

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2012/26

## ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	Z1-2138
<b>Naslov projekta</b>	Strukturne študije RNK oligonukleotidov udeleženih v regulaciji genov
<b>Vodja projekta</b>	24448 Mirko Cevec
<b>Tip projekta</b>	Zt Podoktorski projekt - temeljni
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	3400
<b>Cenovni razred</b>	B
<b>Trajanje projekta</b>	05.2009 - 04.2011
<b>Nosilna raziskovalna organizacija</b>	104 Kemijski inštitut
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	
<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)

#### 2. Raziskovalno področje po šifrantu FOS<sup>1</sup>

<b>Šifra</b>	1.06
<b>- Veda</b>	1 Naravoslovne vede
<b>- Področje</b>	1.06 Biologija

### B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

#### 3. Povzetek projekta<sup>2</sup>

SLO

Namen tega temeljnega podoktorskega projekta je bil študij 3D struktur kratkih nekodirajočih RNK, ki vplivajo na izražanje genov. Osredotočili smo se na primerjavo mikroRNK (miRNK) in kratke interferenčne RNK (siRNK) ter ugotavljali molekularne

značilnosti, ki določajo njuno različno delovanje. miRNK se od siRNK razlikuje po tem, da se z nepopolnim baznim parjenjem veže na tarčno informacijsko RNK (mRNK) in ovira njeno translacijo, medtem ko se siRNK s popolno komplementarnostjo veže na tarčno mRNK in jo razgradi.

Preučevali smo *let-7* miRNK iz črva *Caenorhabditis elegans*. *let-7* miRNK vpliva na translacijo gena *lin-41* preko miRNK-ribonukleinskega kompleksa (miRNP) tako, da se z nepopolno komplementarnostjo veže na 3' neprevedljivo regijo (3'-UTR) *lin-41* mRNK. Vpliv *let-7* miRNK je odvisen od dveh dobro ohranjenih *let-7* komplementarnih mest na *lin-41* mRNK. Mutacije na teh delih mRNK so pokazale, da bazno parjenje, nesimetrična notranja zanka in adeninska izboklina močno vplivajo na utišanje gena. Najprej smo študirali vpliv različnih mutacij na strukturo miRNK:mRNK kompleksa, potem smo določili 3D strukture miRNK:mRNK kompleksov in nato raziskovali njihovo dinamiko. Pri projektu smo uporabili visoko ločljivo NMR spektroskopijo. Standardne metode za določevanje struktur uporabljajo neoznačene RNK, medtem ko nove metode temeljijo na izotopsko označenih RNK pripravljenih z *in vitro* encimsko transkripcijo s T7 RNK polimerazo. Študij 3D struktur z visoko resolucijo je temeljil na NMR podatkih in omejitvah medatomske razdalje ter torzijskih kotov. Kvaliteto NMR struktur smo izboljšali z merjenjem preostalih dipolarnih sklopitev v delno orientiranih RNK z filamentoznimi fagi *Pseudomonas aeruginosa* Pf1.

Rezultati naših raziskav pomagajo k poglobitvi znanja o zvijanju RNK in pri odkrivanju novih strukturnih motivov miRNK, ki bi jih lahko uporabljali kot tarče za razvoj zdravil za bolezni, kot so rak, sladkorna bolezen in srčno popuščanje. Zaporedje *let-7* miRNK so odkrili v številnih organizmih, tudi pri človeku, kjer *let-7* miRNK lahko deluje kot supresor Ras onkogene in bi bil dobra terapevtska tarča za zdravljenje pljučnega raka. Vedno več biotehnoloških podjetij se ukvarja z diagnozo, zdravljenjem in napovedovanjem bolezni, ki so posledica nepravilnega delovanja miRNK.

ANG

The purpose of this basic postdoc project was the study of 3D structures of small non-coding RNAs, which influence gene expression. We focused on the comparison of microRNA (miRNA) and short interfering RNA (siRNA) and on the molecular characteristics, which define their different activity. While miRNA binds to the target messenger RNA (mRNA) with imperfect complementarity and repress its translation, siRNA binds to the target mRNA with perfect complementarity and cleaves it.

We studied *let-7* miRNA from nematode *Caenorhabditis elegans*, which silences the expression of *lin-41* gene through the miRNA-ribonucleoprotein complex (miRNP) by imperfect base-pairing with 3' untranslated region (3'-UTR) of *lin-41* mRNA. The interaction between *let-7* miRNA and *lin-41* mRNA is dependent on two well conserved *let-7* complementary sites. Mutations in these parts of mRNA showed that the nature of base-pairing, asymmetric internal loop and adenine bulge are important for regulation of gene expression. First, we studied the structural features of mutants of miRNA:mRNA model constructs, then we characterized the 3D structures of miRNA:mRNA complexes and investigated their dynamics. The current project made use of high resolution NMR spectroscopy techniques. Standard methods for structure determination make use of unlabeled RNA samples, whereas new NMR methods require preparation of isotopically labeled RNA samples, which can be achieved by *in vitro* enzymatic transcription with T7 RNA polymerase. The high resolution 3D structures were modeled with the use of NMR data in particular, inter-residue distance and torsion angle restraints. The quality of NMR structures was improved with the measurement of residual dipolar couplings of partially aligned RNAs with the filamentous phages *Pseudomonas aeruginosa* Pf1.

The results of our research work contribute to expansion of the knowledge about RNA folding and allow identifying new miRNA structural features, which may potentially be used as targets in development of new drugs for diseases, such as cancer, diabetes and heart failures. *let-7* sequence was found in many organisms including human, where *let-7* miRNA functions also as Ras oncogene suppressor and it could serve as a good therapeutic target for treating lung cancer. More and more biotech firms are now dealing with the diagnosis, treatment, and prediction of different diseases caused by miRNAs.

**4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu<sup>3</sup>**

Glavni cilj projekta je bila določitev 3D strukture izotopsko označenega 34-nt RNK konstrukta (LCS1co), ki predstavlja vezavo *let-7* miRNK na prvo *let-7* komplementarno mesto (LCS1) znotraj 3'-UTR *lin-41* mRNK. Za to vezavno mesto so značilni nesimetrična notranja zanka, adeninska izboklina in Watson-Crick bazno parjenje. Najprej smo skonstruirali različne mutante dvoverižnih RNK kompleksov. Naročili smo RNK in jih očistili s pomočjo mikrocentrifugiranja. Nato smo pripravili NMR vzorce in poiskali pogoje za pravilno zvijanje. Za vse komplekse smo izvedli NMR eksperimente potrebne za oceno kvalitete vzorcev in delno določili kemijske premike protonov. Talične temperature smo določili s pomočjo UV spektroskopije.

Izotopsko označen LCS1co smo pripravili z *in vitro* encimsko transkripcijo s T7 RNK polimerazo. Stranske produkte in nezreagirane komponente smo odstranili s preparativno denaturajočo poliakrilamidno gelsko elektroforezo (7 M urea). RNK smo po UV senčenju izrezali iz gela in ga eluirali z uporabo elektroelucije. Na koncu smo raztopino RNK znatno dializirali v NMR pufri z uporabo mikrocentrifuge. RNK smo pogreli do 95°C in hitro ohladili na ledu ter tako zagotovili pravilno zvijanje RNK. S pomočjo UV spektroskopije smo izmerili talično temperaturo RNK in je bila 332 K. Pripravili smo štiri različne RNK vzorce v NMR cevkah. Vsi NMR vzorci so vsebovali 10 mM natrijev fosfatni pufer (pH=6.8) in 20 mM natrijev klorid. Dva vzorca sta imela 2 mM koncentracijo RNK in sta se razlikovala po količini devterirane vode (5% D<sub>2</sub>O ali 100% D<sub>2</sub>O). Uporabili smo ju za izvedbo NMR eksperimentov, ki so nam omogočili določiti kemijske premike <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N ter <sup>31</sup>P resonanc in medprotonske razdalje s pomočjo NOESY spektrov. Uspelo nam je narediti celoten NOE sprehod po sekvenci zaporedja LCS1co med H6/H8 in H1' protonskimi resonancami v 2D NOESY spektru.

Druga dva vzorca sta imela 1 mM koncentracijo RNK. Razlikovala sta se v količini filamentoznih fagov *Pseudomonas aeruginosa* Pf1, s katerimi smo dosegli delno orientiranje RNK glede na magnetno polje, saj je prevračanje RNK omejeno in anizotropno. V enem vzorcu ni bilo fagov, v drugem je bilo 17 mg/ml fagov. Kvaliteta spektrov se po dodatku fagov ni poslabšala. <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H vrednosti preostalih dipolarnih sklopitev (ang. RDC: *Residual Dipolar Coupling*) smo izmerili iz razcepitve signalov v <sup>15</sup>N dimenziji 2D <sup>15</sup>N-HSQC spektrov. RDC vrednosti za <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H vezi H2-C2, H6-C6 in H8-C8 smo določili iz razcepitve signalov v <sup>13</sup>C dimenziji 2D <sup>13</sup>C-HSQC spektrov. Iz analize RDC vrednosti smo ugotovili, da zgornje in spodnje stebli nista popolnoma vzporedni in da nesimetrična notranja zanka povzroči pregib v celotni strukturi. RDC vrednosti smo uporabili pri piljenju in izboljšanju 3D strukture.

Strukture smo izračunali z uporabo molekularnega modeliranja s simulacijo počasnega ohlajanja s programom AMBER 9 in polja sil, ki ga je napisal Wang s sodelavci. Začetno strukturo smo pripravili z uporabo orodij za modeliranje InsightII ter modula XLEAP. Na začetni strukturi smo izvedli nekaj simulacij molekulske dinamike v temperaturnem območju od 300 do 2000 K v časovnem intervalu 8 ps. Pri tem nismo uporabili omejitev razdalj in torzijskih kotov, kar je omogočilo RNK, da je zavzela strukture v širšem konformacijskem območju. Za dobljene strukture smo izvedli 10 simulacij počasnega ohlajanja (SA) v časovnem intervalu 60 ps in časovnem koraku 1 fs. Pri tem smo uporabili NMR strukturne omejitve in splošni Bornov implicitni solvatacijski model (GB). RNK smo segreli na 1000 K v 5 ps, potem smo temperaturo obdržali konstantno 30 ps, jo znižali na 100 K v 11 ps in jo na koncu v 14 ps znižali še na 0 K. Jakost konstante sil je bila za omejitve NOE razdalj 35 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>, za omejitve torzijskih kotov 300 kcal mol<sup>-1</sup> rad<sup>-2</sup> in za omejitve planarnosti baz 25 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>. Vsi atomi znotraj 20 Å so bili vključeni v nevezne interakcije. SHAKE algoritem smo za vodikove atome uporabili s toleranco 0.0005 Å. V zadnjem koraku smo na vseh strukturah izvedli največ 10.000 korakov konjugirane gradientne minimizacije. Analizo družine desetih minimiziranih struktur z najnižjo energijo in najmanjšimi NMR kršitvami smo izvedli s pomočjo programov ptraj, suppose in 3DNA.

Za 3D strukturo LCS1co so značilni dve stebli, nesimetrična notranja zanka in adeninska izboklina. Nesimetrična notranja zanka je slabše definirana in lahko zavzame dve družini struktur, ki se razlikujeta v položaju nukleinskih baz

preostankov G23, U24 in U25. Nukleinska baza U24 je v obeh primerih obrnjena navznoter, G23 in U25 pa sta obrnjeni navzven. Nukleinska baza A30 v spodnjem stebelu prav tako lahko zavzame dve družini struktur. Izbočena nukleinska baza A30 se ne veže znotraj vijačnice, ampak je obrnjena v mali žleb in ne vpliva na standardno A-RNK obliko spodnjega stebela. Izmerili smo  $^{13}\text{C}$   $R_2$  relaksacijske vrednosti za C2, C6 in C8 atome posameznih preostankov, da bi ocenili gibljivost notranje zanke glede na A-RNK stebli. Preostanki U6, A10, A18, U24, U27, C29, C31, C33 in C34 kažejo višje  $R_2$  vrednosti. Za nesimetrično notranjo zanko smo dobili  $^{13}\text{C}$   $R_2$  vrednosti le za preostanke A10, G23 in U24.  $^{13}\text{C}$   $R_2$  vrednosti za A10 C8 in G23 C8 ne odstopajo od preostankov v steblih. Korelacijski signal A10 C2 je šibek in ima višji  $R_2$  vrednost, kar nakazuje na hitro premikanje na ps-ns časovni skali.

3D strukturo LCS1co smo primerjali s strukturo 33-nt RNK konstrukta za drugo *let-7* komplementarno mesto (LCS2co). Primerjava je pokazala, da je nesimetrična notranja zanka LCS2co boljše definirana od LCS1co in zato povzroči večji naklon med stebeloma. Članek o 3D strukturi LCS1co smo objavili v reviji *Nucleic Acids Res.* 2010, 38, 7814-7821.

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

Z raziskovalnim projektom smo realizirali vse zastavljene cilje. Pripravili in analizirali smo mutante dvoverižnih RNK kompleksov med *let-7* miRNK in 3'-UTR *lin-41* mRNK. Določili smo kemijske premike  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  in  $^{31}\text{P}$  resonanc 34-nt RNK konstrukta (LCS1co), ki predstavlja vezavo *let-7* miRNK na prvo *let-7* komplementarno mesto znotraj 3'-UTR *lin-41* mRNK (LCS1). Izmerili smo RDC vrednosti in jih uporabili pri molekularnem modeliranju s pomočjo simulacije počasnega ohlajanja. Izmerili smo  $R_2$  relaksacijske vrednosti C2, C6 in C8 atomov posameznih preostankov. Pripravili smo članek in ga objavili v reviji *Nucleic Acids Res.*

Rezultate smo predstavili v obliki postra na konferenci za magnetno resonanco EUROMAR 2009, ki je potekala od 5. do 9. julija 2009 v mestu Göteborg na Švedskem, in na Skupnem kongresu SBD (Slovensko biokemijsko društvo) in SGD (Slovensko genetsko društvo) z mednarodno udeležbo, ki je potekal od 20. do 23. septembra 2009 na Otočcu v Sloveniji.

Vodja projekta, dr. Mirko Cevec, je novembra 2009 šel na podoktorsko usposabljanje na Goethe univerzo na Inštitutu za organsko kemijo in kemijsko biologijo, Frankfurt na Majni, k prof. dr. Haraldju Schwalbe-ju. Njegovo delo je usmerjeno v študij nekodirajočih RNK struktur udeleženi pri razvoju človeških možganov. V letu 2010 je vodja projekta pridobil dvoletno Marie Curie štipendijo (FP7-PEOPLE-2009-IEF), ki je namenjena poklicnemu razvoju mladih raziskovalcev.

#### 6. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine<sup>5</sup>

Ni bilo sprememb.

#### 7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine<sup>6</sup>

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	4554778	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	NMR struktura <i>let-7</i> miRNK vezane na LCS1 mesto <i>lin-41</i> mRNK črva <i>Caenorhabditis elegans</i>
		<i>ANG</i>	NMR structure of the <i>let-7</i> miRNA interacting with the site LCS1 of <i>lin-41</i> mRNA from <i>Caenorhabditis elegans</i>
			<i>let-7</i> miRNK uravnavajo časovni potek razvoja črva <i>C. elegans</i> . Na 3'-UTR <i>lin-41</i> mRNK se vežejo dvakrat in močno znižajo izražanje gena. V članku

	Opis	SLO	smo opisali določitev strukture 34-nt RNK konstrukta s pomočjo NMR spektroskopije v tekočem. Struktura, ki posnema interakcijo let-7 miRNK na prvo komplementarno vezavno mesto, kaže dve ne-kanonični regiji, to sta nesimetrična notranja zanka in adeninska izboklina. V notranji zanki sta G23 in U25 obrnjena navzven, medtem ko je nukleinska baza U24 obrnjena navznoter. Izbočena nukleinska baza A30 se ne veže znotraj vijačnice, ampak je obrnjena v mali žleb.
		ANG	let-7 miRNAs control the timing of development of the nematode <i>C. elegans</i> . They bind two times in the 3'-UTR of <i>lin-41</i> mRNAs and downregulate gene expression. We have determined by solution-state NMR the structure of a 34-nt RNA construct, which illustrates the interaction of let-7 miRNA to the first complementary binding site. Structure shows two non-canonical parts characteristic for the seed region: an asymmetric internal loop and a bulge. The internal loop demonstrates residues G23 and U25 bulged-out and the residue U24 looped-in. Residue A30 is not stacked-in but points into the minor groove.
	Objavljeno v	Oxford University Press; Nucleic acids research; 2010; Vol. 38, no. 21; str. 7814-7821; Impact Factor: 7.836; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.787; A': 1; WoS: CQ; Avtorji / Authors: Cevc Mirko, Thibaudeau Christophe, Plavec Janez	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
2.	COBISS ID	4508698	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Struktura miRNK:mRNK kompleksa v tekočem
		ANG	Solution structure of miRNA:mRNA complex
	Opis	SLO	V tem preglednem članku opisujemo pripravo 33-nt RNK konstrukta, ki predstavlja vezavo med let-7 miRNK in lin-41 mRNK na drugem vezavnem mestu (LCS2). Razložimo NMR eksperimente, ki smo jih uporabili za določitev kemijskih premikov <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N in <sup>31</sup> P resonanc ter za omejitve medprotonskih razdalj in torzijskih kotov. Strukturni izračuni so pokazali, da se izotopsko označen RNK zvije v stabilno strukturo sestavljeno iz dveh stebelnih regij ločenih in z dobro definirano nesimetrično notranjo zanko. NMR v tekočem pomembno prispeva k globljemu razumevanju o strukturnih lastnostih miRNK:mRNK kompleksov.
		ANG	In this review article we describe the preparation of the 33-nt RNA model construct mimicking interaction between let-7 miRNA and lin-41 mRNA. We explain NMR experiments used for assignment of <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N and <sup>31</sup> P resonances and acquisition of NOE derived restraints and torsion angle restraints. Structural calculation showed that the isotopically labeled RNA construct folds into a stable structure consisting of two stem regions separated by a defined asymmetric internal loop. Solution-state NMR makes important contribution toward deeper understanding of structural features of miRNA:mRNA complexes.
	Objavljeno v	Humana Press; MicroRNAs and the immune system; 2010; Str. 251-265; Avtorji / Authors: Cevc Mirko, Plavec Janez	
	Tipologija	1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji	

### 8. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine<sup>Z</sup>

	Družbenoekonomsko relevantni dosežki		
1.	COBISS ID	4204058	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Študija nepopolne vezave let-7 miRNK na lin-41 mRNK z NMR
		ANG	

		ANG	Imperfect binding of let-7 miRNA to lin-41 mRNA studied by NMR
Opis	SLO		Na konferenci smo predstavili naše delo na izotopsko označenih RNK lasnicah, ki smo jih uporabili kot modelne komplekse med let-7 miRNK in vezavnim mestom na lin-41 mRNK. 3D strukture RNA konstruktov smo določili z uporabo standardnih 2D in 3D NMR tehnik. RNK konstrukte smo orientirali s pomočjo fagov, kar nam je omogočilo, da smo izmerili preostale dipolarne sklopitve. Izračuni na podlagi NMR omejitev so pokazali, da se RNK zvijejo v stabilne strukture sestavljene iz dveh stebelnih regij ločenih z nesimetrično notranjo zanko. Stebli sta bili stabilizirani z Watson-Crick baznimi pari. Nesimetrična notranja zanka prvega vezavnega mesta (LCS1) je bila slabše definirana. Nesimetrična notranja zanka drugega vezavnega mesta (LCS2) se je zvila v dobro definirano strukturo. Trije uracili so tvorili bazni triplet, medtem ko sta adenina tvorila AA bazni par. Ti zanimivi strukturni elementi kažejo, da je kompleks med miRNK in mRNK drugačen od standardne A-oblike RNA.
	ANG		We presented our work on isotopically labeled RNA hairpins used as model complexes between let-7 miRNA and the binding sites on lin-41 mRNA. The 3D structures of RNA constructs were determined with the use of standard 2D and 3D NMR techniques. Phages were used to align the RNA constructs and to acquire residual dipolar couplings. NMR restraint computer simulations showed that RNAs fold into stable structures consisting of two stem regions separated by an asymmetric internal loop. Stems were stabilized by Watson-Crick base pairs. The asymmetric internal loop from second binding site (LCS2) adopted a well-defined structure. Three uracils formed a base triple, while the two adenines formed AA base pair. The asymmetric internal loop from first binding site (LCS1) was less defined. These interesting structural elements make complex between miRNA and mRNA different in comparison to a common A-form RNA.
Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci		
Objavljeno v	EUROMAR 2009, Magnetic Resonance Conference, Programme and book of abstracts; 2009; Str. 46; Avtorji / Authors: Cevc Mirko, Plavec Janez		
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci		
2.	COBISS ID	4266778	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Vpliv notranje zanke na strukturo RNK, ki posnema interakcijo let-7 miRNK z lin-41 mRNK	
	ANG	Influence of an internal loop on the structure of a RNA mimicking the interaction of let-7 miRNA with lin-41 mRNA	
Opis	SLO	Osredotočili smo se na let-7 miRNK, ki se dvakrat nepopolno veže na 3'-UTR lin-41 mRNK (LCS1 in LCS2) in uravnava časovni razvoj črva <i>C. elegans</i> . Pripravili smo 13C,15N-označene RNK lasnice za obe vezavni mesti. Njuni strukturi v tekočem sta bili določeni z uporabo standardnih NMR meritev. Izračuni so pokazali, da se RNK zvijejo v stabilne strukture sestavljene iz dveh stebelnih regij ločenih z nesimetrično notranjo zanko. Nesimetrična notranja zanka drugega vezavnega mesta (LCS2) se je zvila v dobro definirano strukturo. Trije uracili so tvorili bazni triplet, medtem ko sta adenina tvorila AA bazni par. Analiza vijačnih parametrov obeh stebel je pokazala, da notranja zanka povzroči naklon med obema stebeloma, kar vpliva na širino veliki žleb. Nesimetrična notranja zanka prvega vezavnega mesta (LCS1) je bila slabše definirana. Vsi ti strukturni elementi obeh vezavnih mest so pomembni za prepoznavanje znotraj ribonukleoproteinskih kompleksov (miRNP).	
			Work focused on let-7 miRNAs that imperfectly binds two times to 3'-UTR of lin-41 mRNAs (LCS1 and LCS2) and regulates developmental timing of nematode <i>C. elegans</i> . 13C,15N-labeled RNA hairpins were prepared for both binding sites. Their structures in solution were determined with the

	ANG	use of standard NMR techniques. Simulated annealing with restrained molecular dynamics showed that RNA folded into stable structures consisting of two stems separated by an asymmetric internal loop. The asymmetric internal loop of a RNA mimicking second binding site (LCS2) adopted a well defined structure. Three uracils formed a base triple, while the two adenines formed AA base pair. The analysis of helical parameters of the both stems showed that internal loop induced bend between stems, which led to increase in the wideness of the major groove. The asymmetric internal loop of RNA mimicking first binding site (LCS1) was less defined. All these structural elements of both binding sites are important for recognition inside the ribonucleoprotein complexes (miRNPs).
Šifra	B.03	Referat na mednarodni znanstveni konferenci
Objavljeno v	Joint Congress of the Slovenian Biochemical Society and the Genetic Society of Slovenia with International Participation, Book of abstracts; 2009; Str. 185; Avtorji / Authors: Cevec Mirko, Plavec Janez	
Tipologija	1.12	Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci

### 9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine<sup>8</sup>

Vodja projekta je v okviru podoktorskega študija v Nemčiji preučeval strukturo HAR RNK (ang. HAR: Human Accelerated Region). HAR so večinoma nekodirajoče regije v človeškem genomu z večjim številom mutacij v primerjavi z drugimi vretenčarji. V 118-nt dolgem človeškem zaporedju HAR1 so opazili 18 mutacij v primerjavi s šimpanzjim zaporedjem HAR1. Zanimivo je, da se HAR1 RNK izraža skupaj z proteinom reelin v Cajal-Retzius celicah med razvojem človeških možganov, kjer je nujno potrebna za usmerjanje premikajočih nevronov. Zato da bi razumeli delovanje HAR RNK, je bilo potrebno določiti njihovo sekundarno in terciarno strukturo s pomočjo NMR spektroskopije. Za človeško HAR1 RNK sta bili predlagani dve različni sekundarni strukturi v obliki lista detelje. Da bi določili njeno sekundarno strukturo, so pripravili celotno 118-nt RNK in 37-nt RNK lasnico, ki je predstavljala vijačnico H1 človeške HAR1F RNK. Za opisani projekt so pripravili članek za objavo v priznani reviji.

### 10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine<sup>9</sup>

#### 10.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>10</sup>

SLO

siRNK in miRNK sta nekodirajoči RNK, ki sodelujeta pri potranskripcijskem uravnavanju izražanja genov tako, da se vežeta na tarčno mRNK. Na izražanje in razvoj protein-kodirajočih genov imajo pomembno vlogo strukturne značilnosti njihovih kompleksov z mRNK. miRNK se na tarčno mRNK veže z delno komplementarnostjo in največkrat utiša translacijo, medtem ko se siRNK veže na tarčno mRNK s popolno komplementarnostjo in cepi vez na sredini mRNK. Obstajajo številne študije o možnem delovanju miRNK, vendar je le malo znanega o strukturnih lastnostih miRNK:mRNK kompleksov. Trenutno sta poznani samo dve NMR strukturi miRNK:mRNK kompleksov (LCS1co in LCS2co), ki smo ju določili v naši raziskovalni skupini. Možna razloga za manjše število struktur sta verjetno v nepopolni komplementarnosti in konformacijski gibljivosti kompleksa, ki ovirata eksperimentalno določitev miRNK:mRNK kompleksov z drugimi raziskovalnimi metodami. Poleg določitve 3D strukture RNK kompleksov je bila glavni namen študije tudi primerjava strukturnih lastnosti siRNK:mRNK in miRNK:mRNK kompleksov. Za siRNK:mRNK komplekse je bilo že od prej znano, da imajo standardno A-RNK obliko. Nekomplementarni bazni pari in izbokline, ki so prisotni v miRNK:mRNK kompleksih, pa povzročijo pregib v strukturi. Za cepitev občutljiva vez v mRNK verigi je pri siRNK:mRNK kompleksu tako bolj dostopna katalitičnemu mestu v proteinu argonavt, kot je to v primeru miRNK:mRNK kompleksa. Študirali smo let-7 miRNK tarčno mesto na 3'-UTR lin-41 mRNK. To tarčno mesto spada med 3'-kompenzacijska miRNK tarčna mesta, ki predstavljajo 1% vseh ohranjenih miRNK tarčnih mest pri sesalcih. Kljub zelo majhni pogostosti je to tarčno mesto zanimivo zaradi svojih strukturnih

elementov, kot sta nesimetrična notranja zanka in adeninska izboklina. let-7 miRNK je bila ena od prvih odkritih miRNK in so na začetku predvidevali, da imajo vse miRNK podoben način vezave na tarčno mRNK. Rezultati naše študije so pomembni za boljše razumevanje vloge miRNK strukture pri utišanju genov in odkrivanju novih tarčnih mest na mRNK. Tako NMR struktura LCS1co posredno pomaga k lažjemu razumevanju strukture let-7 miRNK in lin-41 mRNK znotraj RISC kompleksa (ang. RISC: RNA-induced silencing complex). Struktura LCS1co kaže na to, da nukleinska baza adeninske izbokline A30 ni vključena v nalaganje baz znotraj dvojne vijačnice, ampak je obrnjena v mali žleb in tako predstavlja vezavno mesto za proteine. Tudi nesimetrična notranja zanka je zanimiva iz strukturnega vidika, saj takšna zanka prej še ni bila študirana. Vsi ti strukturni detajli pomagajo tudi pri razvoju programov za napovedovanje miRNK struktur in tarčnih mest na mRNK.

ANG

siRNA and miRNA are two classes of non-coding RNAs, which are involved at the post-transcriptional gene regulation by binding to the target mRNA. The structural features of their complexes with mRNA play the main role in the expression and evolution of protein-coding genes. miRNA binds to the target mRNA with the imperfect complementarity and mostly represses translation, while siRNA binds to the target mRNA with perfect complementarity and cleaves the bond in the middle of the mRNA. Numerous studies on the functional characterization of the miRNAs are done, but only few information is available on the structural features of the miRNA:mRNA complex. To our knowledge, only our two NMR structures of the miRNA:mRNA complexes (LCS1co and LCS2co) has been reported so far. The possible reasons are probably in the partial complementarity and high conformational flexibility of the complexes, which hurdle the experimental determination of miRNA:mRNA structures with the other research methods.

Beside the determination of the 3D structure of RNA complexes the main aim of our project was also the comparison of the structural features of siRNA:mRNA and miRNA:mRNA complexes. For siRNA:mRNA complexes was know from before that they have a standard A-RNA form.

Mismatched base pairs and bulges, which are present in miRNA:mRNA complexes, induce a kinked structure. It seems that in the siRNA:mRNA structure, the scissile phosphate of the mRNA strand is more accessible to the catalytic site in the Argonaute protein as compared to the miRNA:mRNA structures.

We studied let-7 miRNA target site within 3'-UTR lin-41 mRNA. It belongs to 3'-compensatory miRNA target sites, which represent 1% of all conserved target sites in mammals. Despite the very low frequency this target site is interesting due to the structural features, such as asymmetric internal loop and bulge. let-7 was one of the first discovered miRNAs and at the beginning it was understood that all miRNAs have this type of target site within mRNAs. Results of this study are important for the better understanding of the role of miRNA structure in gene silencing and for the discovery of new target sites on mRNA. Thus the NMR structure of LCS1co indirectly allows better understanding of the structures of miRNA and mRNA inside the RNA-induced silencing complex (RISC). The structure of LCS1co shows that the nucleobase of adenine bulge A30 does not stack into the helix, but points into the minor groove and could represent a protein binding site. Also asymmetric internal loop is interesting from structural point of view, because this kind of loop was not studied before. All this structural details are useful at the development of the software, which is used for the prediction of miRNA structures and target sites in mRNAs.

## 10.2. Pomen za razvoj Slovenije<sup>11</sup>

SLO

Projekt smo izvajali na Nacionalnem centru za NMR spektroskopijo visoke ločljivosti na Kemijskem inštitutu Ljubljana. S projektom smo prispevali k širitvi in poglobitvi znanja znanstveno-raziskovalne skupnosti v Sloveniji na področju več-dimenzionalne NMR spektroskopije. Pri projektu je poleg vodje projekta sodeloval tudi diplomant, ki je pripravil diplomu o dvoverižnih let-7 miRNK:lin-41 mRNK kompleksih. Pri delu smo uporabili moderne metod za preučevanje strukture in dinamike RNK, kot so nuklearna magnetna resonanca, ultravijolična in vidna absorpcijska spektroskopija ter gelska elektroforeza. miRNK:mRNK kompleksi so zaradi notranjih zank in izboklin konformacijsko gibljivi in tako zanimivi za študij z NMR spektroskopijo v tekočem. Trenutno sta poznani samo dve NMR strukturi miRNK:mRNK kompleksa (LCS1co in LCS2co) in obe smo določili v naši raziskovalni skupini. Ti rezultati nas uvrščajo med vodilne evropske znanstvenike na področju raziskovanja



RNK strukture z NMR spektroskopijo v tekočem. Prav tako prikazujejo slovenskim raziskovalcem in podjetjem, kaj vse se da lahko študirati v NMR centru. Zanimane raziskovalce spodbujajo, da pričnejo sodelovati s centrom še posebej na raziskovalnih področjih, ki preiskujejo povezavo med strukturo in aktivnostjo večjih RNK.

miRNK:mRNK kompleksi bi bili lahko zanimivi za slovenska farmacevtska podjetja pri razvoju, pripravi in izboljšanju novih zdravil, ki bodo temeljila na delovanju miRNK. V svetu se je povečalo število biotehnoških firm za preučevanje bolezni zaradi miRNK in ta trend bi lahko prišel tudi v Slovenijo.

ANG

The project was carried out at Slovenian NMR centre at National Institute of Chemistry Ljubljana. The project allowed us to disseminate and expand the knowledge of the Slovenian scientific community in the field of multidimensional NMR spectroscopy. The project leader collaborated with a B.Sc. student, who prepared a thesis about the mutants of double stranded let-7 miRNA:lin-41 mRNA complexes. Modern methods for RNA structural determination and dynamics were used, such as nuclear magnetic resonance, ultraviolet and visible absorption spectroscopy, and gel electrophoresis.

miRNA:mRNA complexes are conformational flexible due to internal loops and bulges, and are thus interesting to study by solution NMR. Currently only two NMR structures of miRNA:mRNA complexes are known (LCS1co and LCS2co) and both are determined by our research group. These results place us to the top European scientists studying RNA structure with NMR spectroscopy in solution. Likewise, the results show, what can be studied in Slovenian NMR centre and encourage Slovenian researchers and companies that they start collaborations with the centre, in particular on the research fields, which cover investigation of relationships between the structure and activity of larger RNAs.

miRNA:mRNA complexes could be interesting for Slovenian pharmaceutical companies for the development, preparation and improvement of new drugs, which will base on the function of miRNA. There is an increase in the number of biotech firms in the world, which were founded to treat diseases caused by miRNAs and this trend could also come to Slovenia.

### 11. 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		
<b>F.01</b>	<b>Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.02</b>	<b>Pridobitev novih znanstvenih spoznanj</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.03</b>	<b>Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.04</b>	<b>Dvig tehnološke ravni</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

<b>F.05</b>	<b>Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.06</b>	<b>Razvoj novega izdelka</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.07</b>	<b>Izboljšanje obstoječega izdelka</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.08</b>	<b>Razvoj in izdelava prototipa</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.09</b>	<b>Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.10</b>	<b>Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.11</b>	<b>Razvoj nove storitve</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.12</b>	<b>Izboljšanje obstoječe storitve</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.13</b>	<b>Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.14</b>	<b>Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.15</b>	<b>Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.16</b>	<b>Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.17</b>	<b>Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.18</b>	<b>Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.19</b>	<b>Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.20</b>	<b>Ustanovitev novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.21</b>	<b>Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.22</b>	<b>Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.23</b>	<b>Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

<b>F.24</b>	<b>Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.25</b>	<b>Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.26</b>	<b>Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.27</b>	<b>Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.28</b>	<b>Priprava/organizacija razstave</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.29</b>	<b>Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.30</b>	<b>Strokovna ocena stanja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.31</b>	<b>Razvoj standardov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.32</b>	<b>Mednarodni patent</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.33</b>	<b>Patent v Sloveniji</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

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

**Komentar**

**12.Samo za aplikativne projekte!**

Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
<b>G.01</b>	<b>Razvoj visoko-šolskega izobraževanja</b>					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.02</b>	<b>Gospodarski razvoj</b>					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.03</b>	<b>Tehnološki razvoj</b>					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

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

**Komentar**

--

**13.Pomen raziskovanja za sofinancerje<sup>12</sup>**

	Sofinancer			
1.	Naziv			
	Naslov			
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR	
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%	
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja	Šifra		
		1.		
		2.		
		3.		
		4.		
		5.		
	Komentar			
	Ocena			

## C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

### Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba  
raziskovalne organizacije:*

in

*vodja raziskovalnega projekta:*

Kemijski inštitut

Mirko Cevc

### ŽIG

Kraj in datum: 

Ljubljana	12.3.2012
-----------	-----------

### Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2012/26

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

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

<sup>3</sup> Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

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

<sup>5</sup> 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](#)

<sup>6</sup> Znanstveni in družbeno-ekonomski dosežki v programu in projektu so lahko enaki, saj se projektna vsebina praviloma nanaša na širšo problematiko raziskovalnega programa, zato pričakujemo, da bo večina izjemnih dosežkov raziskovalnih programov dokumentirana tudi med izjemnimi dosežki različnih raziskovalnih projektov.

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

<sup>7</sup> Znanstveni in družbeno-ekonomski dosežki v programu in projektu so lahko enaki, saj se projektna vsebina praviloma nanaša na širšo problematiko raziskovalnega programa, zato pričakujemo, da bo večina izjemnih dosežkov raziskovalnih programov dokumentirana tudi med izjemnimi dosežki različnih raziskovalnih projektov.

Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Družbenoekonomski 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 ekonomsko relevantnega 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. v preteklem letu vodja meni, da je izjemen dosežek to, da sta se dva mlajša sodelavca zaposlila v gospodarstvu na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali

## Zaključno poročilo o rezultatih raziskovalnega projekta - 2012

ustanovila svoje podjetje, ki je rezultat prejšnjega dela ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

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

<sup>9</sup> 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](#)

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

<sup>11</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

<sup>12</sup> Rubrike izpolnite / prepisite skladno z obrazcem "izjava sofinancerja" <http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>, ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2012 v1.00  
6B-D9-4A-EC-C7-8E-31-96-35-32-CA-45-68-FC-92-A1-23-DA-3A-4E