

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2013/231



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1.Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J1-2252
Naslov projekta	Mehanizmi zvitja in agregacije proteinov
Vodja projekta	9899 Franc Avbelj
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	4173
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	05.2009 - 04.2012
Nosilna raziskovalna organizacija	104 Kemijski inštitut
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	1 NARAVOSLOVJE 1.04 Kemija 1.04.02 Strukturna kemija
Družbeno-ekonomski cilj	13.01 Naravoslovne vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)

2.Raziskovalno področje po šifrantu FOS¹

Šifra	1.04
- Veda	1 Naravoslovne vede
- Področje	1.04 Kemija

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3.Povzetek raziskovalnega projekta²

SLO

Proteini, ki so linearni polimeri zgrajeni iz L- α -amino kislin, igrajo ključno vlogo v skoraj vseh bioloških procesih. Vse različne funkcije proteinov so določene z njihovo tridimenzionalno strukturo. Vsak protein se zvije v eno ali več značilnih konformacij. Tridimenzionalne strukture teh konformacij so odvisne od zaporedja aminokislinskih

ostankov in pogojev v okolju. Trenutno ni mogoče napovedati kako se bo zvil določen protein (problem zvitja proteinov).

Rešitev problema zvitja proteinov je izjemnega pomena, ker bo to omogočilo napoved tridimenzionalnih struktur in posledično funkcij vseh proteinov, ki so zakodirani v človeškem in drugih genomih. Takšen dosežek bi izjemno pospešil razvoj kemije, biologije in medicine. Razumevanje zvitja proteinov na molekularnem nivoju bo imelo pomembno vlogo tudi pri odkrivanju vzrokov za nastanek mnogih bolezni, nekaterih zelo hudih npr.: Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen, diabetes tipa II, cistična fibroza, prionske bolezni, itd. Vzrok za nastanek teh bolezni je napačno zvitje proteinov v alternativne tridimenzionalne oblike ('misfolding'), ki niso funkcionalne. Mehanizmi procesa nativnega in napačnega zvitja proteinov niso poznani.

V tem projektu bomo s pomočjo teoretičnih in eksperimentalnih metod študirali mehanizme procesov nativnega in napačnega zvitja proteinov. Razvili bomo povsem novo potencialno polje za študij struktur in dinamike proteinov. Vpliv nekovalentnih interakcij bomo v potencialno polje vključili na osnovi eksperimentalnih podatkov majhnih peptidov v vodnih raztopinah, ki so na razpolago od nedavnega. Še posebej pomembni so strukturni podatki dipeptidov, ki smo jih izmerili v našem laboratoriju. Novo potencialno polje bomo testirali in dopolnjevali glede na naše eksperimentalne podatke modelnih peptidov.

Novo potencialno polje bomo uporabili za preizkušanje različnih mehanizmov zvitja v nativno stanje in napačnega zvitja majhnih modelnih peptidov in proteinov, še posebej peptidov, ki so vključeni v nastanek amiloidnih bolezni. Splošna značilnost amiloidnih bolezni je dolga časovna doba brez kliničnih znakov bolezni, kar je posledica energijskih barier pri tvorbi napačno zvitih konformacij. V našem laboratoriju smo postavili novo hipotezo v kateri delno nastali β -trakovi, ki se nahajajo že v denaturanem stanju, tvorijo nukleacijska jedra za nastanek amiloidnih vlaken. To hipotezo bomo preverili s teoretičnimi in eksperimentalnimi metodami. Eksperimentalne podatke o strukturah denaturiranih, nativnih in okvarjenih stanj bomo izmerili z NMR in vibracijsko spektroskopijo. Za izračun energetike različnih mehanizmov nativnega in napačnega zvitja peptidov in proteinov bomo uporabili simulacije Monte Carlo. Velik delež znanih amiloidnih proteinov spada med nestrukturirane proteine ('intrinsically unstructured'); zato bodo naše raziskave delno nastalih β -plasti in drugih elementov strukture v molekulah usmerjene tudi na nestrukturirane peptide in proteine.

ANG

Proteins, which are linear [polymers](#) built from L- α -[amino acids](#), play crucial roles in almost every biological process. All diverse functions of proteins are determined by their three-dimensional structures. Each protein folds into one or numerous characteristic conformations. Three-dimensional structures of these states vary depending on sequences of amino acid residues and on a particular environment. At present it is not possible to predict how a protein will fold (the protein folding problem).

Solving the protein folding problem is extremely important, because it will make possible predictions of three-dimensional structures and hence functions of all proteins encoded in the human and other genomes. Such achievement would enormously accelerate the development of chemistry, biology, and medicine. Detailed knowledge of the molecular events in protein folding is also important for understanding causes of hundreds of diseases including some of the most dreadful illnesses like: Alzheimer's and Parkinson's diseases, type II diabetes, cystic fibrosis, transmissible prion diseases, etc. The reason for these illnesses is misfolding of proteins into alternative three-dimensional forms. Mechanisms of protein misfolding as well as folding processes are unclear.

In this project we will study the mechanisms of the protein folding and misfolding

processes using theoretical and experimental methods. We propose to develop a new potential force field for studying structure and dynamics of proteins. Strengths of the non-covalent interactions implemented in the force field will be obtained by fitting the experimental data of small peptides in aqueous solutions, which have only recently become available. Particularly important are the structural data of dipeptides that have been measured in our laboratory.

The new force field will be used to test various mechanisms of folding and misfolding of small model peptides and proteins, particularly of peptides involved in amyloid diseases. A general feature of amyloid disorders is the prolonged period before clinical manifestations appears. This is caused by energetic barriers for formation of misfolded state. Recently we have proposed a new hypothesis that aggregation into amyloid fibrils is seeded by the partially formed β -strands that exist in the denatured state. We will test this hypothesis using experimental and theoretical method. The experimental data of structures of denatured, folded, and misfolded states will be obtained by NMR and vibrational spectroscopy. We will use theoretical methods (Monte Carlo simulations) to calculate the energetics of various mechanisms of folding and misfolding processes. A significant portion of known amyloidogenic proteins belong to the class of natively unfolded proteins; therefore our research will be also focused on intrinsically unstructured peptides and proteins in search of partially formed β -strands and other elements of structure in these molecules.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu³

Glavni cilj raziskovalnega projekta je razviti povsem novo potencialno polje za študij mehanizmov zvitja proteinov. Razvoj novega potencialnega polja za študij struktur proteinov je izjemnega pomena za razvoj znanosti, ker trenutno uveljavljena potencialna polja za proteine (Amber, Charmm, Discover, Gromos) ne zmorejo pojasniti eksperimentalnih podatkov majhnih peptidov. Slabost do sedaj uveljavljenih potencialnih polj je, da so bila pridobljena na osnovi eksperimentalnih podatkov majhnih modelnih molekul (npr. amidi), ki se precej razlikujejo od peptidov. Novo potencialno polje je grajeno na osnovi eksperimentalnih podatkov dipeptidov, majhnih in tudi večjih peptidov v vodnih raztopinah in velikega števila rentgenskih struktur proteinov z visoko ločljivostjo. Za doseg glavnega cilja projekta smo eksperimentalno določali strukture majhnih peptidov, določali vpliv kosolventov na strukture peptidov in drugih biomolekul, razvijali potencialno polje sil, dograjevali algoritem za simulacije zvitja peptidov in proteinov, študirali tvorbo amiloidnih vlaken in pripravljali (sintetizirali) nestrukturiran proteina Ecm11 za primerjavo eksperimentalnih in teoretičnih rezultatov.

Strukture dipeptidov v vodni raztopini

Obstaja majhno število eksperimentalnih študij struktur dipeptidov in oligo-peptidov v vodni raztopini. V preteklosti se je namreč predpostavljalo, da so majhni peptidi v vodnih raztopinah popolnoma brez strukture. V našem laboratoriju smo pokazali, da imajo celo dipeptidi strukturne značilnosti, ki so zelo podobne tistim v proteinih (npr.: konformacijske preference). Dipeptidi so aminokisline blokirane z acetilno in N-metilno skupino. Z vibracijsko spektroskopijo smo določili strukture oz. porazdelitev treh glavnih konformacij dipeptidov v vodi in jih objavili v zelo ugledni znanstveni reviji *Proc. Natl. USA Sci.* Za določevanje relativnih populacij treh najpomembnejših konformacij (P_{II} , β in α_R), smo analizirali amidno III območje v infrardečih in ramanskih spektrih. Izkazalo se je, da sta v 18 dipeptidih prevladujoči populaciji P_{II} in β konformacija. Delež konformacije α_R je v vseh dipeptidih presenetljivo majhen ($< 10\%$). Porazdelitev deležev posameznih konformacij je zelo odvisna od vrste stranske verige.

V vabljenem komentarju članka revije ameriške akademije je Jan Hermans zapisal, da so objavljeni rezultati pomemben dosežek (*Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 3095-3096, 2011). Jan Hermans spada med najbolj pomembne raziskovalce teoretične in strukturne kemije. S preprosto teoretsko analizo dipeptidov je Ramachandran pred 50 leti pokazal, da bi morali aminokislinski ostanki v proteinih zavzemati v glavnem tri konformacije: β , P_{II} in α_R . Pokazalo se je, da je imel Ramachandran prav, velika večina aminokislinskih ostankov v eksperimentalno določenih strukturah proteinov se nahaja v teh konformacijah. Na ključno vprašanje: »Ali se tudi dipeptidi v vodni raztopini obnašajo v skladu s teoretskimi napovedmi Ramachandrana?« pa kar 50 let ni bilo odgovora. Z eksperimentalno študijo dipeptidov smo končno odgovorili na to vprašanje in pokazali, da se dipeptidi res obnašajo podobno kot aminokislinski ostanki v proteinih. Poznavanje deležev treh glavnih konformacij dipeptidov je pomembno za razvoj novih potencialnih polj za simulacije proteinov. Najbolj popularna potencialna polja sil dajejo namreč zelo različne rezultate celo za tako majhen sistem kot je alanin dipeptid v vodi. Podatki objavljeni v članku bodo ključni za razumevanje fizikalnega ozadja konformacijskih preferenc aminokislinskih ostankov v proteinih. Poznavanje struktur neurejenih stanj polipeptidov je ključno za razumevanje zvijta proteinov in opis nativno neurejenih proteinov.

Vpliv sotopljencev in kovinskih ionov na strukturo blokiranih dipeptidov, glutationa in karboanhidraze.

Raziskovali smo vpliv sotopljencev in kovinskih ionov na strukturo blokiranih dipeptidov, glutationa in karboanhidraze. Glutation je najbolj razširjena majhna molekula s tiolno skupino v bioloških celicah z veliko afiniteto vezave s kovinskimi ioni. Z analizo infrardečih in ramanskih spektrov ter ^{13}C in ^1H NMR spektrov smo pokazali, da sta v kompleksacijo s Cd^{2+} ioni udeleženi le dve skupini; tiolna in glutamilna karboksilna skupina. Za natančno asignacijo vibracijskih spektrov glutationa in koordinacije s kovinskimi ioni smo uporabili serijo modelnih spojin (D-penicilamin, dipeptide glicina, cisteina in glutaminske kisline ter merkaptosukcinsko kislino in N-acetil-L-cistein). Koncentracijsko odvisne meritve s Cd^{2+} ioni pokažejo, da je optimalno stehiometrijsko razmerje z glutationom 1:1. Analiza $^3\text{J}(\text{H}_\alpha, \text{H}_\text{N})$ sklopitvenih konstant in konformacijsko odvisnih trakov v amidnem III območju v vibracijskih spektrih pokaže, da se z vezavo Cd^{2+} ionov spremeni tudi konformacija glutationskega skeleta. Kompleksacija inducira prehod iz pretežno β strukture v P_{II} konformacijo (članek ACS v tisku). Vezavo Cd^{2+} ionov na molekulo glutationa v fizioloških pogojih smo raziskovali tudi z uporabo DFT računov. Izkaže se, da vezava kadmija na SH skupino povzroči njeno deprotonacijo z migracijo protona na sosednjo glicilno karboksilno skupino. Pokažemo, da je energijsko najugodnejša tvorba kompleksa preko tiolne skupine in karboksilne skupine. Računi se popolnoma ujemajo z interpretacijo IR in NMR meritev (*Journal of inorganic biochemistry*)

Razvoj potencialnega polja

V prve verzije novega potencialnega polja smo vključili le tiste nevezne interakcije, ki so potrebne za dobro ujemanje izračunanih in eksperimentalnih podatkov. Število parametrov v novem potencialnem polju je veliko manjše od števila parametrov v uveljavljenih potencialnih poljih. Novo potencialno polje vsebuje naslednje nevezne interakcije: elektrostatske interakcije, elektrostatsko prosto energijo solvatacije, intrinzično torzijo stranskih skupin in van der Waalove interakcije. Za razvoj novega potenciala smo uporabili strukturne podatke 19 dipeptidov v vodi in velikega števila nativnih proteinov v kristalih. Rezultati kažejo na dobro ujemanje med eksperimentalnimi in izračunanimi strukturnimi parametri dipeptidov v vodnih raztopinah. Ugotovili smo, da vključitev intrinzičnih torzij glavne verige ne izboljša ujemanja med eksperimentalnimi in izračunanimi strukturnimi parametri. Za Van der Waalove interakcije smo uporabili dve vrsti potenciala: Exp-6 in Lennard-Jonesov potencial. Parametre za ta dva potenciala smo dobili s prilagajanjem potencialov na potenciale srednje sile, ki smo jih izračunali iz velikega števila rentgenskih struktur proteinov z visoko ločljivostjo. Najboljše rezultate smo dobili z uporabo eksponentnega van der Waalovega potenciala. To je potencial, za katerega je znano da veliko bolje opiše van der Waalove interakcije kot Lennard-Jonesov potencial, vendar pa se

zaradi kompleksnosti zelo redko uporablja pri simulacijah proteinov. Preostale parametre smo dobili s prilagajanjem eksperimentalnih in teoretsko izračunanih struktur peptidov (članek v pripravi).

Razvoj algoritma za simulacije zvitja proteinov

Z znanimi strukturami dipeptidov lahko parametriziramo interakcije med sosednjimi aminokislinami v zaporedju. Za parametrizacijo interakcij med bolj oddaljenimi aminokislinskimi ostanki potrebuje eksperimentalne strukturne podatke večjih peptidov. Za te molekule je pomembno pravilno opisati vodikove vezi in hidrofobne interakcije. Za parametrizacijo vodikovih vezi smo uporabili eksperimentalne podatke o ravnotežje med α -vijačnico in denaturirano obliko ($\gg$ random coil $\ll$) različno dolgih peptidov, ki imajo predvsem aminokislinski ostanek alanin ($\gg$ helix-coil transition $\ll$). Največji problem algoritma je dokaj počasno konvergenca simulacij. Pojavil pa se je še dodaten problem. Mutacijski eksperimenti, pri katerih se amidna skupina zamenja z estersko, so pokazali, da so jakosti vodikovih vezi zelo odvisne od okolice. Kvantitativne razlage za tako obnašanje vodikovih vezi ni bilo. Pokazali smo, da model elektrostatskega senčenja v celoti pojasni odvisnost jakosti vodikovih vezi od okolice. Tvorba vodikovih vezi je tako med glavnimi gonilnimi silami pri zvitju proteinov, kar so že pred 70 leti predlagali Pauling in sodelavci (članek v pripravi).

Tvorba amiloidnih vlaken

Z uporabo infrardeče spektroskopije smo študirali porazdelitev konformacij poli-L- lizina (PLL) v vodi. Pri določevanju konformacij smo izrabili strukturno odvisnost amidnih III trakov. Pri nizkih pH vrednostih najdemo PLL molekulo pretežno v P_{II} in β -konformacijah. Višanje pH vrednosti povzroči pojavljanje α -vijačnic, ki se z višanjem temperature pretvorijo v β -ravnine. Analizo amidnih III nihanj smo uporabili tudi pri določevanju strukture PLL v TFE, DMSO in etilen glikolu. PLL molekule raztopljene v TFE je pri sobni temperaturi najdemo pretežno v α -vijačnici. Z višanjem temperature se večja delež P_{II} konformacije. DMSO predstavlja topilo, kjer PLL najdemo izključno v konformaciji α -vijačnice. Podobno uniformno strukturo PLL molekul, le da tokrat v P_{II} konformaciji (88%) najdemo v etilen glikolu, kar dokazuje, da ta struktura ni omejena le na vodne medije in nabite stranske verige (Biophys. Chemistry, v tisku).

Z uporabo diferenčne infrardeče spektroskopije smo raziskovali strukturne spremembe PLL molekule pri fibrilaciji. Pokažemo, da je pri strukturni transformaciji med α -vijačnico in β -ravninami P_{II} konformacija vmesno stanje. Na kinetiko fibrilacije smo vplivali z dodajanjem soli, kjer kot promotor nastopa NaClO_4 oz. s spreminjanjem okolice PLL molekul z dodajanjem DPPA+DPPC vesikov, ki fibrilacijo zavirajo. NaClO_4 promovira nastanek α -vijačnic, hkrati pa zniža temperature faznega prehoda (α -vijačnica v β -ravnino) pri pH vrednosti 11.6. α -vijačnico PLL molekul stabilizira tudi prisotnost DPPA+DPPC vesikov.

Zvitje nestrukturiranega proteina Ecm11

Za proučevanje struktur nestrukturiranih proteinov, njihovih interakcij z urejenimi globularnimi proteini, spreminjanje njihove strukture in njihovo vlogo pri tvorbi amiloidnih vlaken, smo izbrali kvasni protein Ecm11. Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* je enocelični evkariont in je zaradi enostavne manipulacije ter možnosti prepoznavanja funkcijske podobnosti med kvasnimi in človeškimi proteini, izjemno uporaben modelni organizem v celični biologiji. Protein Ecm11 spada v skupino nativno nestrukturiranih proteinov ('intrinsically disordered proteins'). Nestrukturirani proteini so relativno nova in še slabo poznana skupina proteinov, ki v fizioloških pogojih ne tvorijo

stabilne 3-D strukture in so biološko aktivni v nestrukturirani obliki. Protein Ecm11 je sestavljen iz 302 AK. Z uporabo algoritmov, ki napovedujejo nestrukturirana področja smo ugotovili, da je kar 2/3 proteina Ecm11 nestrukturiranega. Veliko nestrukturirano področje (približno 200 AK) se nahaja na N-koncu proteina Ecm11 in predstavlja eno najdaljših nestrukturiranih regij v proteinih. C-konec Ecm11 je predvidoma sestavljen iz α -vijačnic. Z dosedanjimi raziskavami smo pokazali, da se nestrukturiran N-konec Ecm11 veže s proteinom SUMO. Protein SUMO se kovalentno veže na mnoge proteine v celici in s tem kontrolira njihovo delovanje (vpliva na njihovo stabilnost, proteinske interakcije in lokalizacijo). Poškodbe regulacije sistema SUMO pri človeku povzročijo tumorigenezo, spremenjen vnetni odziv in nevrodegenerativne bolezni. SUMO ima urejeno globularno strukturo, zelo podobno ubikvitinu. Kompleks Ecm11-SUMO smo zato izbrali kot idealni sistem za proučevanje spreminjanja strukture nestrukturiranih proteinov ob vezavi na globularne proteine.

Iz kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* smo z ustreznimi začetnimi oligonukleotidi pomnožili gen *ECM11*. Gen smo vgradili v ekspresijski plazmid pET-24a in dobili konstrukt pET24a-ECM11_{His6}. Kljub optimizaciji pogojev ekspresije je bila ekspresija proteina Ecm11 zelo nizka. Odločili smo se za spreminjanje gena *ECM11* tako, da smo njegovo sekvenco prilagodili izražanju bakterije *E.coli*. Spremenjen gen smo ponovno klonirali v plazmid pET24a. Dosegli smo uspešno izražanje rekombinantnega Ecm11. V raztopini izoliranega proteina so nastale dimere, trimere in tetramere.

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

Razvili smo prve verzije novega potencialnega polja za študij mehanizmov zvitja proteinov. Novo potencialno polje zelo dobro napoveduje strukture 19 dipeptidov in ravnotežje med α_R -vijačnico in denaturiranimi stanji za serijo peptidov. Novo potencialno polje bomo v prihodnjem obdobju nadgrajevali z uporabo eksperimentalnih podatkov novih in načrtovanih peptidov to take mere, da bo pravilno napovedoval strukture vedno bolj kompleksnih peptidov. Pričakujemo, da bomo potencialno polje v kratkem razvili do te mere, da bo zmožel pravilno napovedati strukture manjših proteinov.

Rešili smo tudi enega ključnih problemov pri simulacijah zvitja proteinov, to je problem zelo počasne konvergence simulacij Monte Carlo. Proteini imajo na voljo zelo velik konformacijski prostor. Nekaj deset milijonov korakov je potrebno za doseganje konvergence pri naključnem vzorčenju vseh torzijskega prostostnih stopenj peptida z 20 aminokislinskimi ostanki (npr.: ala₂₀). Ker v vsakem koraku računamo solvacijsko prosto energijo, so simulacije izredno počasne. Z metodami pametnega vzorčenja ('smart darting, parallel tempering, replica exchange') smo skrajšali dolžine simulacij na nekaj sto tisoč korakov. Pri tem se je najbolj izkazala metoda 'smart darting' pri kateri uporabimo tri osnovne konformacije: α_R , P_{II} in α_L , s katerimi pokrijemo celoten konformacijski prostor glavne verige peptidov.

Rezultati so pokazali, da je izražanje Ecm11 pri vseh preizkušanih pogojih zelo nizko. S prilagoditvijo sekvence *ECM11* izražanju bakterije *E.coli*, nam je uspelo doseči močno izražanje rekombinantnega Ecm11. S pomočjo CD spektroskopije smo ugotovili, da se struktura rekombinantnega proteina Ecm11 spreminja pri različnih pH vrednostih. Največ nestrukturirane oblike je imel rekombinantni protein pri pH4. Pri nadaljnjem delu se bomo posvetili oblikovanju protokola za izražanje problematičnih nestrukturiranih proteinov in ga optimizirali glede na specifične lastnosti našega proteina. Na podoben način bomo sintetizirali kvasni protein SUMO (Smt3) s His-repkom. Optimizirali bomo pogoje pri katerih se izraža največ proteina. Pri optimizaciji sinteze kvasnega proteina SUMO pričakujemo manj problemov kot pri Ecm11, ker so bile nekatere skupine že uspešne pri

pripravi tega proteina. Oba proteina bomo označili z izotopoma C^{13} in N^{15} . Strukture obeh proteinov in njuno interakcijo v vodni raztopini bomo študirali z NMR spektroskopijo.

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

Sprememb programa raziskovalnega projekta ni bilo. Sestava projektne skupine se ni spreminjala.

7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	4103962	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Potrditev neveljavnosti principa aditivnosti peptidnih skupin pri analizi termodinamike zvitja proteinov.
		ANG	Origin of the change in solvation enthalpy of the peptide group when neighboring peptide groups are added
	Opis	SLO	Nedavno kalorimetrično izmerjene solvacijske entalpije nekaterih dipeptidnih analogov so potrdile našo hipotezo, da princip aditivnosti ne velja za interakcije peptidnih skupin z vodo. Glavna posledica neveljavnosti principa aditivnosti je, da je vrednost solvacijske entalpije peptidne vezi, ki je najpomembnejši parameter pri analizi termodinamike zvitja proteinov, popolnoma napačna. Kot testni sistem smo uporabili eksperimentalno določene hitrosti izmenjave vodika na peptidnih vezeh. Računi pokažejo, da je napaka predvsem posledica zanemarjanja vpliva sosednjih NHCO skupin.
		ANG	Recent calorimetric measurements of the solvation enthalpies of some dipeptide analogs confirm our earlier prediction that the principle of group additivity is not valid for the interaction of the peptide group with water. We examine the consequences for understanding the properties of peptide solvation. A major consequence is that the current value of the peptide solvation enthalpy, which is a basic parameter in analyzing the energetics of protein folding, is seriously wrong. Electrostatic calculations of solvation free energies provide an estimate of the size and nature of the error.
	Objavljeno v		
	National Academy of Sciences; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 2009; Vol. 106, no. 9; str. 3137-3141; Impact Factor: 9.432; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.33; A": 1; A': 1; WoS: RO; Avtorji / Authors: Avbelj Franc, Baldwin Robert Lesh		
	Tipologija		
	1.01 Izvirni znanstveni članek		
2.	COBISS ID	4611098	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Populacije treh glavnih konformacij dipeptidov 19 osnovnih aminokislin
		ANG	Populations of the three major backbone conformations in 19 amino acid dipeptides
	Opis	SLO	Dipeptidi so aminokisline blokirane z acetilno in N-metilno skupino. Aminokisline v dipeptidih imajo podobne strukturne lastnosti kot jih imajo aminokislinski ostanki v proteinih, zato je poznavanje struktur dipeptidov ključno za razumevanje struktur proteinov. Določili smo strukture dipeptidov 19 osnovnih aminokislin v vodni raztopini. S spektroskopskimi metodami smo dokazali obstoj treh konformacij dipeptidov v vodi: PII, β , in α R. Delež konformacije α R je v vseh dipeptidih presenetljivo majhen (< 10%). Porazdelitev deležev posameznih konformacij je zelo odvisna od vrste stranske verige.
			Dipeptides are amino acids blocked with an acetyl and an N-methyl group. The amino acids in dipeptides have structural properties similar to amino

		ANG	acid residues in proteins; this is why structures of dipeptides are important for understanding structures of proteins. We have determined the dipeptide structures of 19 basic amino acids in a water solution. Using spectroscopic methods, we have demonstrated the presence of three conformations of dipeptides in water: the PII, β , and the α R. The proportion of the α R conformation in all dipeptides is surprisingly low ($< 10\%$).
	Objavljeno v		National Academy of Sciences; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 2011; Vol. 108, no. 5; str. 1794-1798; Impact Factor: 9.681; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.271; A'': 1; A': 1; WoS: RO; Avtorji / Authors: Grdadolnik Jože, Mohaček-Grošev Vlasta, Baldwin Robert Lesh, Avbelj Franc
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
3.	COBISS ID	4121626	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Nov vpogled v načrtovanje protibakterijskih učinkovin osnovan na strukturno-dinamičnih študijah kompleksov novih ligandov z MurD ligaz.
		ANG	NMR and molecular dynamics study of the binding mode of naphthalene-N-sulfonyl-D-glutamic acid derivatives: novel MurD ligase inhibitors
	Opis	SLO	S kombinacijo NMR študij in računalniških simulacij molekularne dinamike novih ligand-MurD kompleksov smo dobili vpogled v dinamične lastnosti kompleksov, ki lahko bistveno nadgradi racionalno načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin osnovano le na študijah rigidne kristalne strukture. Prepoznali smo konformacijsko fleksibilnost novih ligandov v vezavnem mestu in določili njen vpliv na posamezne ligand-receptor interakcije. Ugotovili smo, da je stopnja fleksibilnosti povezana s specifičnimi elementi molekularne strukture ligandov in z razlikami v njihovi inhibitorni aktivnosti.
		ANG	The NMR studies and molecular dynamics simulations of ligand-MurD complexes have been performed to obtain the insight into dynamic properties of novel complexes, which can significantly upgrade the drug design studies that are based solely on the static crystal structures. The results revealed the differing degrees of ligand flexibility and their effect on particular ligand-enzyme contacts. The degree of conformational flexibility depends on the specificity of the ligand molecular structure and can be related to the differences in their inhibitory activities.
	Objavljeno v		American Chemical Society; Journal of medicinal chemistry; 2009; Vol. 52, no. 9; str. 2899-2908; Impact Factor: 4.802; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.396; A'': 1; WoS: DX; Avtorji / Authors: Simčič Mihael, Hodošek Milan, Humljan Jan, Kristan Katja, Urleb Uroš, Kocjan Darko, Golič Grdadolnik Simona
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
4.	COBISS ID	5044250	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Vpliv solvatacije in elektrostatike na urejenost lokalne strukture v denaturiranih peptidih in proteinih
		ANG	Solvation and electrostatics as determinants of local structural order in unfolded peptides and proteins
	Opis	SLO	Eden najbolj zahtevnih problemov v kemiji je proces zvitja proteinov. Predpostavlja se, da lokalno urejene strukture tvorijo zamečke, ki vodijo peptid iz denaturiranega stanja v nativno stanje. Za razumevanje zvitja proteinov je zato pomembno poznati naravo lokalno urejenih struktur v denaturiranih stanjih proteinov. Lokalno urejene strukture se kažejo v obliki konformacijskih preferenc aminokislinskih ostankov, efekta najbližjega soseda, kooperativne formacije večjih struktur in hidrofobnih skupkov. Te oblike se ločijo med sabo v nivoju kooperativnosti oz. številu udeleženih aminokislinskih ostankov. Fizikalne razlage lokalno urejenih struktur v

				denaturiranih proteinih se med seboj zelo razlikujejo. V tem preglednem članku pokažemo, da elektrostatsko senčenje, ki smo ga vpeljali v našem laboratoriju, kvantitativno razloži pojav urejenih struktur v denaturiranih proteinih.
			ANG	One of the most difficult problems in chemistry is how a protein molecule folds from an unfolded state to its native conformation. It has been suggested that the local structural order (i.e., residual structure) may guide a polypeptide chain from the denatured to the native state. To understand the process of protein folding and misfolding, it is important to understand the nature of the local structural order in unfolded peptides and proteins. The local structural order in unfolded proteins is demonstrated by the following four indicators: the backbone conformational preferences, the nearest-neighbor effect, the cooperative formation of larger local structures, and the hydrophobic clusters. These indicators differ in the level of cooperativity, that is, the number of adjacent residues involved. The physical background of the local structural order in unfolded polypeptides is a highly controversial issue. In this review we show that solvation and electrostatic interactions can quantitatively explain the behavior of unfolded peptides and proteins.
			Objavljeno v	J. Wiley & Sons; Protein and peptide folding, misfolding, and non-folding; 2012; str. 131-149; Avtorji / Authors: Avbelj Franc
			Tipologija	1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji
			COBISS ID	5157914 Vir: COBISS.SI
5.	Naslov	SLO	Vezava kadmijevega dikationa na glutation omogoča deprotonacijo cisteinske SH skupine	
		ANG	Binding of cadmium dication to glutathione facilitates cysteine SH deprotonation	
	Opis	SLO	Z uporabo DFT računov smo raziskovali naravo vezave med fiziološko obliko glutationa (GSH) in kadmijevega dikationa (Cd ²⁺) v vodni raztopini. Glutathion je zelo pogost tripeptid, ki opravlja številne pomembne fiziološke naloge pri celičnem metabolizmu. Rezultati računov so razkrili, da se s kompleksacijo deprotonira cisteinska SH skupina s prenosom protona na sosednjo karboksilno skupino glicina. Tako se tvori energijsko zelo ugodna Cd ²⁺ ...S koordinacija, ki zniža pKa (SH) cisteina za cca 13 pKa enot. Prenos protona nevtralizira karboksilni ion glicina, hkrati pa se tvori OH...S vodikova vez, kar zmanjša verjetnost za koordinacijo med karboksilno skupino glicina in Cd ²⁺ ionov. Teoretični rezultati se popolnoma ujemajo z interpretacijo vibracijskih in NMR eksperimentov.	
		ANG	We employed DFT calculations to investigate the nature of the binding between the physiological form of glutathione (GSH) and cadmium dication (Cd ²⁺) in aqueous solution. Glutathione is a ubiquitous tripeptide, γ-L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine, which plays a number of vital roles in cell metabolism. The results revealed that, upon complexation, the cysteine –SH group gets deprotonated by the proton transfer to the neighbouring glycine carboxylic group, facilitated by the formation of favourable Cd ²⁺ ...S– coordination, which lowers cysteine pKa(SH) value by around 13 pKa units. This produces adduct in which GSH interacts with Cd ²⁺ predominantly through the cysteine thiolate anion and the ionized glutamine carboxylic group. The transferring proton reverts glycine –COO– group to its neutral trans –COOH form, which gets stabilized by OH...S– hydrogen bonding. We found our results to be fully consistent with vibrational and NMR spectroscopic measurements.	
	Objavljeno v		Elsevier.; Journal of inorganic biochemistry; 2013; Vol. 119; str. 90-94; Impact Factor: 3.354; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.341; A': 1; WoS: CQ, EC; Avtorji / Authors: Glušič Martina, Stare	

	Jernej, Grdadolnik Jože, Vianello Robert
Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek

8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁷

	Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID	4501018	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Strukture 19 osnovnih aminokislin v vodi
		ANG	Backbone structures of 19 dipeptides in aqueous solution: from dipeptide to protein structure
	Opis	SLO	Aminokisline v dipeptidih imajo podobne strukturne lastnosti kot jih imajo aminokislinski ostanki v proteinih, zato je poznavanje struktur dipeptidov ključno za razumevanje struktur proteinov. Določili smo strukture dipeptidov 19 osnovnih aminokislin v vodni raztopini. S spektroskopskimi metodami smo dokazali obstoj treh konformacij dipeptidov v vodi: PII, β , in α R. Delež konformacije α R je v vseh dipeptidih presenetljivo majhen (< 10%). Porazdelitev deležev posameznih konformacij je zelo odvisna od vrste stranske verige.
		ANG	Dipeptides are amino acids blocked with an acetyl and an N-methyl group. The amino acids in dipeptides have structural properties similar to amino acid residues in proteins; this is why structures of dipeptides are important for understanding structures of proteins. We have determined the dipeptide structures of 19 basic amino acids in a water solution. Using spectroscopic methods, we have demonstrated the presence of three conformations of dipeptides in water: the PII, β , and the α R. The proportion of the α R conformation in all dipeptides is surprisingly low (< 10%).
	Šifra	B.04	Vabljen predavanje
	Objavljeno v	CCTM 2010, XXI, Ohrid, Republic of Macedonia, 23-26.9. 2010	
	Tipologija	3.16 Vabljen predavanje na konferenci brez natisa	
2.	COBISS ID	4174618	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	NMR-podprto načrtovanje zdravilnih učinkovin
		ANG	NMR-assisted discovery of novel DNA gyrase and muramyl ligase inhibitors
	Opis	SLO	Predstavili smo zmogljivosti in omejitve NMR metod pri raziskavah interakcij ligand-receptor. Lastnosti in uporabnost NMR metod, ki temeljijo na opazovanju signalov liganda ali proteina, smo razložili s prikazom dveh naših NMR študij novih inhibitorjev atraktivnih proteinskih tarč za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Posebej smo poudarili prednost NMR spektroskopije pri študijah dinamičnih procesov v molekularnih kompleksih. Pokazali smo vpliv konformacijske dinamike na stabilnost ligand-receptor interakcij in na inhibitorno aktivnost novih ligandov.
		ANG	The capabilities and limitations of NMR methods for the investigation of ligand-receptor interactions were presented. Two of our case-studies of NMR-assisted discovery of novel inhibitors of attractive antibacterial targets were used to explain the application of ligand-based and protein-based NMR methods. Special attention was given to the advantage of NMR spectroscopy in the studies of dynamic processes in molecular complexes. The influence of conformational dynamics on the stability of ligand-receptor interactions and on the inhibitory activities of novel ligands was presented.
	Šifra	B.04	Vabljen predavanje
	Objavljeno v	Hungarian Chemical Society; Hungarian-Austrian-Czech-German-Greek-Italian-Polish-Slovak-Slovenian Joint meeting on medicinal chemistry [also]	

		JMMC 2009; 2009; Str. 56; Avtorji / Authors: Golič Grdadolnik Simona
	Tipologija	1.10 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (vabljen predavanje)
3.	COBISS ID	4815130 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Študije vezave ligandov z metodami NMR spektroskopije ANG Ligand binding studies using NMR spectroscopy
	Opis	SLO Predstavili smo zmogljivosti in omejitve NMR metod za preiskavo interakcij ligand-protein. Uporabili smo primere naših študij NMR podprtega odkrivanja novih inhibitorjev pomembnih protimikrobnih tarč in razložili uporabnost NMR metod, ki temeljijo na opazovanju signalov liganda in NMR metod, ki temeljijo na opazovanju signalov proteina. Posebno pozornost smo namenili prednosti NMR spektroskopije prid študiju dinamičnih procesov v molekularnih kompleksih. Predstavili smo vpliv konformacijske dinamike na stabilnost interakcij ligand-receptor. ANG The capabilities and limitations of NMR methods for the investigation of ligand-protein interactions were presented. Our case-studies of NMR-assisted discovery of novel inhibitors of attractive antimicrobial targets were used to explain the application of ligand-based and protein-based NMR methods. Special attention was given to the advantage of NMR spectroscopy for the studies of dynamic processes in molecular complexes. The influence of conformational dynamics on the stability of ligand-receptor interactions and on the inhibitory activities of novel ligands was presented.
	Šifra	B.04 Vabljen predavanje
	Objavljeno v	s.n.]; Trends in drug research; 2011; Str. 33-34; Avtorji / Authors: Golič Grdadolnik Simona
	Tipologija	1.10 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (vabljen predavanje)
4.	COBISS ID	762743 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Vpliv sotopljenec in kovinskih ionov na strukturo blokiranih dipeptidov, glutationa in karboanhidraze ANG The influence of cosolvents and metal ions on the structure of blocked dipeptides, glutathione and carbonic anhydrase
	Opis	SLO Analizirali smo vpliv sotopljenec (sečnina in trimetilamin-N-oksidi (TMAO)) na porazdelitev preferenčnih konformacij (PII, αR in β) v izbranih dipeptidih in glutationu (GSH; γ-Glu-Cys-Gly). Vpliv sotopljenec na konformacijo peptidnega skeleta v območju amida III in velikost $3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ sklopitvene konstante dipeptidov je zanemarljiv. Opazimo pa visoko povečanje $3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ sklopitvene konstante Ala in Val dipeptida v nepolarnem topilu tetraklorometan v primerjavi z vodnimi raztopinami sotopljenec. Populacija β konformacije Ala in Gly dipeptida v območju amida III se poveča. Molekule TMAO preorientirajo strukturo vode v hidratacijskem plašču GSH, da lahko le-ta ohrani obstoječo konformacijo (indirekten vpliv). Vpliv na spremembo konformacije GSH opazimo v primeru sečnine. GSH je eden glavnih virov neproteinskega žvepla za kompleksacijo Cd^{2+}. Deprotonirana karboksilna skupina COO^- glutaminske kisline in tiolna skupina S- cisteina stabilizirata $\text{Cd}^{2+} \cdots \text{GSH}$ kompleks s interakcijo s pozitivno nabitim Cd^{2+}. Vezava Cd^{2+} na stransko verigo cisteina pri nevtralnem pH vrednosti je posledica prenosa protona s tiolne SH skupine na deprotonirano karboksilno skupino COO^- glicina. Nastanek kompleksa $\text{Cd}^{2+} \cdots \text{GSH}$ vpliva na konformacijo peptidnega skeleta GSH v območju amida III. Ob povečanju deleža Cd^{2+} v raztopini GSH se je populacija β konformacije zmanjšala na račun povečanja populacije PII. Izolirali smo tudi kloroplastno obliko karboanhidraze iz listov modrikastega mošnjaka (<i>T. caerulescens</i> J. & C. Presl). Z določanjem zaporedja izolirane

		karboanhidraze iz modrikastega mošnjaka tretiranega s Cd oz. Zn in poravnavo aminokislinskih ostankov s predstavniki različnih razredov karboanhidraz smo testirali možnost zamenjave kovine (Zn s Cd) v aktivnem mestu encima. Analiza je pokazala na popolno ohranitev ligandov Zn atoma in ostalih aminokislinskih ostankov, ki sodelujejo pri vezavi substrata v aktivnem mestu encima. Prisotnost Zn v izolirani karboanhidrazi iz modrikastega mošnjaka tretiranega s Cd smo dodatno potrdili z tehniko laserske ablacije in induktivno sklopljene plazme z masno spektrometrijo.
	ANG	We studied the influence of cosolvents (urea and trimethylamine-N-oxide (TMAO)) on the distribution of the conformations (PII, αR in β) of the dipeptides and of the glutathione (GSH; γ-Glu-Cys-Gly). The impact of cosolvents on the conformations of the peptide backbone in the amide III region and value of $3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ coupling constants of the dipeptides are negligible. We notice a large increase in the value of $3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$ coupling constant of Ala in Val dipeptides in nonpolar solvent tetrachloromethane in comparison with water solution of cosolvents. The population of the β conformation of the Ala in Gly dipeptides in the amide III region increase. Molecules of TMAO have an influence on the structure of water in the peptide hydration layer of GSH and thus stabilizing the conformation of GSH (indirect impact). The impact on the conformation of GSH was observed in the case of urea. The GSH represents one of the main sources of nonprotein sulfur for complexation Cd^{2+}. The deprotonated carboxylic group COO^- of Glu and the Cys thiol S- group stabilize the $\text{Cd}^{2+} \cdots \text{GSH}$ complex through interaction with positively charged Cd^{2+}. Cd^{2+} binding to the side chain of the Cys at the neutral pH values is due to the proton transfer from the thiol SH group to the deprotonated carboxylic group COO^- of Gly. The formation of the complex $\text{Cd}^{2+} \cdots \text{GSH}$ affect the conformation of the peptide backbone of GSH. In a solution of GSH with the increase in the fraction of Cd^{2+}, the population of the β conformation decreased with an increase in the population of the PII. We also isolated chloroplastic form of the carbonic anhydrase from the leaves of <i>T. caerulescens</i> J. & C. Presl. With the »de novo« sequencing of carbonic anhydrase isolated from <i>T. caerulescens</i> treated with Cd or Zn and alignment of amino acid residues with representatives of different classes of carbonic anhydrase, we tested the possibility of changing metals (Zn with Cd) in the active site of the enzyme. The analysis revealed the complete conservation of the Zn ligand and other amino acid residues involved in substrate binding in the active site of the enzyme. The presence of Zn in the isolated carbonic anhydrase of <i>T. caerulescens</i> treated with Cd was additionally confirmed by laser ablation and inductively coupled plasma mass spectrometry.
Šifra		D.09 Mentorstvo doktorandom
Objavljeno v		[M. Glušič]; 2012; XVI, 125 f., [6] f. pril.; Avtorji / Authors: Glušič Martina
Tipologija		2.08 Doktorska disertacija
5.	COBISS ID	
	Vir: vpis v poročilo	
Naslov	SLO	Mentorstvo doktorandom
	ANG	Mentor for graduate students
Opis	SLO	Simona Golič Grdadolnik in Jože Grdadaolnik sta mentorja štirim doktorandom
	ANG	Simona Golič Grdadolnik and Jože Grdadaolnik are mentors of four graduate students
Šifra		D.10 Pedagoško delo
Objavljeno v		Programi raziskovalnega dela so objavljeni na univerzi
Tipologija		2.25 Druge monografije in druga zaključena dela

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

Končno rešene strukture osnovnih gradnikov proteinov v vodni raztopini

S preprosto teoretsko analizo dipeptidov je Ramachandran pred 50 leti pokazal, da bi morali aminokislinski ostanki v proteinih zavzemati v glavnem štiri konformacije: β , PII, αR in αL . Naši rezultati so pokazali (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2011, vol. 108, no. 5, str. 1794-1798.), da je imel Ramachandran prav, velika večina aminokislinskih ostankov v eksperimentalno določenih strukturah proteinov se nahaja v teh konformacijah. V vabljenem komentarju članka revije ameriške akademije je Jan Hermans zapisal ("The amino acid dipeptide: small but still influential after 50 years", Proc Natl. Acad. Sci. USA, 108, 3095-3096, 2011), da so avtorji po 50 letih določili strukture dipeptidov. Po mnenju Jana Hermansa so objavljeni rezultati pomemben dosežek. Poznavanje struktur neurejenih stanj polipeptidov je ključno za razumevanje zvitja proteinov in opis nativno neurejenih proteinov. Poznavanje deležev treh glavnih konformacij dipeptidov je pomembno za razvoj novih potencialnih polj za simulacije proteinov.

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

10.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

V zadnjih letih so bili odkriti genomi številnih organizmov, od virusov do človeka. Iz zaporedja baznih parov DNA so bili s pomočjo genske kode odkriti številni novi proteini, ki so temeljni gradniki žive celice in imajo pomembno sporočilno vlogo. Žal pa za večino teh proteinov ne poznamo tridimenzionalnih struktur in bioloških funkcij. Za razumevanje delovanja celic je potrebno poznati tridimenzionalne strukture in funkcije vseh proteinov, ki so zapisani v DNA. Določanje struktur proteinov z eksperimenti je izjemno drag in dolgotrajen postopek. Veliko hitreje in ceneje bi bilo napovedovati tridimenzionalne strukture proteinov s pomočjo računalniških algoritmov. Iz znanih tridimenzionalnih struktur je pogosto mogoče sklepati na biološke funkcije in druge lastnosti proteinov. Pričakuje se, da bo imela rešitev problema zvitja proteinov izjemno močan vpliv na razvoj različnih področij znanosti, predvsem kemije, biologije in medicine. Za rešitev problema zvitja proteinov je ključno, da razvijemo tako potencialno polje, ki bo pravilno opisalo strukturo in dinamiko proteinov. To je glavni cilj tega raziskovalnega projekta. Razumevanje zvitja proteinov na molekularnem nivoju bo imelo pomembno vlogo pri odkrivanju vzrokov za bolezni, ki nastanejo zaradi napačnega zvitja določenih proteinov ter pri odkrivanju bolj uspešnih metod zdravljenja le teh (Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen, nekatere vrste raka, diabetes tipa II, cistična fibroza, prionske bolezni ter mnoge druge bolezni). Uspešne metode za napovedovanje tridimenzionalnih struktur proteinov bodo postale nepogrešljivo orodje za modeliranje kompleksov ligand-receptor, encim-substrat in drugih proteinskih interakcij, kar bo omogočilo načrtovanje novih učinkovin.

ANG

The Human Genome project has been successfully completed and the genomes of many other organisms have been published recently. The main goal of these efforts is to find the sequences of all proteins encoded in the genomes of living organisms. Numerous new proteins have been uncovered using the genetic code; however, their structures and biological functions are generally unknown. To understand how the cell works it is crucial that three-dimensional structures and biological functions of all proteins encoded in DNA sequence are known. Determinations of three-dimensional structures and functions of proteins is extremely difficult and time consuming task. It would be much faster and less expensive if we could predict three-dimensional structures of proteins with computers. Biological function and other properties of proteins can then be deduced from their three-dimensional structures. It is expected that solution of the protein folding problem would have a huge impact on science, particularly on chemistry, biology and medicine. For solving the protein folding problem it is crucial to develop the potential force field, which will correctly describe structure and dynamics of proteins. This is the main goal of this research project. Detailed knowledge of the molecular events in protein folding is important for understanding causes of hundreds of diseases (Alzheimer's and Parkinson's diseases, some types of cancer, type II diabetes, cystic fibrosis, transmissible prion

diseases). The structure prediction algorithms will be used also for modeling bio-molecular systems like ligand-receptor and enzyme-substrate complexes and other protein interactions, which will assist drug-design.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Uspešne teoretske metode za napovedovanje tridimenzionalnih struktur proteinov bodo izjemno pospešile razvoj znanosti in vplivale na razvoj novih aplikacij v Sloveniji (predvsem v farmacevtskih firmah Lek in Krka). Teoretska rešitev problema zvitja proteinov bo imela največji vpliv na načrtovanje novih zdravil. Načrtovanje novih učinkovin je pogosto neuspešno zato, ker je za mnoge biomolekularne sisteme model delovanja učinkovin "ključ - ključavnica" preveč poenostavljen. Ob vezavi liganda na receptor se namreč poleg konformacije liganda pogosto spremeni tudi konformacija proteinskega receptorja. Z rešitvijo problema zvitja proteinov bomo lahko take spremembe napovedali z računalnikom, kar bo pocenilo razvoj in s tem proizvodnjo novih zdravil.

Rezultate raziskav biomolekul objavljamo v uglednih mednarodnih revijah. Na osnovi teh rezultatov smo pridobili industrijske projekte. Za farmacevtsko firmo Lek in Krka izvajamo vrsto projektov, kjer sodelujemo pri raziskavah novih biološko aktivnih učinkovin, kar zahteva uporabo najsodobnejših metodologij in instrumentalne opreme. Z razvojem in uporabo NMR in vibracijske spektroskopije rešujemo konkretne probleme s katerimi se pri proizvodnji in analizi produktov soočajo v farmacevtskih družbah Lek in Krka, kar ima direkten vpliv na razvojne projekte naših partnerjev iz farmacevtske industrije.

Projekt je izviren in temelji na naših dosedanjih raziskavah. Rezultati raziskav so bili objavljeni v najuglednejših mednarodnih znanstvenih revijah (tudi Proc. Natl. Acad. Sci. USA), kar dokazuje, da so naše raziskave v svetovnem vrhu. S temi rezultati promoviramo Slovenijo v svetovnih znanstvenih krogih.

Obvladovanje najzahtevnejših metod biomolekularnega modeliranja, NMR in vibracijske spektroskopije je pomembno za utrjevanje nacionalne identitete. Z razvojem novih metod pa prispevamo k povečanju znanja na tistih področjih znanosti, ki so trenutno ključna za tehnološki napredek v svetu in s tem tudi v Sloveniji (proizvodnja novih zdravil, medicina, biotehnologija).

Pri raziskavah sodelujejo mladi raziskovalci. Mladi raziskovalci pridobivajo znanje, ki je potrebno za izpeljavo temeljnih raziskovalnih projektov kot tudi razvojnih projektov v farmacevtski industriji.

Naša skupina sodeluje pri mednarodnih eksperimentih CASP, kjer z raziskovalci s vsega sveta postopno izboljšujemo metode napovedovanja tridimenzionalnih struktur proteinov.

ANG

Theoretical solution of the protein-folding problem will accelerate the development of science and technology in Slovenia (particularly in pharmaceutical firms Lek and Krka). The largest improvement is expected in drug-design. Current drug-design techniques are largely unsuccessful due to the approximations imposed by the simple "lock and key" model of drug action. The interactions of receptor and ligand molecules are often accompanied by changes in their conformations. Such changes will be predicted by the new algorithms, which would considerably decrease the cost of developing new drugs.

Results of our research are published in highly ranked scientific journals. Based on these credentials we obtained industrial projects. We have performed a series of projects for the pharmaceutical companies Lek in which we study new drugs using modern methodology. Developing and using new methods of NMR and vibrational spectroscopy we solve actual problems encountered by the pharmaceutical companies Lek and Krka in production and analysis of their drugs, which directly influences the development project of our partners from the pharmaceutical industry.

The proposed project is original and is based on our previously published research. The results

of this research have been published in the scientific journals with very high impact factors (including Proc. Natl. Acad. Sci. USA), which shows that our research is of high quality. With these results we promote Slovenian science.

Implementation of modern methods of bio-molecular modeling, NMR and vibrational spectroscopy is in our national interest. The development of these new techniques is crucial for technological progress of some branches in Slovenia.

Young researchers participate in the research. Young researchers are acquiring important knowledge required for realization of basic research project as well as development project in pharmaceutical industry.

We cooperate in the international experiments CASP. Formally, this is the competition among research groups in predicting protein three-dimensional structures; however, the main goal of these experiments is to improve general knowledge in this field of research.

11. Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!
Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

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

	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE

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

F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

Komentar

12.Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!
Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☐	☐	☐	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☐	☐	☐	☐	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☐	☐	☐	☐	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☐	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	☐	☐	☐	☐	
G.02.07.	Večji delež izvoza	☐	☐	☐	☐	
G.02.08.	Povečanje dobička	☐	☐	☐	☐	
G.02.09.	Nova delovna mesta	☐	☐	☐	☐	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	☐	☐	☐	☐	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	☐	☐	☐	☐	

G.02.12.	Drugo:		☐	☐	☐	☐	
G.03	Tehnološki razvoj						
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti		☐	☐	☐	☐	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti		☐	☐	☐	☐	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij		☐	☐	☐	☐	
G.03.04.	Drugo:		☐	☐	☐	☐	
G.04	Družbeni razvoj						
G.04.01	Dvig kvalitete življenja		☐	☐	☐	☐	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja		☐	☐	☐	☐	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave		☐	☐	☐	☐	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti		☐	☐	☐	☐	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe		☐	☐	☐	☐	
G.04.06.	Drugo:		☐	☐	☐	☐	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete		☐	☐	☐	☐	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj		☐	☐	☐	☐	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture						
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura		☐	☐	☐	☐	
G.07.02.	Prometna infrastruktura		☐	☐	☐	☐	
G.07.03.	Energetska infrastruktura		☐	☐	☐	☐	
G.07.04.	Drugo:		☐	☐	☐	☐	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva		☐	☐	☐	☐	
G.09.	Drugo:		☐	☐	☐	☐	

Komentar

--

13. Pomen raziskovanja za sofinancerje¹²

	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			

14. Izjemni dosežek v letu 2012¹³**14.1. Izjemni znanstveni dosežek**

14.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja 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

Franc Avbelj

ŽIG

Kraj in datum:

Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2013/231

¹ Opredelite raziskovalno področje po 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](#)

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

³ 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, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

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

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

⁶ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. 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](#)

⁷ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. 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'.

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

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁸ 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](#)

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

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

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

¹² Rubrike izpolnite / 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](#)

¹³ Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2012 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2013 v1.00
2E-85-AC-62-79-F8-5D-F3-04-D1-BA-63-34-07-34-45-BE-82-2F-7A