

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2012/33

## ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

|                                                |                                     |
|------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Šifra projekta</b>                          | Z1-2314                             |
| <b>Naslov projekta</b>                         | Močno nabit MD-2 kot antagonist LPS |
| <b>Vodja projekta</b>                          | 25437 Mateja Zorko                  |
| <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<br>1.09 Farmacija    |
| <b>Družbeno-ekonomski cilj</b>                 | 07. Zdravje                         |

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

|                   |                              |
|-------------------|------------------------------|
| <b>Šifra</b>      | 1.07                         |
| <b>- Veda</b>     | 1 Naravoslovne vede          |
| <b>- Področje</b> | 1.07 Druge naravoslovne vede |

### B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

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

SLO

Za pripravo močno nabitega MD2, smo uporabili sintetični gen, katerega smo dizajnirali za ekspresijo v bakterijskih celicah z uporabo preferenčnega koda za bakterije. Sintetični gen smo vstavili v plazmidni vektor ter rekombinanten plazmid vnesli v bakterije ali celične kulture. Spremenjeni protein smo pripravili v bakterijskih celicah, za izolacijo pa se je izkazala za najučinkovitejša metoda RP-HPLC. Po izolaciji z RP-HPLC smo protein dializirali proti

ustreznemu pufru, ter na ta način iz proteina odstranili organsko topilo. Po dializi smo protein skoncentrirali do ustrezne koncentracije ter določili njegove karakteristike.

Zaradi sodelovanja s prof. Stephen Evans iz Univerze v Victoriji smo začeli tudi s kristalografskimi študijami, kajti še vedno ni znano kakšne strukturne posledice ima vezava agonista na MD2.

Pripravi smo štiri različne oblike MD2. V prvem primeru smo v protein vnesli 12, v drugem 8, tretjem 4 in zadnjem primeru 2 dodatne pozitivne naboje. Izkazalo se je, da je protein, ki ima vnesenih 12 dodatnih nabojev izgubi svojo biološko funkcijo, medtem ko ostale tri oblike MD2 biološko funkcijo ohranijo. Biološko aktivnost MD-2 smo določali z merjenjem sposobnosti topnega super nabitega MD-2, da veže endotoksin in aktivira sesalske celice. V omenjenem primeru smo uporabili človeške celične linije HEK293, ki jih gojimo v našem laboratoriju. V celice smo s pomočjo lipofekcije vnesli plazmide za TLR4 ter reporterske plazmide za spremljanje aktivacije signalne poti, ki vodi do translokacije NF- $\kappa$ B v jedro. Po dodatku endotoksina in super nabitega MD-2 smo s pomočjo luciferaznega reporterskega sistema merili aktivacijo luciferaznega gena. Močno nabit MD2 še vedno aktivira človeške celične linije po dodatku endotoksina.

S pomočjo DLS smo preverili če se spremenjen MD-2 v raztopini res nahaja v monomerni obliki. Vse močno nabite oblike MD2 smo s pomočjo DLS dobili v monomerni obliki, pri višjih koncentracijah proteinov pa se nahaja protein tudi v dimeri obliki. Z SDS PAGE v in brez prisotnosti reducenta smo analizirali vpliv spremembe naboja MD-2 na tvorbo disulfidno povezanih dimerov oz. oligomerov. Ugotovili smo da sprememba nabojev vpliva na tvorbo disulfidno povezanih dimerov. Vezavo endotoksina na MD2 smo določali tudi z ITC, da bi na ta način dobili informacije ali naboj vpliva na število molekul LPS, ki se vežejo na molekulo MD2. Na MD2, ki ima 8 dodatnih pozitivnih nabojev se veže endotoksin, zaradi povečanje pozitivnega naboja na enoto površine, tudi na površino in ne samo na vezavno mesto, medtem ko pri oblikah z nižjem vnosom pozitivnega naboja se tega izognemo in se veže endotoksin v vezavno mesto. Vse spremenjene oblike MD2 so stabilne in biološko aktivne tudi po daljšem času, medtem ko divji tip izgubi biološko aktivnost pri sobni temperaturi že po 24h urah. Močno nabit MD2 je tudi odporen na agregacijo.

ANG

For preparing supercharged MD-2 the synthetic gene with preferential coda for bacteria was used for expressing in bacteria. Algorithm Gene Optimizer will be used for design the gene, which eliminate repetitions, optimizing composition GC over the gene, prevent the formation of stable structures of RNA duplex and formation undesired sites for cleaving of RNA (for inserting into eukaryotic cells). Synthetic gene was inserted into plasmid vector and recombinant plasmid inserted into bacteria or eukaryotic cells depends on later manner of application. The modified protein was first prepared in the bacteria cells and for isolation we included PR-HPLC. After isolation with RP-HPLC the protein were dialyzed against water and the protein was been concentrated and analyzed its characteristics. Due to collaboration with prof. Stephen Evans at the University of Victoria, Canada, we started with crystallography for determined the structural consequences of the agonist binding to MD-2.

We prepared four forms of the MD-2. We introduced into MD-2 12, 8, 4 and 2 additional charged residues. The protein with 12 additional positive charges loses its biological activity; meanwhile the other three forms maintain biological activity. The biological activity was determined by adding soluble recombinant super charged MD-2 to bind LPS and activated eukaryotic cells. We used the human cell line HEK293, which are cultivated in our laboratory. The cells will insert through lipofection plasmids for TLR4 and reporter plasmids to monitor the activation of signaling pathway, leading to translocation of NF- $\kappa$ B into the nucleus. After the addition endotoxin and supercharged MD-2 were measured through luciferase reporting system an activation of luciferase gene.

Through exclusion chromatography and dynamic light scattering (DLS) we analyzed if the modified MD-2 is really in monomeric form in the solution. All super charged forms are monomeric. With SDS-PAGE with or without presence of reducing agent we analyzed the influence of charges in the modified MD-2 on the formation of dimers or oligomers linked by disulphide bonds. We found out that additional charges in proteins had effect on the formation of dimers or oligomers. We also used the ITC (isothermal titration

calorimetry) for study binding of LPS on supercharged MD-2. With ITC we determined that 8 additional charges in protein cause that LPS binds also on the surface of MD-2 and not only on binding size. All supercharged forms of the protein are stable and biological active also over in long period; meanwhile soluble hMD-2 loses its biological activity at room temperature in 24 hours. Supercharged MD-2 is also resistant to the aggregation.

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

Bili smo uspešni pri realizaciji zastavljenih ciljev izvedbe projekta. Tako smo v prvem letu poteka projekta uspešno pripravili dve mutanti močno nabitega MD2 v naslednjem letu pa še dve. Za vse mutante smo uporabili in dizajnirali sintetični gen, dizajniranega za ekspresijo v bakterijskih celicah, gen pa smo uspešno prenesli tudi v vektor za ekspresijo v sesalskih celicah. Močno nabit MD2 smo pripravili v bakterijah ter razvili tudi uspešno metodo za čiščenje. Očiščenemu rekombinantnemu močno nabitemu MD2 smo tudi testirali biološke aktivnosti, analizirali smo tudi biokemijske in strukturne lastnosti. Vezavo endotoksina na MD2 smo določali z ITC metodo ter spremljanje lastne fluorescence po vezavi endotoksina na MD2. V drugem letu izvedbe projekta smo preverili tudi izolacijo oblik MD2 iz inkluzijskih teles na ionski kolono. Tudi ta metoda se je izkazala za uspešno. Lotili smo se tudi priprave izotopsko označenega MD2 za NMR študije ter kristalografskih študij proteina MD2 v kompleksih z njegovimi agonisti. V pripravi je publikacija v kateri bodo predstavljeni rezultati podoktorskega projekta.

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

Že iz 4. točke je razvidno, da je realizacija projekta potekala po planu in ni bilo večjih težav pri izvedbi. Tako smo v prvem letu pripravili, dizajnirali in izolirali močno nabit MD-2. Sledila je analiza biokemijskih in strukturnih lastnosti izoliranih proteinov ter določali vezavo endotoksina na MD-2. Realizacija projekta je potekala po planu in ni bilo sprememb v izvedbi.

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

Ni bilo sprememb programa raziskovalnega projekta.

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

| Znanstveni dosežek |           |         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|--------------------|-----------|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.                 | COBISS ID | 4469018 | Vir: vpis v poročilo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|                    | Naslov    | SLO     | Priprava rekombinantnih antimikrobnih peptidov v bakterijah                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                    |           | ANG     | Production of recombinant antimicrobial peptides in bacteria                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                    | Opis      | SLO     | Velike količine antimikrobnih peptidov so potrebne za raziskave bioloških aktivnosti in kliničnih testiranj le teh, zato je nujno najti alternativno tradicionalni kemični sintezi antimikrobnih peptidov. Produkcija antimikrobnih peptidov v prokariotskih sistemih se je izkazala za uspešen pristop, vendar je potrebna uporaba fuzijskega proteina zaradi toksičnosti peptida za gostiteljevo celico ter proteolitske razgradnje samega peptida. Predstavili smo princip cepitve v zredčenih kislinah, ki deluje selektivno, ni toksično ter v kratkem času zagotovi ustrezno količino antimikrobnega peptida. |
|                    |           |         | Large quantities of antimicrobial peptides are required for investigations and clinical trials, therefore suitable production method is necessary. Production of recombinant antimicrobial peptides in prokaryotic systems is                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

|  |              |      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--|--------------|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |              | ANG  | potentially limited due to their toxicity to host cells and susceptibility to proteolytic degradation, which can be avoided using fusion protein approach. Chemical reagents for cleaving peptide bond between antimicrobial peptides and fusion proteins such as diluted acid and cyanogen bromide are selective and provide large antimicrobial peptides in short time. |
|  | Objavljeno v |      | ZORKO, Mateja, JERALA, Roman. Production of recombinant antimicrobial peptides in bacteria. V: GIULIANI, Andrea (ur.), RINALDI, Andrea C. (ur.). Antimicrobial peptides : methods and protocols, (Methods in molecular biology, 618). New York: Humana Press, cop. 2010, str. 6176. [COBISS.SIID 4469018]                                                                 |
|  | Tipologija   | 1.16 | Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

### 8. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine<sup>7</sup>

|    |                                      |     |  |
|----|--------------------------------------|-----|--|
|    | Družbenoekonomsko relevantni dosežki |     |  |
| 1. | COBISS ID                            |     |  |
|    | Naslov                               | SLO |  |
|    |                                      | ANG |  |
|    | Opis                                 | SLO |  |
|    |                                      | ANG |  |
|    | Šifra                                |     |  |
|    | Objavljeno v                         |     |  |
|    | Tipologija                           |     |  |

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

|  |
|--|
|  |
|--|

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

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

SLO

Naraven imunski odziv omogoči človeškemu telesu, da prepozna in se hitro odzove na bakterijsko okužbo. Endotoksin je eden izmed najmočnejših stimulatorjev imunskega odziva, ki vzpodbudi celično aktivacijo preko direktne vezave na protein MD2, ki je vezan na izvencelično domeno TLR4. Aktivacija tega kompleksa vodi v vnetni odziv s sproščanjem proinflammatory citokinov in drugih vnetnih posrednikov. Poleg odziva na bakterijske infekcije je TLR4 udeležen tudi v kroničnih vnetnih boleznih kot so ateroskleroza idr. Rezultati projekta bodo tako prispevali k boljšemu razumevanju molekulskega mehanizma naravnega imunskega odziva. Pričakujemo, da bodo nova spoznanja o stabilnosti proteina MD2 prispevala k boljšemu razumevanju prepoznavanja antagonistov in agonistov na MD2. Rezultati projekta pa bodo prispevala tudi k razvoju novih agonistov in antagonistov, ki bi bila lahko uporabna kot antiinflammatory zdravila za zdravljenje bolezni kot so ateroskleroza ter različne avtoimune bolezni. Rezultati projekta bodo preko konferenc in publikacij predstavljeni širši publiki.

ANG

Innate immune response to allow the human body to recognize and respond rapidly to bacterial infection. Endotoxin triggers a strong immune responses by activating monocytes and

macrophages that produce several inflammatory cytokines and other inflammatory mediators. MD2, which is associated to the extracellular domain of TLR4, binds LPS and trigger cell activation. In addition to responding to bacterial infection TLR4 is involved in chronic inflammatory diseases such as atherosclerosis and others.

We expect that new insights in MD2 protein stability will contribute to better understanding of MD2 agonist/antagonist recognition. This knowledge will provide the possibility to engineer better agonist and antagonist, which can be used as antiinflammatory drugs for treatment of disease such as atherosclerosis, autoimmune disease, etc.

The innovative technologies and methodologies will be disseminated via presentation on conferences and publications.

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

SLO

Podoktorski projekt predstavlja inovativne metode in tehnologije, ki bodo uporabne za znanstvene raziskave kot tudi industrijo. Preko predavanj, laične in znanstvene literature bodo izsledki raziskave predstavljeni tako strokovni kot laični publiki.

Izsledki bodo predstavljeni v mednarodnih revijah s faktorji vpliva ter prispevkih na mednarodnih konferencah, ter na ta način promovirali Slovenijo v svetu.

ANG

The project represents an innovative methods and technologies that will be useful for scientific research as well as industry. Through lectures, laic and expert publication the knowledge will be available to experts as well as laic public.

Results will be presented in international journals with impact factors, and contributions to international conferences the promotion of Slovenian country will be achieve.

## 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 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 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 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 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 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 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 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 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 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>Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških</b>      |                                                   |

|             |                                                                        |                                                   |
|-------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>F.24</b> | <b>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"/>                              |



|             |                             |                                                   |
|-------------|-----------------------------|---------------------------------------------------|
|             |                             | <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> |  | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |  |
| <b>G.06.</b> | <b>Varovanje okolja in trajnostni razvoj</b>                                       |  | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |  |
| <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>                           |  | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |  |
| <b>G.09.</b> | Drugo:                                                                             |  | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |  |

**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

Mateja Zorko

**ŽIG**

Kraj in datum:

Ljubljana

14.3.2012

### Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2012/33

<sup>1</sup> Zaradi spremembe klasifikacije je potrebno v poročilu opredeliti raziskovalno področje po novi klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science). Prevajalna 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  
72-C4-8F-EE-DB-24-DC-F7-A6-12-58-B4-A4-AC-A1-7F-38-08-59-88