

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2014/101



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J1-3602
Naslov projekta	Vloga lizosomov in lizosomskih proteaz v celičnem signaliziranju
Vodja projekta	7561 Boris Turk
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	7560
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	05.2010 - 04.2013
Nosilna raziskovalna organizacija	106 Institut "Jožef Stefan"
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	1 NARAVOSLOVJE 1.05 Biokemija in molekularna biologija
Družbeno-ekonomski cilj	07. Zdravje
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	1 Naravoslovne vede 1.07 Druge naravoslovne vede

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

2. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Številni fiziološki procesi, vključno z razvojem tkiv in homeostazo, zahtevajo ravnotežje med celično smrtjo in celično proliferacijo. Že majhne spremembe v sistemu tako lahko stimulirajo nekontrolirano proliferacijo celic, ki lahko vodi v onkogeno transformacijo. Vedno več je dokazov, da lizosomi in/ali lizosomske proteaze pomembno sodelujejo tako pri celični smrti kot pri proliferaciji celic, medtem ko je njihova ključna vloga pri avtofagiji, ki velja za enega glavnih mehanizmov preživetja rakastih celic, že dolgo znana. Klub temu pa molekularni mehanizmi teh procesov in vloge lizosomov in lizosomskih proteaz še vedno niso razjasnjeni. V tem projektu smo osvetlili mehanizem lizosomske poti apoptoze v različnih modelih. Najpomembnejše rezultate smo dobili s pomočjo lizosomotropnega detergent LeuLeuOMe kot modelne spojine. Z uporabo celic z izbitimi geni za Bax, Bak, Bid, in Bax/Bak smo potrdili, da

permeabilizacija lizosomske membrane vodi do sprožitve mitohondrijske apoptoze in da so tako mitohondriji ključni organeli na tej poti. Poleg tega smo v istem modelu ugotovili s pomočjo celic z izbitimi katepsini, da je kombinacija katepsinov B in L ključna za uspešno sprožitve apoptoze po tej poti. Poleg tega smo s pomočjo proteomike identificirali translokazo 1 ADP/ATP kot še en substrat katepsinov v tem modelu. as another cathepsin substrate in this pathway. V drugih celičnih linijah pa smo identificirali kot substrate katepsinov še več članov družine z membrano povezanih guanilatnih kinaz. Pri oksidativnem stresu pa je poškodba lizosomov vodila do izpusta katepsinov v citosol in cepitve sirtuina1, ki ima pomembno zaščitno vlogo pri s stresom induciranim prezodnjem staranju epitelijskih celic. Nadalje smo ugotovili tudi, da proteoglikan serglicin ščiti membrane granul v mastocitih pred apoptozo sproženo z LeuLeuOMe. V nasprotju s temi opažanji pa imajo katepsini samo postransko vlogo pri apoptozi, sproženi preko receptorjev smrti, kjer so morda vključeni v ojačitev signal, pri čemer pa imajo verjetno vlogo tudi reaktivne kisikove zvrsti. Ugotovili pa smo tudi, da destabilizacija lizosomov z LeuLeuOMe pomembno senzitivira celice na ostale sprožilce apoptoze, kot npr. TNF-alfa, kar ima potencial v terapevtskih aplikacijah.

Ta projekt je tako prinesel vpogled v nekatere mehanizme, preko katerih lizosomi in lizosomske proteaze pomagajo pri celičnem signaliranju, ki vodi do celične smrti. Verjamemo, da bo znanje pridobljeno v okviru tega projekta pomembno prispevalo k našemu razumevanju kompleksnih bioloških procesov in bo obenem pomembno za biomedicinske raziskave usmerjene v razumevanje in razvoj novih strategij zdravljenja raka in ostalih hiperproliferativnih bolezni, ki temeljijo na modulaciji aktivnosti lizosomskih proteaz.

ANG

Many physiological processes, including tissue development and homeostasis, require a balance between cell death and cell proliferation, whereas even slight imbalance of the system may stimulate proliferation of the cell, facilitating its' oncogenic transformation. There is increasing evidence that lysosomes and/or lysosomal proteases are importantly players in both cell death and cell proliferation, in addition to their critical role in autophagy, which is considered a major survival mechanism of cancer cells. However, molecular mechanisms underlying lysosome and lysosomal protease involvement in these processes are still not well understood.

In this project, we have shed light on the mechanism of lysosomal pathways to cell death in several different models. Major insight was obtained primarily using the lysosomotropic detergent LeuLeuOMe as the model compound. Using Bax, Bak, Bid, and Bax/Bak deficient cells we confirmed that lysosomal membrane permeabilization leads to mitochondrial pathway of cell death, indicating that mitochondria are the critical downstream organelles. In addition, using cathepsin deficient cells we identified a combination of cathepsins B and L to be the critical cathepsins in this pathway. Using proteomic approaches we identified translocase 1 ADP/ATP as another cathepsin substrate in this pathway. Using other cell lines we also identified various members of the membrane associated guanylate kinase family as cathepsin substrates in LeuLeuOMe-triggered apoptosis. However, in oxidative stress, cathepsins were also found to cleave sirtuin-1, an important protector against stress-induced premature senescence (SIPS) of endothelial cells. The complexity of the lysosomal pathway was confirmed by the finding that serglycin, a proteoglycan from the secretory granules of mast cells protects granules against LeuLeuOMe triggered lysosomal membrane permeabilization. However, in contrast to these, lysosomes and lysosomal cathepsins were found to have only bystander roles in death receptor mediated cell death, suggesting that they may be only involved in signal amplification. Nevertheless, reactive oxygen species may be involved in damaging lysosomes in this pathway, although this awaits further confirmation. Finally, destabilizing lysosomes by LeuLeuOMe was found to significantly sensitize cells to other cell death stimuli, such as TNF-alfa, by blocking the autophagic flux, which has a significant potential in biomedicine.

This project therefore provided a fundamental insight into how lysosomes and lysosomal proteases promote cellular signaling in cell death. We believe that the knowledge gained will contribute to our understanding of the complex biological phenomena and will be important for biomedical research to understand and develop novel strategies to combat cancer and other hyperproliferative diseases based on the modulation of the activities of lysosomal proteases.

3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

Znano je, da številni fiziološki procesi zahtevajo ravnotežje med celično smrtjo in celično proliferacijo, pri čemer lahko že manjše spremembe v sistemu stimulirajo nekontrolirano proliferacijo celic, ki lahko vodi v onkogeno transformacijo. Pri teh procesih imajo pomembno vlogo tudi lizosomi in lizosomske proteaze, vendar molekularni mehanizmi

teh procesov in vloga lizosomov in lizosomskih proteaz še vedno niso razjasnjeni. Dolgoročno je bil cilj projekta osvetliti njihovo vlogo in terapevtski potencial pri zdravljenju raka, kar je bilo osnovano na hipotezi, da so lizosomi in/ali lizosomske proteaze pomembni modulatorji celičnega signaliziranja. Glavni cilji tega projekta so bili:

- (1) identificirati molekularne mehanizme, preko katerih lizosomi in lizosomske proteaze pomagajo pri apoptotskem signaliziranju
- (2) ugotoviti, ali je avtofagija mehanizem preživetja, ki se sproži kot odziv na poškodbo celic ali organelov brez sprožitve apoptoze in ugotoviti, ali ciljanje lizosomov senzitivira rakaste celice za apoptotično celično smrt tako z zmanjšanjem avtofagije kot s spodbujanjem apoptoze

Najpomembnejše rezultate smo dobili pri študijah z lizosomotropnim detergentom LeuLeuOMe (LLOMe). Predhodno smo že ugotovili, da LLOMe sproži apoptozo preko destabilizacije lizosomskih membran, ki ji sledi izpust cisteinskih katepsinov v citosol, kjer ti potem sprožijo mitohondrijsko pot apoptoze preko cepitve antiapoptotskih Bcl-2 homologov ter proapoptotskega Bcl-2 proteina Bid (Droga Mazovec in sod. 2008). Da bi potrdili, da so Bcl-2 homologi zares kritični za to pot, smo proučili sproženje apoptoze z LLOMe tudi v MEF celicah z izbitimi geni za Bid, Bak, Bax in Bak/Bax (sodelava z D. Huang, WEHI). Ugotovili smo, da je bila samo v primeru hkratnega izbitja genov za Bax in Bak apoptoza praktično preprečena ob hkratni popolni zaščiti mitohondrijev, medtem ko izbitje posameznih genov vključno s tistim za Bid ni bistveno upočasnilo poteka procesa. Ker sta Bax in Bak ključna proteina za mitohondrijsko pot apoptoze smo tako tudi na genetskem modelu potrdili, da poteka apoptoza sprožena z preko lizosomske poti preko mitohondrijev. Nadalje smo z uporabo MEF celic z izbitimi geni za posamezne katepsine B, L, H in X ter za katepsina B in L ugotovili, da sta katepsina B in L ključna za to pot, saj je samo hkratno izbitje obeh genov preprečilo apoptozo, medtem ko jo je izbitje gena za posamezen katepsin samo upočasnilo, pri čemer izbitje genov za katepsina H in X ni imelo nobenega vpliva (sodelava T. Reinheckel, Freiburg).

Za identifikacijo drugih citosolnih substratov cisteinskih katepsinov s pomočjo proteomskega pristopa smo zato uporabili MEF celice z izbitima genoma za Bax in Bak, lizosomsko destabilizacijo pa sprožili z LLOMe. V sodelavi s skupino K. Gevaerta v Belgiji smo z metodo COFRADIC identificirali sedem novih proteinskih substratov katepsinov, vključno s translokazo 1 ADP/ATP, ki se nahaja v notranji mitohondrijski membrani in sodeluje pri prenosu ATP in ADP v procesih celične dihalne verige. Z racionalnim pristopom smo identificirali še nekaj drugih substratov katepsinov pri apoptozi sproženi z LLOMe, med njimi proteine iz družine MAGUK, ki so obenem tudi substrati kaspaz pri apoptozi sproženi z drugimi sprožilci. Njihova vloga je predvsem v vzpostavitvi celičnih stikov in tako so verjetno med zgodnjimi tarčami proteaz pri apoptozi (Ivanova in sod. 2011). V sodelavi s skupino dr. Goligorskega pa smo kot substrate katepsinov B, S in L identificirali sirtuine, skupino proteinov, ki imajo pomembno vlogo pri zaščiti celice pri različnih oblikah celičnega stresa. Tako smo pokazali, da so cepitve sirtuina1 s katepsini pomembno vplivale na potek celične smrti pri endotelijskih progenitorskih celicah, in da je ta stres, ki ga vsaj delno sprožijo ROS, preprečil antioksidant ebselen, ki je zaščitil lizosome in posledično preprečil sproščanje katepsinov v citosol (Chen in sod., 2012). Nadaljnje delo na lizosomski poti sproženi z LLOMe je potekalo v sodelavi z G. Pejlerjem, kjer smo pokazali, da ima proteoglikan serglicin pomembno vlogo pri sprožitvi apoptoze mastocitov, celic s pomembno vlogo pri imunskem odzivu. Celice iz miši, ki niso vsebovale serglicina, so bile namreč bistveno bolj odporne na apoptozo, pri čemer so bile zaščitene predvsem sekretorne granule, ki vsebujejo proteaze in ki imajo podobno vlogo

kot lizosomi (Melo in sod., 2011).

Kar nekaj dela smo opravili tudi na modelu apoptoze sprožene preko receptorjev smrti, kar je bilo tudi v kliničnih testiranjih za različne oblike raka (predvsem TRAIL). Tako smo najprej proučili potek apoptoze sprožene preko receptorjev smrti TRAILR in Fas na humanih celicah. Pri raziskavi smo uporabili štiri različne humane celične linije, U937, HeLa, Huh7 in Jurkat. Ligand TRAIL je sprožil apoptozo na vseh izbranih celičnih linijah, medtem ko je bila na Fas občutljiva le celična linija Jurkat. Ugotovili smo, da v skladu z s prejšnjimi opažanji Fas in TRAIL sprožita od kaspaz odvisno pot celične smrti. Z uporabo barvila akridin oranž pa smo pokazali, da pride tudi do permeabilizacije lizosomov. Čeprav se posledično poveča katepsinska aktivnost v citosolu, splošni inhibitor cisteinskih katepsinov E64d in specifični inhibitor katepsina B Ca074Me nista imela vpliva na nivo apoptoze kot tudi ne na kaspazno aktivnost. Katepsinska inhibitorja prav tako nista zaščitila mitohondrijev pred permeabilizacijo. Rezultati nakazujejo, da katepsini nimajo kritične vloge pri celični smrti sproženi z ligandoma smrti Fas in TRAIL. Najverjetneje imajo katepsini vlogo po permeabilizaciji mitohondrijske membrane in delujejo v signalni ojačitveni zanki (Špes in sod., 2012). Izbitje gena za katepsin B je v MEF celicah sicer delno upočasnilo potek apoptoze, vendar je ni preprečilo, kar potrjuje zgornjo domnevo.

Glede na to, da so vse predhodne študije temeljile na eni sami meritvi, ko je bila apoptoza že močno izražena, smo v nadaljevanju uporabili še drugačen pristop in spremljali časovni potek apoptoze ter hkrati poškodbe lizosomske in mitohondrijske membrane na primarnih mišjih MEF celicah pri apoptozi sproženi s TNFalfa. Ugotovili smo, da TNFalfa sproži apoptozo hkrati s poškodbo mitohondrijev že po 4 h in ju stopnjuje vse do 14 h. Poškodbe lizosomov se pojavijo šele po 6 h inkubacije s TNFalfa. Po 10 h pa je bilo število celic s poškodovanimi lizosomi enako številu celic s poškodovanimi mitohondriji, kar je potrdilo hipotezo o stranski vlogi lizosomov pri apoptozi sproženi preko receptorjev smrti. To smo potrdili tudi pri poskusih z MEF celicami z izbitim katepsinom B oz. L, kjer je podobno kot pri TRAILu, prišlo samo do rahlega zamika apoptoze.

Po ugotovitvi, da katepsini samo ojačijo apoptozo sproženo preko receptorjev smrti in posredno mitohondrijev v t.i. v celicah tipa II, smo poskusili poiskati povezavo med destabilizacijo mitohondrijev in lizosomov. Domnevali smo, da so za zakasnitev poškodbe lizosomov odgovorne reaktivne kisikove zvrsti (ROS), ki nastajajo v poškodovanih mitohondrijih. Najprej smo opazili, da sta tako odstranjevalec ROS tempol kot deferoksiamin, kelator železovih ionov, ki naj bi se pretežno nahajali v lizosomih, upočasnila potek apoptoze, oziroma jo skoraj popolnoma preprečila (tempol), kar je kazalo na to, da so ROS kritičen faktor pri apoptozi sproženi preko receptorjev smrti. Vendar tempol v milimolarnih koncentracijah lahko deluje tudi kot oksidant zaradi kopičenja vmesnega (oksioamonijev kation) in končnega produkta (vodikov peroksid), ki nastaneta pri reakciji dismutacije, medtem ko deferoksiamin, poleg preprečevanja Fentonove reakcije, aktivira tudi dejavnik prepisovanja HIF1alfa, ki med drugim omogoči zmanjšanje oksidativne fosforilacije v celici. Za ponovno ovrednotenje teh dveh antioksidantov smo se povezali s skupino M. Rehma (Royal College of Surgeons in Ireland, Irska), kjer so preverili vpliv tempola na apoptozo pri MEFih z izbitima Bax in Bak genoma. Poleg tega smo v eksperimente vključili še druge antioksidante (a-tokoferol: preprečuje lipidno peroksidacijo, N-acetil-L-cistein (NAC): prekursor glutationa in MnTBAP: sintetična dismutaza). Rezultati iz Rehmove skupine in rezultati z drugimi antioksidanti niso tako obetavni kot tisti, ki smo jih dobili s tempolom in

deferoksiaminom in ROS najverjetneje nimajo tako izrazitega vpliva na potek TNFalfa sprožene apoptoze v pozni fazi (torej po razlitju lizosomov) kot se je nakazovalo. Ima pa predvsem tempol verjetno zelo specifičen in od ROS neodvisen učinek, saj je praktično popolnoma preprečil sprožitev apoptoze in tudi aktivacijo kaspaze 8, ki je glavna iniciatorska kaspaza pri tej poti, kar kaže na to, da bi pozitivni terapevtski učinek tempola in vivo pri preprečevanju apoptoze bil lahko povezan s to drugo zaenkrat neznano aktivnostjo.

Dodatno pa imajo ROS pomembno vlogo pri nekrozi oziroma programirani nekrozi (nekroptoz). TNFalfa lahko poleg apoptoze, sproži tudi drugo obliko programirane celične smrti, nekroptozo, ki se aktivira ob blokadi aktivacije kaspaz. Nekroptozo je od kaspaz neodvisna programirana celična smrt, ki pa je odvisna od RIP1 (angl. receptor-interacting protein) in RIP3 kinaze. Tudi pri nekroptoz pride do poškodb mitohondrijev, nastajanja ROS in poškodb lizosomov. Najprej smo ugotovili, da je produkcija ROS izrazitejša pri sprožanju nekroptoze kot pri apoptoz. Oksidativni stres se pojavi relativno pozno, šele nekaj ur po dodatku TNFalfa, za razliko od stresorjev, ki mitohondrije ciljajo direktno (menadion) ali indirektno (staurosporin), pri katerih se produkcija ROS opazi že v manj kot eni uri. Nadalje smo ugotovili, da smo lahko z izbranimi antioksidanti (tempol, deferoksiamin, NAC in α -tokoferol) vsaj delno preprečili citotoksičnost ROS, pri čemer je bil najučinkovitejši NAC, tempol pa je bil delno učinkovit le pri nizkih koncentracijah. Nadalje smo preverili, ali lahko preko poškodb lizosomov vplivamo na potek avtofagije oziroma ali lahko na ta način vplivamo na senzitivacijo celic za drugačne oblike stresa, ki bi bile primerne v terapevtske namene. Ponovno smo kot modelno spojino uporabili LLOMe, za katerega smo ugotovili, da dejansko permeabilizira lizosome. Ugotovili smo, da tudi koncentracije, ki ne sprožijo apoptoze, zelo hitro (15 min) poškodujejo membrane lizosomov v celicah HeLa, ki smo jih uporabili kot modelni sistem. Te poškodbe se kažejo v izgubi zmožnosti celic za kopičenje šibko bazičnega barvila akridin oranž v lizosomih, kar smo potrdili s pretočno citometrijo in z opazovanjem pod fluorescenčnim mikroskopom. Posledica poškodovanih lizosomov je bilo tudi kopičenje membranske oblike molekule LC3, ki sestavlja membrane avtofagosomov. Nadalje smo ugotovili, da takšne poškodbe lizosomske membrane vodijo do izredno hitre inaktivacije cisteinskih katepsinov. V nasprotju s tem pa nekatere druge lizosomotropne snovi (klorokvin, amonijev klorid) niso povzročile permeabilizacije lizosomov, pa tudi aktivnost katepsinov je padla šele po daljšem času. Spremembe v aktivnosti cisteinskih katepsinov smo nato še bolj natančno proučili s sondami za označevanje aktivnih cisteinskih katepsinov, ki smo jih razvili s partnerji v evropskih projektih CAMP in LIVIMODE. Tako smo ugotovili, da se po tretiranju celic z LLOMe zelo hitro zmanjša aktivnost tako katepsina L kot tudi katepsina B, ki je relativno bolj stabilen v nevtralnem pH. Z metodo imunodetekcije smo ugotovili, da pride do popolne razgradnje obeh katepsinov, ki pa je bila neodvisna od razgradnje s proteasomom. Nadalje smo ugotovili, da so celice takšen stres s popolnoma nefunkcionalnimi lizosomi dobro preživele, saj so bile po 36 h ponovno popolnoma funkcionalne, kar je bilo odvisno od ponovne sinteze katepsinov (neklonogeno). V tem obdobju pa so bile celice bistveno bolj občutljive na druge oblike stresa (TNFalfa), kar kaže na to, da z destabilizacijo lizosomov blokiramo avtofagijo in tako celice senzitiviramo za druge oblike stresa. To pa ima nedvomno velik terapevtski potencial.

4. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev²

Ocenjujem, da smo v glavnem izpolnili vse zastavljene cilje projekta. Nekaj rezultatov projekta pa je še v pripravi za objavo, tako da bodo objavljeni po zaključku projekta.

5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁴

Bistvenih sprememb programa in projektne skupine ni bilo, razen običajnih zamenjav članov po končanem usposabljanju, ki pa niso vplivale na rezultate projekta.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	24435239	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	MAGUK, ogrodni proteini v celičnih stikih, so substrati različnih proteaz med apoptozo
		<i>ANG</i>	MAGUKs, scaffolding proteins at cell junctions, are substrates of different proteases during apoptosis
	Opis	<i>SLO</i>	Glavna lastnost apoptoze so velike strukturne spremembe celic. Ena od teh je tudi izguba celičnih kontaktov. Za kaspaze, ki so glavni izvrševalci apoptoze, je bilo pokazano da cepijo več proteinov, ki so vključeni v nastanek celičnih stikov. Z membrano povezane gvanilatne kinaze (MAGUK), ki so običajno povezane s celičnimi stiki, imajo pomembno vlogo pri organizaciji in nastanku proteinskih kompleksov na plazmalemii. Pokazali smo, da kaspaze, grancim B in cisteinski katepsini lahko in vitro cepijo več proteinov iz družine MAGUK. Nadalje smo pokazali, da kaspaze cepijo MAGUK tudi v celičnih modelih apoptoze, sprožene z UV iradiacijo in staurosporinom. Pri apoptozi sproženi z lizosomotropnim detergentom LeuLeuOMe pa smo ugotovili, da MAGUK cepijo tudi cisteinski katepsini. S pomočjo imunohistoloških metod smo pokazali tudi, da se MAGUK razgradijo pred razpadom celičnih stikov, kar kaže na to, da je cepitev MAGUK pomembna stopnja pri hitrem in učinkovitem odlepljanju celic.
		<i>ANG</i>	A major feature of apoptotic cell death is gross structural changes, one of which is the loss of cell-cell contacts. The caspases, executioners of apoptosis, were shown to cleave several proteins involved in the formation of cell junctions. The membrane-associated guanylate kinases (MAGUKs), which are typically associated with cell junctions, have a major role in the organization of protein-protein complexes at plasma membranes and are therefore potentially important caspase targets during apoptosis. We report here that MAGUKs are cleaved and/or degraded by executioner caspases, granzyme B and several cysteine cathepsins in vitro. When apoptosis was induced by UV-irradiation and staurosporine in different epithelial cell lines, caspases were found to efficiently cleave MAGUKs in these cell models, as the cleavages could be prevented by a pan-caspase inhibitor N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)fluoromethylketone. Using a selective lysosomal disrupting agent L-leucyl-L-leucine methyl ester, which induces apoptosis through the lysosomal pathway, it was further shown that MAGUKs are also cleaved by the cathepsins in HaCaT and CaCo-2 cells. Immunohistological data showed rapid loss of MAGUKs at the sites of cell-cell contacts, preceding actual cell detachment, suggesting that cleavage of MAGUKs is an important step in fast and efficient cell detachment.
	Objavljeno v	Nature Publishing Group; Cell death & disease; 2011; Vol. 2; str. e116-1-e116-11; Impact Factor: 5.333; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 4.733; A': 1; WoS: DR; Avtorji / Authors: Ivanova Saška, Gregorc Uroš, Vidergar Nina, Javier Ron, Bredt David S., Vandenabeele Peter, Pardo J., Simon Markus M., Turk Vito, Banks Lawrence, Turk Boris	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
2.	COBISS ID	24226855	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Vloga proteoglikana serglicina pri apoptozi mastocitov, inducirani preko poti

		sekretornih granul
	ANG	A role for serglycin proteoglycan in mast cell apoptosis induced by a secretory granule-mediated pathway
Opis	SLO	Sekretorne granule mastocit (sekretorni lizosomi vsebujejo velike količine aktivnih proteaz, ki so vezane na proteoglikan serglycin. Poškodbe membran teh granul bi tako vodile do sproščanja serglycina in proteaz vezanih na serglycin v citosol, kar bi lahko vodilo do proteolitske aktivacije proapoptotskih komponent v citosolu. Pokazali smo, da so mastocite divjega tipa zelo občutljive za apoptozo, ki smo jo inducirali z permeabilizacijo granul (LeuLeuOMe), medtem ko so bile celice brez serglycina zelo odporne na tak način indukcije apoptoze. Zmanjšano občutljivost celic brez serglycina so spremljali zmanjšanje poškodb membran granul, zmanjšano sproščanje proteaz v citosol in zelo zmanjšana aktivacija kaspaze-3. To kaže na to, da ima proteoglikan serglycin pomembno vlogo pri apoptozi mastocit.
	ANG	Mast cell secretory granules (secretory lysosomes) contain large amounts of fully active proteases bound to serglycin proteoglycan. Damage to the granule membrane will thus lead to the release of serglycin and serglycin-bound proteases into the cytosol, which potentially could lead to proteolytic activation of cytosolic pro-apoptotic compounds. We show that wild-type mast cells are highly sensitive to apoptosis induced by granule permeabilization, whereas serglycin-deficient cells are largely resistant. The reduced sensitivity of serglycin(-/-) cells to apoptosis was accompanied by reduced granule damage, reduced release of proteases into the cytosol, and defective caspase-3 activation. Mechanistically, the apoptosis-promoting effect of serglycin involved serglycin-dependent proteases, as indicated by reduced sensitivity to apoptosis and reduced caspase-3 activation in cells lacking individual mast cell-specific proteases. Together, these findings implicate serglycin proteoglycan as a novel player in mast cell apoptosis.
Objavljeno v		American Society of Biological Chemists.; The Journal of biological chemistry; 2011; Vol. 286, issue 7; str. 5423-5433; Impact Factor: 4.773; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.739; A': 1; WoS: CQ; Avtorji / Authors: Rabelo Melo Fabio, Turk Boris, Pejler Gunnar
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
3.	COBISS ID	26316327 Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Cisteinski katepsini nimajo ključne vloge pri apoptozi sproženi preko TRAIL receptorjev in CD95 v humanih celičnih linijah
	ANG	Cysteine cathepsins are not critical for TRAIL- and CD95-induced apoptosis in several human cancer cell lines
Opis	SLO	Potencialno vlogo cisteinskih katepsinov pri apoptozi sproženi z ligandom faktorja tumorske nekroze TRAIL/Apo2L in CD95 (Fas/APO-1) smo proučevali na štirih različnih celičnih linijah: HeLa, Huh-7, Jurkat, in U-937. Celice izbranih linij se razlikujejo po vsebnosti katepsinov in se različno odzivajo na sprožitev apoptoze. Celična linija Jurkat se je izkazala kot najbolj občutljiva in je edina, ki je bila občutljiva na agonistično anti-APO1 protitelo. Za apoptozo je bila značilna aktivacija kaspaz ter poškodba mitohondrijev in lizosomov, čemur je sledil izpust katepsinov v citosol. Prisotnost katepsinov v citosolu smo ocenili na podlagi hidrolize substrata cisteinskih katepsinov benziloksikarbonil-Phe-Arg-7-amino-4-metilumarina in z imunsko detekcijo katepsina B. Čeprav sta širokospektralni cisteinski inhibitor katepsinov, (2S, 3S)-trans-epoksisucinil-leukilamido-3-metil-butan etil ester, in selektivni inhibitor katepsina B, (2S, 3S)-3-propilkarbamoiloksiran-2-karbonil]-l-isoleucil-l-prolin metilester, popolnoma zavrla katepsinsko aktivnost, nista preprečila apoptoze, njenega

		<p>napredovanja in značilnih apoptotskih poškodb membran mitohondrijev in lizosomov. Tudi izpust katepsinov iz lizosomov v citosol nismo uspeli preprečiti. Povzeto, ti rezultati kažejo, da cisteinski katepsini niso potrebni pri apoptozi rakavih celic človeških celičnih linij, ki jo sprožata TRAIL in CD95. To pa ne izključuje dejstva, da lizosomi in cisteinski katepsini sodelujejo pri pomnožitvi signala (in ne pri začetni sprožitvi) apoptoze sprožene prek receptorjev smrti v določenih celičnih linijah pod drugačnimi pogoji od tukaj izbranih.</p>
	ANG	<p>The potential role of cysteine cathepsins in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L)- and CD95 (Fas/APO-1)-induced apoptosis was investigated using four different cell lines (HeLa, HuH-7, Jurkat, and U-937). All four cell lines exhibited different levels of cathepsins and responded differently to apoptosis triggering, with Jurkat cells being the most sensitive and the only ones that were sensitive to the agonistic anti-APO-1 antibody. Apoptosis was accompanied by caspase activation, loss of the mitochondria and lysosome integrity, and the release of cysteine cathepsins into the cytosol, as judged based on the hydrolysis of the cysteine cathepsin substrate benzyloxycarbonyl-Phe-Arg-7-amino-4-methylcoumarin and by the immunological detection of cathepsin B. The inhibition of caspases by the broad-spectrum inhibitor benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone prevented apoptosis, including the mitochondrial and lysosomal membrane permeabilization, as well as cathepsin release into the cytosol, consistent with caspases playing a crucial role in the process. Conversely, however, although the broad-spectrum cysteine cathepsin inhibitor (2S,3S)-trans-epoxysuccinyl-leucylamido-3-methyl-butane ethyl ester and the more cathepsin B-selective inhibitor [(2S,3S)-3-propylcarbonyloxirane-2-carbonyl]-l-isoleucyl-l-proline methyl ester completely blocked cathepsin activity, these inhibitors neither prevented apoptosis and its progression nor the mitochondrial and lysosomal membrane permeabilization associated with this type of cell death. Consequently, cathepsin release into the cytosol was also not prevented. Together, these data indicate that cysteine cathepsins are not required for the TRAIL- and CD95-mediated apoptosis in various human cancer cell lines. This does not, however, rule out that lysosomes and cysteine cathepsins are involved in the amplification, but not in the initiation, of death receptor-mediated apoptosis in certain cell lines or under different stimulation conditions than the ones employed here.</p>
	Objavljeno v	Walter de Gruyter; Biological chemistry; 2012; Vol. 393, issue 12; str. 1417-1431; Impact Factor: 2.683; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.761; WoS: CQ; Avtorji / Authors: Špes Aleš, Sobotič Barbara, Turk Vito, Turk Boris
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
4.	COBISS ID	25738023 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<p>SLO Cepitev Sirtuina 1 s katepsini posreduje s stresom povzročeno prezgodnje staranje matičnih endotelijskih celic</p> <p>ANG Cathepsin cleavage of Sirtuin 1 in endothelial progenitor cells mediates stress-induced premature senescence</p>
		<p>S stresom inducirano prezgodnje staranje (SIPS) endotelijskih celic (EC) odločilno prispeva k splošnemu nepravilnemu delovanju EC. Ena izmed nepravilnosti povezanih s SIPS je nepravilno delovanje lizosomov. V naši študiji smo preučevali vpliv različnih kardiovaskularnih dejavnikov tveganja na izražanje sirtuina 1 (SIRT1), SIPS in apoptozo ter določili vlogo SIRT1 pri zmanjšanju viabilnosti EC in matičnih endotelijskih celic (MEC). Naša dognanja so bila potrjena s poskusi na laboratorijskih miših z izbitim genom za endotelijski SIRT1. Učinke stresnih dejavnikov smo posnemali s sprožanjem prepustnosti lizosomalne membrane ali zaviranjem avtofagije ter jih preprečili z zaviralci katepsinov. Dokazali smo, da je SIRT1 eden</p>

Opis	SLO	ključnih substratov cisteinskih Katepsinov B, S in L. Antioksidant/peroksinitritni lovilec, ebselen, je preprečil s stresom inducirano pomanjkanje SIRT1 in vpliv na avtofagijo s preprečevanjem okvar lizosomov. Na koncu lahko potrdimo osnovno idejo o »staranju matičnih celic«, ki naj bi bila posledica nepravilnega delovanja lizosomov pri razvoju SIPS povzročene s proteolitično cepitvijo SIRT1 s Katepsini, kar povezuje celični stres in apoptozo ter SIPS. Ebselen domnevno ščiti celovitost lizosomalne membrane, preprečuje cepitev SIRT1 s Katepsini v MEC in zavira SIPS ter apoptotska celično smrt, vzbujeno s kardiovaskularnim stresnim dejavnikom. Predlagani mehanizem pomanjkanja SIRT1 med stresom je značilen pri pojavu SIPS v MEC.	
	ANG	Stress-induced premature senescence (SIPS) of endothelial cells (ECs) has emerged as a contributor to global EC dysfunction. One of the cellular abnormalities mechanistically linked to SIPS is lysosomal dysfunction. In this study, we examined the impact of a range of cardiovascular risk factors on the expression of sirtuin 1 (SIRT1), SIPS, and apoptosis, and we documented the role of SIRT1 in reduced EC and endothelial progenitor cell (EPC) viability. These findings were confirmed in mice with selective endothelial SIRT1 knockout. The effects of stressors could be partially mimicked by inducing lysosomal membrane permeabilization or inhibiting autophagy, and were reversed by a cathepsin inhibitor. We provide evidence that SIRT1 is an important substrate of cysteine cathepsins B, S, and L. An antioxidant/peroxynitrite scavenger, ebselen, prevented stress-induced SIRT1 depletion and subversion of autophagy by mitigating lysosomal dysfunction. In conclusion, our data advance the concept of "stem cell aging" by establishing the critical role of lysosomal dysfunction in the development of SIPS through the cathepsin-induced proteolytic cleavage of SIRT1, a mechanism linking cell stress to apoptosis and SIPS. Ebselen potently protects lysosomal membrane integrity, preventing cathepsin-induced cleavage of SIRT 1 in EPCs and blunting SIPS and apoptotic cell death induced by relevant cardiovascular stressors. The proposed mechanism of SIRT1 depletion in stress has all of the attributes of being a paradigm of SIPS of EPCs.	
	Objavljeno v	American Association of Pathologists and Bacteriologists; The American journal of pathology; 2012; Vol. 180, no. 3; str. 973-983; Impact Factor: 4.522; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.638; A ¹ : 1; WoS: TM; Avtorji / Authors: Chen Jun, Xavier Sandhya, Moskowitz-Kassai Eliza, Chen Robert, Lu Connie Y., Sanduski Kyle, Špes Aleš, Turk Boris, Goligorsky Michael S.	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
5.	COBISS ID	26621479	Vir: COBISS.SI
Opis	Naslov	SLO	Endolizosomski sistem v celični smrti in pri preživetju celic
		ANG	The endolysosomal system in cell death and survival
		SLO	V preglednem članku smo povzeli pomen in vlogo endocitotske poti v celici. Endocitotska pot je pomembna za vnos snovi iz celičnega mikrookolja ter razgradnjo snovi s pomočjo različnih hidrolaz. Hidrolaze, še posebej cisteinske proteaze pa lahko sprožijo tudi apoptozo, v kolikor pride do njihovega iztoka v citosol. Poznamo tudi precej dolg seznam spojin za katere so poročali, da povzročijo permeabilizacijo lizosomske membrane in s tem sprožijo notranjo pot apoptoze. Take spojine imajo velik terapevtski potencial pri zdravljenju raka. Poleg endocitotske poti pa material namenjen za razgradnjo pride tudi preko avtofagije. Z razgradnjo poškodovanih organelov in drugih molekul celica reciklira material za sintezo novih molekul in tako avtofagija s sistemom endocitotske poti učinkovito kljubuje različnim apoptotskim dražljajem.
			The endocytic pathway is a system specialized for the uptake of compounds

	ANG	from the cell microenvironment for their degradation. It contains an arsenal of hydrolases, including proteases, which are normally enclosed in membrane-bound organelles, but if released to the cytosol can initiate apoptosis signaling pathways. Endogenous and exogenous compounds have been identified that can mediate destabilization of lysosomal membranes, and it was shown that lysosomal proteases are not only able to initiate apoptotic signaling but can also amplify the apoptotic pathways initiated in other cellular compartments. The endocytic pathway also receives cargo destined for degradation via the autophagic pathway. By recycling energy and biosynthetic substrates, and by degrading damaged organelles and molecules, the endocytic system assists the autophagic system in resisting apoptotic stimuli. Steps leading to lysosomal membrane permeabilization and subsequent triggering of cell death as well as the therapeutic potential of intervention in lysosomal membrane permeabilization are discussed.
Objavljeno v		Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor perspectives in biology; 2013; Vol. 5, no. 1; str. a008755-1-a008755-14; Impact Factor: 9.630;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 4.723; A': 1; WoS: DR; Avtorji / Authors: Repnik Urška, Hafner Česen Maruša, Turk Boris
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

7.Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

	Družbeno-ekonomski dosežek	
1.	COBISS ID	263241984 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO XIII. Mednarodni simpozij o proteinazah, inhibitorjih in biološkem nadzoru ANG XIIIth International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control
	Opis	SLO Že 13. po vrsti smo organizirali mednarodni simpozij s področja proteaz, ki so se ga tudi tokrat udeležili številni vodilni raziskovalci s področja s celega sveta (Japonska, ZDA, Kanda, Avstralija, Evropa). Eden najuglednejših simpozijev s področja proteaz nasploh. ANG We have organized already 13th consecutive International Symposium in the field of proteases, which attracted most of the world leading researchers from the field (Japan, USA, Canada, Europe, Australia). One of the most respected symposia in the field of proteases in general.
	Šifra	B.01 Organizator znanstvenega srečanja
	Objavljeno v	Jožef Stefan Institute; 2012; 127 str.; Avtorji / Authors: Stoka Veronika, Turk Boris
	Tipologija	2.25 Druge monografije in druga zaključena dela
2.	COBISS ID	263211520 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Vloga in pomen cisteinskih katepsinov pri celični smrti inducirani z ligandom TRAIL ANG Role and significance of cysteine cathepsins in TRAIL induced apoptosis
	Opis	SLO V svoji doktorski disertaciji je Aleš Špes opisal svoje dosežke na področju apoptoze, kjer se je predvsem ukvarjal z razumevanjem signalnih poti preko receptorjev smrti s poudarkom na TRAILu. Del rezultatov je bil že objavljen ANG In his doctoral thesis Aleš Špes has described his work on apoptosis, devoted primarily to the understanding of the death receptor signaling pathways with major focus on TRAIL. Part of the results has been already

		published.
Šifra		D.09 Mentorstvo doktorandom
Objavljeno v		[A. Špes]; 2012; XVI, 87 str., [35] str. pril.; Avtorji / Authors: Špes Aleš
Tipologija		2.08 Doktorska disertacija
3.	COBISS ID	Vir: vpis v poročilo
Naslov	SLO	Zoisova nagrada za vrhunske znanstvene dosežke
	ANG	Zois award for outstanding scientific achievement
Opis	SLO	Najvišja nagrada na področju znanosti v Republiki Sloveniji
	ANG	The highest scientific award in the Republic of Slovenia awarded to a scientist.
Šifra		E.01 Domače nagrade
Objavljeno v		Delo, spletna stran Ministrstva
Tipologija		3.25 Druga izvedena dela
4.	COBISS ID	Vir: vpis v poročilo
Naslov	SLO	Izvolitev za člana Academia Europea (London)
	ANG	Election for member of Academia Europea (London)
Opis	SLO	izvolitev za člana ene najuglednejših tujih akademij je nedvomno veliko priznanje tako za raziskovalca kot za Slovenijo
	ANG	election for a member of one of the most renowned international academies is clearly a major recognition for both the researcher and Slovenia
Šifra		E.02 Mednarodne nagrade
Objavljeno v		spletna stran Academia Europea
Tipologija		3.25 Druga izvedena dela
5.	COBISS ID	Vir: vpis v poročilo
Naslov	SLO	članstvo v uredniškem odboru revije Cell Death & Disease
	ANG	Editorial board member of Cell Death & Disease
Opis	SLO	Boris Turk je član uredniškega odbora revije Cell Death & Disease. Članstvo v uredniškem odboru priznane mednarodne revije je posebne vrste priznanje za pomembne znanstvene prispevke v polju dela. Kot takšno je vsekakor zelo pomembno za mednarodno prepoznavnost Slovenije in njeno uvstitev na svetovni zemljevid.
	ANG	Boris Turk is Editorial board member of Cell Death & Disease. To be a member of the Editorial Board of a wellknown international journal is an honour for the recognition of important scientific contribution in the field. As such it is important for the recognition of Slovenia on the world's map of science.
Šifra		C.04 Uredništvo mednarodne revije
Objavljeno v		spletna stran
Tipologija		4.00 Sekundarno avtorstvo

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine²

Člani projektne skupine smo imeli številna vabljen predavanja tako na mednarodnih konferencah kot na tujih univerzah. Vodili smo sekcije na mednarodnih srečanjih in sodelovali pri organizaciji več kongresov v okviru organizacijskih ali programskih odborov, vključno s kongresi European Cell Death Organisation (ECDO) v Ghentu 2010, Stockholmu 2011, Rimu

2012 in Parizu 2012. Poleg tega je prof. dr. Boris Turk generalni sekretar ECDO od leta 2008 in je bil tudi sekretar International Proteolysis Society v letih 2009-2011 ter njen predsednik v letih 2011-2013. Omembe vredna je tudi koordinacija EU FP7 projekta Livimode, v okviru katerega smo med drugim razvijali sonde za detekcijo aktivnosti katepsinov in kaspaz. V tem obdobju so naša dela dosegla zelo veliko odmevnost, saj so bila samo v letu 2013 dela vodje projektne skupine prof. B. Turka citirana več kot 900 krat, kar kaže na znanstveno odličnost raziskav projektne skupine. Uspešno smo sodelovali tudi v Centrih odličnosti CIPKeBiP (Dušan Turk) in Nanoznanosti in Nanotehnologije (Dragan Mihajlović).

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

9.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Ta projekt je bil vsekakor močno relevanten za področje biomedicine. Lizosomi in lizosomske proteaze so že bili validirani kot tarče pri zdravljenju raka, več spojin, ki ciljajo lizosome in/ali lizosomske proteaze pa je tudi že v predkliničnem ali kliničnem testiranju. To velja tako za LeuLeuOMe, ki je vstopil v fazo 1 kliničnih testiranj, kot tudi za ligande receptorjev smrti iz družine TNF in antioksidante. Verjamemo, da je projekt odprl nove perspektive na področjih, kjer je bila dejanska vloga lizosomov in katepsinov nepoznana, slabo poznana ali pa kontroverzna kot npr. pri apoptozi sproženi preko receptorjev smrti in pri od kaspaz neodvisni celični smrti. Znanje pridobljeno v okviru bo tako ne samo pomembno prispevalo k našemu razumevanju kompleksnih bioloških procesov, ampak bo dolgoročno tudi ključno za biomedicinske raziskave pri razumevanju in razvoju novih strategij zdravljenja raka in ostalih hiperproliferativnih bolezni, ki temeljijo na modulaciji aktivnosti lizosomskih proteaz. Poleg tega je predlagani projekt nadgradil raziskave na področju celične biologije in molekularne medicine ter razširil tovrstna znanja na Odseku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo Instituta Jožef Stefan.

ANG

This project was certainly of high biomedical relevance. Lysosomes and lysosomal proteases have already been validated as relevant targets for cancer treatment, whereas several compounds targeting lysosomes and/or lysosomal proteases are already in preclinical or clinical testing. This is true not only for LeuLeuOMe, which entered Phase I clinical trials, but also for TNF-related death receptor ligands and various antioxidants. We believe that we have opened new avenues in the areas where the exact roles of lysosomes and cathepsins and their signaling pathways were unknown, largely unclear or controversial such as in the death receptor pathway and caspase independent cell death. The gained knowledge will thus not only significantly contribute to our understanding of the complex biological phenomena, but will in long run also be instrumental in biomedical research to understand and develop novel strategies to combat cancer and other hyperproliferative diseases based on modulation of the activities of lysosomal proteases. In addition, the project strengthened the research at the Department of Biochemistry and Molecular Biology at Jožef Stefan Institute in the field of cell biology and molecular medicine.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Rak je ena od glavnih bolezni razvitega sveta. Terapevtsko odstranjevanje tumorskih celic s stimulacijo apoptoze in inhibicijo avtofagije ter uporaba proteaznih inhibitorjev so trenutno med najbolj perspektivnimi področji pri zdravljenju raka. Tako bodo imeli dobljeni rezultati projekta velik pomen pri vrednotenju lizosomov in cisteinskih katepsinov kot možnih terapevtskih tarč pri zdravljenju raka. Ta projekt je ob nadaljevanju raziskav v reprezentativnih živalskih tumorskih modelih velikega pomena pri vrednotenju novih zdravil na predklinični ravni, kar je zagotovo zelo zanimivo za farmacevtsko industrijo v Sloveniji in v tujini. Zato lahko trdimo, da so bile raziskave sicer pretežno bazične narave, vendar imajo tudi uporabno komponento, zaradi česar jih lahko upravičeno uvrstimo med strateške bazične raziskave. Člani skupine so intenzivno sodelovali s slovensko industrijo v preteklem obdobju (Lek, Krka), nove povezave pa

smo vzpostavili tudi že z Acies d.o.o. To je bil tudi eden od dolgoročnih ciljev projekta. Poleg tega je raziskovalno delo na projektu in v raziskovalni skupini nudilo izredne možnosti za študente, da so se seznanili z najnovejšimi tehnikami in področji, kot npr. proteomiko (na IJS je edini proteomski laboratorij v Sloveniji) in kemogenomiko (skupaj z Evropskimi in drugimi tujimi partnerji). Obe polji imata namreč zelo visoko mednarodno prioriteto, ker sta izrednega pomena za identifikacijo in validacijo tarč pri razvoju novih zdravil. Poleg tega pa so člani skupine dosegli široko mednarodno priznanje, kar je vse zelo pomembno za mednarodno promocijo Slovenije in s tem tudi za ohranitev narodne identitete.

ANG

Cancer is one of the most debilitating diseases of the developed world. Therapeutic removal of cancer cells by stimulating apoptosis and blocking autophagy, together with the use of protease inhibitors, are currently among the most perspective areas in cancer treatment. Thus, the results obtained will be highly relevant in evaluation of lysosomes and cysteine cathepsins as possible therapeutic targets in cancer. Continuation of the research in representative animal cancer models is therefore of high value for the evaluation of compounds at the preclinical level, which should be interesting for the pharmaceutical companies in Slovenia and abroad. Therefore we can say that although the research performed was largely basic research, it also has its applied component and can be classified as strategic basic research. This also helped us to establish contacts with our SME Acies d.o.o, which was also one of the longterm goals of the project. Similar connections have already been established in past, as seen from the numerous contracts. Moreover, the work also offered great opportunity for students to be trained in the most advanced methods and areas, such as proteomics (at IJS in our Department we have the only proteomics lab in Slovenia), and chemogenomics together with European and other international partners. Both fields have namely high international priority as they are of extreme importance in target identification and validation during drug development. In addition, members of the project have received widespread international recognition, which is very important for the worldwide promotion of Slovenia and as such also for preservation of national identity of Slovenia.

**10. 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	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

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

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

Komentar

11. 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	<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"/>	
G.02	Gospodarski razvoj					
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"/>	
	Zmanjšanje porabe materialov in					

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="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03	Tehnološki razvoj					
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"/>	
G.04	Družbeni razvoj					
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"/>	
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	<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"/>	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva					
G.09.	Drugo:					

Komentar

--

12.Pomen raziskovanja za sofinancerje¹¹

--	--

	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		

13. Izjemni dosežek v letu 2013¹²

13.1. Izjemni znanstveni dosežek

13.2. 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:

Institut "Jožef Stefan"

Boris Turk

ŽIG

Kraj in datum:

Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2014/101

¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

² 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](#)

³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

⁴ 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](#)

⁵ 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](#)

⁶ 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](#)

⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁸ 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](#)

⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

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

¹¹ 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](#)

¹² Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2013 (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 priložitev/-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/2014 v1.03

10-BF-B1-1F-1D-20-C8-21-1C-31-F8-CC-4A-B9-72-E2-C2-33-C6-FF