4. Yvone Jones – Oxford Centre for Human Genomics; Benedicte Manoury Institut Curie, Paris;
5. Imre Berger, EMBL Grenoble;
6. Marcin Drag, Tehniška univerza v Wrocławu
7. Kris Gevaert, Univerza v Gentu;
8. Jacques Neefjes, NCI Amsterdam

Sodelovanje v iniciativi INSTRUCT indirektno preko CIPKEBIP-a

**14. Vključenost v projekte za uporabnike, ki v so obdobju trajanja raziskovalnega programa (1. 1. 2009 – 31. 12. 2013), potekali izven financiranja ARRS<sup>16</sup>**

SLO

Programska skupina je bila vključena v izvajanje operacije Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov CIPKeBiP.

Center odličnosti je bil ustanovljen in je začel s svojim delovanjem novembra 2009. Ustanovljen je bil na podlagi uspešne prijave na razpis tedanjega Ministrstva za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo. Vizija raziskovalcev pri prijavi na razpis za centre odličnosti je bila povezati in zagotoviti koordinacijo raziskovalnih skupin v Sloveniji, ki delujejo na področju raziskav proteinov. V okviru operacije je bilo treba omenjenim raziskovalnim skupinam najprej zagotoviti najsodobnejšo raziskovalno opremo in s tem vzpostaviti kompetitivna znanja in tehnologije. Večina pridobljenih sredstev operacije (82%) je bila namenjena nakupu najsodobnejše raziskovalne opreme.

Vzpostavili smo raziskovalne platforme, ki poleg produkcije proteinov, njihovih struktur in malih molekul zagotavljajo analizo molekularnih mehanizmov od celičnega, preko biokemijskega do atomskega nivoja:

1. Visoka in super-ločljiva svetlobna mikroskopija za vizualizacijo molekul in njihovih interakcij v celicah ali organih ali organizmih.
2. Masna spektroskopija za analizo strukture proteinov v kompleksnih vzorcih in določitvijo posameznih bioloških molekul in njihovih modifikacij.
3. Platforma za proizvodnjo proteinov in struktur ter za analizo molekularnih mehanizmov od biokemijskih do atomskih resolucijskih študij (3D kristalne strukture, kinetika interakcij in lastnosti biološko aktivnih proteinskih molekul ter majhnih organskih molekul).
4. Platforma za razvoj biološko aktivnih organskih molekul izdelanih z biološkimi in kemijskimi sintezami.
5. Računalniška analiza kompleksnih bioloških in drugih eksperimentalnih podatkov z namenom izdelave opisnih in napovedovalnih modelov, s pridobivanjem znanja in njegovo integracijo, kot tudi optimizacijo eksperimentalnih pristopov in tehnoloških procesov.

Izsledki in znanja iz raziskav bodo uporabljeni v razvoju tehnoloških procesov in pri

skupnih nacionalnih in mednarodnih projektih z industrijskimi partnerji. Ustvarjeno znanje bo služilo za povečanje tekmovalnosti majhnih in večjih podjetij na biotehnoškem trgu. Skupni učinek centra odličnosti se bo pokazal tudi v izobraževanju mladih znanstvenikov, ki bodo lahko svojo poklicno kariero nadaljevali tako v industriji kot tudi v raziskovalnih ustanovah.

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

SLO

Realizacija izvedbe patenta z naslovom "Overproducing recombinant pennisine in heterologous expression systems" (COBISS.SI-ID 425100) je izvedljiva z manjšim finančnim vložkom (cca 0,5 do 1 mio EUR) in bi tako vodila do ustanovitve spin-off podjetja in s tem tudi do novih delovnih mest.

Pernizin je zelo zanimiv za industrijsko izrabo, ker ima nekaj izjemnih lastnosti in sicer aktivnost pri visokih temperaturah in v širokem območju pH in odpornost na denaturante. Uporaben je, ker degradira prionske proteine ali proteinske depozite, pri sterilizaciji operacijske opreme, čiščenju tekstilnih vlaken, v prehranski industriji.

### 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 checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
potrebni finančni vložek	15 000 000 Evrov v obdobju 7 let
ocena potrebne infrastrukture in opreme <sup>18</sup>	5 000 000 Evrov. Kupiti bi morali praktično vso opremo z odseka in centra odličnosti CIPKEBIP, ki se uporablja za izražanje proteinov, čiščenje, kristalizacijo, biokemijsko in strukturno karakterizacijo proteinov vključno z masnimi spektrometri. Opreme kupljene v centrih odličnosti v profitne namene ne bi smeli uporabljati zaradi pogodbe in akademskih popustov pri nabavi opreme in licenc, ki smo jih pridobili za obratovanje.

### 17. Izjemni dosežek v 2013<sup>19</sup>

#### 17.1. Izjemni znanstveni dosežek

Izjemen dosežek v preteklem letu je objava razvoja programske opreme MAIN (Turk 2013) v ugledni znanstveni reviji Acta Crystallographica D / Biological Crystallography) z impact faktorjem 14. Gre za objavo pregleda razvoja metod makromolekularne kristalografije avtorja v njegovi celotni znanstveni karieri. MAIN je bil od svojih začetkov v drugi polovici 80s let prejšnjega stoletja preizkusni teren za razvoj novih pristopov in je v tem obdobju omogočil določitev vrste makromolekularnih struktur in s tem pomembno vplival na razvoj računalniških metod makromolekularne kristalografije.

#### 17.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Za skupino je bila vključenost v Center odličnosti za integrirane prisotpe v kemiji in biologiji proteinov izjemnega pomena. Center odličnosti se je začel kot investicija v prihodnost v obdobje po prenehanju projekta razvoja centra odličnosti z osnovnim namenom, da zagotovi opremo, ki bo omogočala izvajanje mednarodnih kompetitivnih raziskav. Večino sredstev centra (82%) smo zato namenili nakupu opreme in nakupe tudi izvedli do konca leta 2013.

V okviru centra odličnosti so vključene raziskovalne skupine na osnovi sodobne raziskovalne opreme stopile v korak z raziskovalnimi skupinami v Evropi in jim postale konkurenčne.

1. Izjemni znanstveni dosežki - ARRS

Leto 2011

Maja Rupnik, Robert Zorec, Hrvoje Petković, Boris Turk

Leto 2012

Maja Rupnik, Franc Strle, Igor Križaj, Nataša Poklar Ulrih

Raziskovalna skupina CIPKEBIP je bila 31.12.2013 na 4. mestu v Sloveniji (s 37470 citiranj).

## 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 JRO  
in/ali RO s koncesijo:*

in

*vodja raziskovalnega programa:*

Institut "Jožef Stefan"

Dušan Turk

### ŽIG

Kraj in datum: 

LJUBLJANA	14.4.2014
-----------	-----------

### Oznaka prijave: ARRS-RPROG-ZP-2014/62

<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. 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, to navedite. 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 tega programa. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja programa (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'. [Nazaj](#)

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

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

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato



ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat programa ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

<sup>7</sup> Navedite rezultate raziskovalnega programa iz obdobja izvajanja programa (do oddaje zaključnega poročila) 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://sicris.izum.si/> za posamezen program, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

<sup>9</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>10</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>11</sup> Upoštevajo se le tiste diplome, magisteriji znanosti in doktorati znanosti (zaključene/i v obdobju 1. 1. 2009 – 31. 12. 2013), pri katerih so kot mentorji sodelovali člani programske skupine. [Nazaj](#)

<sup>12</sup> Vpišite število opravljenih diplom v času trajanja raziskovalnega programa glede na vrsto usposabljanja. [Nazaj](#)

<sup>13</sup> Vpišite šifro raziskovalca in/ali ime in priimek osebe, ki je v času trajanja 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. 2013), ustrezno 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. Točko izpolnijo tudi izvajalci raziskovalnega programa, prejemniki sredstev iz naslova dodatnega letnega sofinanciranja raziskovalnega programa zaradi mednarodnega sodelovanja (sodelovanja v projektih okvirnih programov Evropske unije). Izvajalec, ki je na podlagi pogodbe prejel sredstva iz navedenega naslova, vsebinsko opiše porabo prejetih sredstev za financiranje stroškov blaga in storitev ter amortizacije, nastalih pri izvajanju tega raziskovalnega programa. V primeru, da so bili v okviru raziskovalnega programa prejemniki sredstev različni izvajalci, vsak pripravi vsebinsko poročilo za svoj delež pogodbenih sredstev. Vodja raziskovalnega programa poskrbi, da je vsebinsko poročilo, ločeno za vsakega izvajalca, vključeno v navedeno točko poročila. 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 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, 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 2013 (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/2014 v1.00a

7A-BA-CD-6D-EC-07-1A-B1-56-FB-66-26-A9-BC-85-DB-9F-EF-74-4B