

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/101

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J3-0386
Naslov projekta	VLOGA SEKRETORNIH FOSFOLIPAZ A2 PRI RAKU DOJKE
Vodja projekta	4570 Jože Pungerčar
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	2.085
Cenovni razred	D
Trajanje projekta	02.2008 - 01.2011
Nosilna raziskovalna organizacija	106 Institut "Jožef Stefan"
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Družbeno-ekonomski cilj	13. Splošni napredek znanja - RiR financiran iz drugih virov (ne iz splošnih univerzitetnih fondov - SUF)

1.1. Družbeno-ekonomski cilj¹

Šifra	13.03
Naziv	Medicinske vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)

2. Sofinancerji²

1.	Naziv	
	Naslov	
2.	Naziv	
	Naslov	
3.	Naziv	
	Naslov	

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta³

Povzetek. Pomen sekretornih fosfolipaz A2 (sPLA2) pri razvoju in napredovanju rakavih obolenj je priznan, a slabo raziskan patofiziološki proces. Novejše raziskave kažejo na vpletenost sPLA2 v razvoj kolorektalnega raka in raka prostate. V naši prvi študiji o vključenosti sPLA2 v rak dojke smo določili profile izražanja vseh desetih človeških sPLA2 v sedmih celičnih modelih raka dojke, ki predstavljajo različne stopnje razvoja te bolezni. Pri tem smo vzpostavili validirano metodo qPCR za analizo izražanja celotnega nabora človeških sPLA2 v celičnih in tkivnih vzorcih ter ugotovili, da se s spreminjanjem tumorigenih lastnosti celic raka dojke, ki odražajo napredovanje bolezni, od manj agresivnih in hormonsko občutljivih do bolj invazivnih in hormonsko neodvisnih oblik, spreminja tudi stopnja izražanja štirih človeških sPLA2 (sPLA2-IIA, -III, -V in -X) in nekaterih drugih encimov, ključnih za metabolizem arahidonske kisline oz. biosintezo prostaglandinov. sPLA2-III se je prekomerno izražala v šibko tumorigenih celičnih linijah, sPLA2-IIA v srednje do visoko invazivnih celičnih linijah, nivo izražanja sPLA2-V pa je bil močno povišan v epiteljskih netumorigenih celicah ter znižan v visoko invazivnih celicah. sPLA2-X se je prekomerno izražala v šibko in srednje invazivnih celicah, medtem ko njenega transkripta nismo zasledili v visoko invazivnih in tumorigenih celičnih linijah. Diferenčno izražanje sPLA2 do sedaj še ni bilo pokazano pri raku dojke, različni profili izražanja sPLA2-IIA, -III, -V in -X pa kažejo na specifične, nezamenljive vloge posameznih encimov na različnih stopnjah razvoja raka dojke. Naše prve študije pridobitve funkcije so pokazale, da ektopično izražanje sPLA2-X v visoko invazivnih celicah MDA-MB-231 privede do občutnega znižanja števila celic, viabilnosti in hitrosti proliferacije. Poskusi s pretočno citometrijo so potrdili, da ima sPLA2-X negativen vpliv na rast visoko invazivnih celic, s tem da zniža odstotek celic v fazi S in povzroči zastoj v fazi G2/M celičnega cikla. V skladu s tem smo ugotovili, da tudi eksogeno dodana rekombinantna sPLA2-X povzroči časovno in koncentracijsko odvisno znižanje števila in proliferativne aktivnosti celic MDA-MB-231. sPLA2-X je imela kompleksen učinek na gibljivost celic: prekomerno izražena sPLA2-X je ob povišani migraciji bistveno znižala invazivnost celic v zunajcelični matriks, zunajcelično delujoča sPLA2-X pa je pozitivno vplivala tako na migracijo kot na invazivnost celic. Kompleksen vpliv sPLA2 na celične procese je razviden tudi iz tega, da je eksogeno dodana rekombinantna sPLA2-IIA v odvisnosti od koncentracije lahko vzpodbujala ali zavirala rast celic MDA-MB-231. Naša začetna študija o vpletenosti sPLA2 v procese, ki vplivajo na rast in napredovanje raka dojke je torej zelo obetavna, saj prvič razkriva diferenčno izražanje sPLA2-IIA, -III, -V and -X v celicah raka dojke in predvsem kaže na tumor-supresorsko vlogo sPLA2-X.

V prvi fazi projekta smo identificirali predstavnike družine človeških sekretornih fosfolipaz A2 (sPLA2), ki kažejo različne stopnje izražanja v izbranih celičnih modelih raka dojke. Ugotovili smo, da se s spreminjanjem tumorigenih lastnosti celic raka dojke, ki odražajo napredovanje bolezni, od manj agresivnih in hormonsko občutljivih do bolj invazivnih in hormonsko neodvisnih oblik, spreminja tudi stopnja izražanja štirih človeških sPLA2 (sPLA2-IIA, -III, -V in -X) in nekaterih drugih encimov, ključnih za metabolizem arahidonske kisline oz. biosintezo prostaglandinov.

Celične linije. V skladu z načrtovanim programom projekta smo najprej vzpostavili pogoje za gojenje sedmih človeških celičnih linij dojke, epiteljskega ali tumorskega izvora, z različno stopnjo *in vitro* invazivnosti, tumorigenega potenciala in vivo in prisotnosti receptorjev steroidnih hormonov, ki smo jih pridobili v nizkih pasajah iz ameriške zbirke celic ATCC: MCF-7, T-47D, SK-BR-

3, MDA-MB-231, Hs578T, Hs578Bst in MCF-10A.

Določanje profilov izražanja sPLA2 in nekaterih genov, vpletenih v metabolizem arahidonske kisline v človeških celičnih linijah raka dojke. Za določanje profilov izražanja genov za izbrane proteine smo uporabili metodo kvantitativnega PCR v realnem času (real-time quantitative PCR, qPCR). Uporabili smo sistem LightCycler 480 (Roche) z barvilom SYBR Green I. Oligonukleotidne pare, specifične za določeno mRNA, smo načrtovali tako, da so regije pomnoževanja vključevale intronska zaporedja, da bi se izognili neželenemu pomnoževanju iz morebitnih sledov genomske DNA v vzorcih. Pogoje reakcij PCR smo optimizirali glede na temperaturo in čas prileganja, čas podaljševanja verige ter koncentracijo oligonukleotidov in cDNA. Specifičnost vsakega oligonukleotidnega para smo potrdili z analizo talilnih krivulj in agarozno elektroforezo po koncu vsake reakcije qPCR. Najustreznejše referenčne gene smo izbrali po natančni analizi nivojev izražanja osmih pogosto uporabljenih referenčnih genov. Pri tem smo uporabili programsko orodje GeNorm (Primer Design, VB). Dobljene podatke smo analizirali z relativno kvantifikacijo z upoštevanjem učinkovitosti reakcije in z normalizacijo s kalibratorjem. Na ta način smo uspešno določili raven in razlike v izražanju 19 izbranih genov v sedmih celičnih linijah: vseh desetih človeških sPLA2 (sPLA2 skupin IB, IIA, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA in XIIB), sPLA2-receptorja tipa M (sPLA2R), znotrajcelične PLA2 iz skupine VIA (iPLA2), citosolne PLA2 iz skupine IVA (cPLA2 α), ciklooksigenaz 1 in 2 (COX-1, COX-2), prostaglandin-E-sintaz 1 in 2 (PTGES1, PTGES2), estrogenskega receptorja beta (ESR2) in žilnega endotelijskega rastnega dejavnika A (VEGFA). Pri načrtovanju oligonukleotidov in validaciji metode smo sodelovali z dr. Gérardom Lambeaujem z IPMC, CNRS, Valbonne, Francija. Tako smo vzpostavili validirano metodo qPCR za analizo izražanja vseh človeških sPLA2 v celičnih in tkivnih vzorcih, ki bo zelo uporabna pri nadaljnjih raziskavah tako v naši programski skupini kot v laboratorijih tujih partnerjev.

Rezultati analize qPCR so v celoti potrdili našo osnovno hipotezo o spremembah v izražanju določenih sPLA2 pri celicah raka dojke z različnimi stopnjami invazivnih in tumorigenih lastnosti. Identificirali smo štiri predstavnike družine sPLA2 (sPLA2-IIA, -III, -V in -X), katerih razlike v izražanju nakazujejo na določeno vlogo pri posameznih razvojnih stopnjah raka dojke. V splošnem se sPLA2, z izjemo sPLA2 skupine XIIA (sPLA2-XIIA), v celičnih linijah dojke izražajo v nizkih količinah, kar je v skladu z izsledki dosedanjih raziskav njihovega izražanja v številnih človeških tkivih in celičnih kulturah. Tako so bili nivoji izražanja sPLA2-IB, sPLA2-IID, sPLA2-XIIB in sPLA2-IIE na meji oz. pod mejo detekcije metode v primeru slednje. Izražanje sPLA2-IIF je bilo prav tako zelo nizko, razen v celicah SK-BR-3, ki so po lastnostih na meji med celicami z izraženimi epitelijskimi markerji in nizkim tumorigenim potencialom (MCF-7, T-47D) in tistimi z visoko stopnjo invazivnosti in tumorigenih lastnosti (MDA-MB-231, Hs578T). Izredno zanimivi pa so profili izražanja sPLA2-IIA, sPLA2-III, sPLA2-V in sPLA2-X. Izražanje sPLA2-IIA je povišano v srednje in visoko tumorigenih celicah, sPLA2-III kaže povišano izražanje v šibko tumorigenih celicah, medtem ko je izražanje sPLA2-X izrazito povišano v šibko tumorigenih in izrazito znižano v močno tumorigenih celicah v primerjavi z nivoji izražanja v modelnih epitelijskih celicah. Izražanje sPLA2-V je izredno zanimivo zaradi visokega izražanja le v paru celičnih linij, ki izhajata iz zdravega oz. rakavega tkiva iste pacientke, epitelijskih Hs578Bst in invazivnih Hs578T. Po drugi strani pa pri izražanju PTGES1, PTGES2, sPLA2R, iPLA2 in, presenetljivo, tudi ESR2 in VEGFA, ni bilo pomembnih razlik med celičnimi linijami. Pri izražanju encimov z začetka kaskade metabolizma arahidonske kisline (cPLA2, COX-1 in COX-2) pa

smo zaznali pomembne razlike med celičnimi modeli. Njihovo izražanje v rakastih celicah dojke se je višalo sorazmerno s stopnjo tumorigenosti celic, presenetljivo pa je, da je bilo najvišje v netumorigenih celicah MCF-10A in Hs578Bst.

V skladu z načrtovanim programom smo se v nadaljevanju projekta osredotočili na preučevanje vpliva sPLA2 na proliferacijo in invazivnost celic raka dojke. V ta namen smo med identificiranimi sPLA2 (skupin IIA, III, V in X) kot prednostno pri preučevanju izbrali sPLA2 skupine X (sPLA2-X). S prekomernim izražanjem sPLA2-X v visoko invazivni celični liniji MDA-MB-231 smo opravili študije pridobitve funkcije ter pripravili rekombinantne sPLA2 z namenom preučiti vpliv eksogeno dodanih sPLA2 na celice raka dojke.

Priprava rekombinantnih sPLA2. V okviru projekta smo optimizirali metode za *in vitro* renaturacijo in čiščenje rekombinantnih encimov sPLA2-IIA in -X, pridobljenih v obliki inkluzijskih telesc v ekspresijskem sistemu bakterije *E. coli*. Pravilno zvitje, homogenost, čistost in funkcionalnost pridobljenih encimov smo potrdili z določanjem N-terminalnega aminokislinskega zaporedja, molekulske mase z masno spektroskopijo in specifične encimske aktivnosti na veziklih 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerola (POPG).

Detekcija sPLA2 v lizatih celic raka dojke in medijih na proteinskem nivoju.

Zaznava endogenih in celo ektopično prekomerno izraženih sPLA2 na ravni proteinov je dobro znana ovira pri raziskavah sPLA2 zaradi zelo nizke ravni izražanja sPLA2 v celicah, še nadaljnega redčenja fosfolipaznih encimov, izločenih v celični medij, in pomanjkanja razpoložljivih visoko specifičnih monoklonskih protiteles. Ugotovili smo, da celične linije raka dojke endogeno izražajo izredno nizke količine sPLA2, ki so pod mejo detekcije klasičnih metod imunskega prenosa in imunoprecipitacije. Po drugi strani pa smo v celičnih linijah, v katerih smo prehodno prekomerno izrazili posamezno sPLA2, lahko zaznali tako divji tip sPLA2, pri čemer smo morali testirati vrsto komercialno dostopnih protiteles proti sPLA2, kot tudi sPLA2 z dodanim C-terminalnim označevalcem V5, ki smo jih uspešno zaznali z monoklonskimi protitelesi proti V5. Prav tako smo optimizirali pogoje detekcije sPLA2 z uporabo protiteles, ki so jih pridobili v laboratoriju našega tujega partnerja Dr. Gérarda Lambeauja, IPMC, CNRS, Valbonne, Francija. V okviru projekta smo tako optimizirali eksperimentalne pogoje za detekcijo sPLA2-IIA in -X v transficiranih celicah in medijih s prenosom western in imunoprecipitacijo.

Priprava in analiza klonalnih celičnih linij, ki prekomerno izražajo sPLA2-X.

Naše študije pridobitve funkcije so temeljile na prehodnem ali stabilnem ektopičnem izražanju posamezne sPLA2 v celični liniji, ki je ne izraža ali pa jo izraža v zelo majhnih količinah. Zapis cDNA za sPLA2-X smo s pomočjo transfekcije vstavili v celice MDA-MB-231. Z metodo klonalne selekcije smo nato iz transficiranih celic pripravili sedem različnih klonov – novih celičnih linij, ki stabilno prekomerno izražajo sPLA2-X. To smo potrdili na nivoju mRNA s pomočjo qPCR in ugotovili, da je izražanje sPLA2-X v vseh klonih v povprečju za 7 velikostnih razredov višje od izražanja v celicah MDA-MB-231. Pri tem smo dobili vsaj tri klone (B1/C10, 1/F1 in B1/C5) z bistvenimi medsebojnimi razlikami v izražanju sPLA2, ki smo jih uporabili pri preučevanju vpliva sPLA2-X na različne lastnosti rakastih celic. S poskusi na pridobljenih klonih smo v nadaljevanju poskusili odgovoriti na vprašanje, ali prekomerno izražanje vstavljenega gena vpliva na sposobnost proliferacije rakavih celic oziroma na njihovo invazivnost.

Vpliv sPLA2 na viabilnost in proliferacijo visoko invazivnih celic raka dojke.

Z uporabo testa za ugotavljanje viabilnosti celic na osnovi redukcije metil-tiazolil-tetrazolijskega barvila MTT in proliferacijskega testa na osnovi vključevanja nukleozidnega analoga 5-etinil-2'-deoksiuridina (EdU) v novonastajajočo DNA delečih se celic smo ugotovili, da ektopično izražena sPLA2-X vpliva na rast rakastih celic MDA-MB-231. Celice B1/C10 so se bistveno počasneje podvojevale pri gojenju v kulturi v primerjavi z nespremenjenimi celicami MDA-MB-231, kar smo potrdili s štetjem celic in s kolorimetričnim testom MTT. V obdobju 72 ur se je število celic MDA-MB-231 povečalo 6,5-krat, število celic B1/C10 pa le 4,5-krat glede na začetno število celic. Rezultati poskusov z reagentom EdU, pri katerih smo zasledovali proliferativno aktivnost celic v obdobju 24 h, pa kažejo, da je delež celic B1/C10 in 1/F1, ki so v fazi S celičnega cikla, nekoliko večji kot pri celicah MDA-MB-231. Ti rezultati so nakazali na možnost, da počasnejša rast klonov B1/C10 in 1/F1 ni povezana s počasnejšo proliferativno aktivnostjo celic (podvajanjem DNA), temveč je lahko povezana z indukcijo celične smrti ali specifičnimi vplivi na celični cikel. V nadaljevanju projekta smo se odločili raziskati slednje hipoteze.

Po drugi strani pa smo z uporabo obeh metod ugotovili, da eksogeno dodana rekombinantna sPLA2-X povzroča časovno in koncentracijsko odvisno znižanje števila in proliferativne aktivnosti celic MDA-MB-231, kar kaže na različno delovanje zunajcelične, eksogeno dodane sPLA2-X in tiste, ki se izraža v celicah, ki jih opazujemo. Slednje nas ni presenetilo, saj v splošnem celična lokacija delovanja sPLA2 še ni poznana in možno je, da encim deluje že pred izločanjem iz celic, po izločanju na plazemski membrani celic ali po ponovnem vstopu v celico. Poskusi z eksogeno dodano rekombinantno sPLA2-IIA pa so pokazali, da je njen učinek na rast celic raka dojke v primerjavi s sPLA2-X manj izražen, saj smo za opazno znižanje števila celic tekom 72 h morali uporabiti visoko koncentracijo encima (1600 nM). Zanimivo pa je, da so nižje koncentracije encima (200 nM) povzročile celo rahlo povišanje števila celic, a le pri celicah, gojenih v prisotnosti seruma, kar nakazuje na možnost sinergističnega delovanja sPLA2-IIA in neznanega dejavnika iz seruma govejega zarodka (FBS-ja).

Analiza vpliva sPLA2-X na celični cikel s pretočno citometrijo. Glede na zgoraj opisane protislovne rezultate o viabilnosti in hitrosti proliferacije celic, ki stabilno izražajo sPLA2-X, smo v nadaljevanju analizirali proliferativne lastnosti transficiranih celic s pomočjo pretočne citometrije. V prvi fazi smo z uporabo DNA-barvila DAPI določili ploidijo in odstotek celic v fazi S celičnega cikla ("S-phase fraction" SPF). Ob nespremenjeni ploidiji celic je natančna analiza celičnega cikla pokazala, da je SPF pri celicah MDA-MB-231 in 1/F1 podoben in znaša v povprečju 34 % oz. 33 %, medtem ko je pri celicah B1/C10 ta odstotek znatno nižji (26 %). Hkrati smo pri celicah B1/C10 opazili večji odstotek celic v fazi G2/M celičnega cikla (26 %) v primerjavi s celicami MDA-MB-231 ali 1/F1 (17 %). Ti rezultati kažejo, da se celice s prekomerno izraženo sPLA2-X (B1/C10) zaustavijo v fazi G2/M celičnega cikla, s čimer bi lahko razložili po eni strani njihov daljši čas podvojevanja v kulturi, po drugi pa nekoliko večji odstotek celic, ki so vgradile EdU tekom 24-urnega testa proliferacije. Možno je, da zastoju v fazi G2/M sledi celična smrt, kar se ujema s počasnejšo rastjo in viabilnostjo celotne populacije celic B1/C10 v primerjavi s celicami MDA-MB-231. Hkrati si s tem lahko razlagamo večje količine vgrajenega EdU pri celicah B1/C10, saj lahko replikacija DNA v času 24-urnega testa proliferacije poteka pri večjem številu celic v populaciji, vendar je delitev pri določenem odstotku celic neuspešna in vodi do celične smrti. V ponovnem poskusu smo zato celice za krajši čas inkubirali z nukleozidnim analogom EdU (5 h) in jih analizirali na pretočnem

citometru s hkratno detekcijo z barviloma Alexa-488-azid, ki se veže le na z EdU označeno DNA, in Cell Cycle 633 (Invitrogen, ZDA), ki se veže na celotno DNA in omogoča hkratno analizo celičnega cikla. Na ta način smo ugotovili, da je odstotek celic B1/C10 in 1/F1 v fazi S dejansko nižji v primerjavi s celicami MDA-MB-231. Na podoben način smo z vrsto poskusov s prehodno transfekcijo celic z zapisom za sPLA2-X potrdili njen vpliv na zmanjšanje števila celic v fazi S celičnega cikla. Naši rezultati torej kažejo, da ima sPLA2-X negativen vpliv na rast visoko invazivnih celic MDA-MB-231, s tem da zniža odstotek celic v fazi S in povzroči zastoj v fazi G2/M celičnega cikla. V nadaljevanju našega dela na tej obetavni tematiki bomo izvedli več poskusov, s katerimi bomo ugotovili, ali sPLA2 inducirajo celično smrt z apoptozo v teh visoko invazivnih celicah raka dojke.

Vpliv sPLA2-X na celično migracijo in invazivnost. V času izvajanja projekta smo v našem laboratoriju vzpostavili in optimizirali tudi *in vitro* metodo za določanje kemotaktične migracije in invazivnosti in ugotovili, da celice, ki izražajo sPLA2-X, kažejo nižjo stopnjo invazivnosti skozi ekstrakt zunajceličnega matriksa (Matrigel, BD Biosciences) v primerjavi z nespremenjenimi celicami MDA-MB-231, po drugi strani pa je njihov migracijski potencial povišan. Povprečni indeks invazivnosti je v primeru celic MDA-MB-231 znašal 30 %, v primeru celic B1/C10 in 1/F1, ki prekomerno izražajo sPLA2-X, pa le 15 % in 6 %. Migracijski potencial teh celic skozi neprevlečene membrane pa je bil bistveno večji v primerjavi s celicami MDA-MB-231, kar kaže na različen vpliv sPLA2-X na invazivnost in migracijo. Dodatno, da smo preučili vpliv zunajcelične sPLA2-X, izločene iz celic B1/C10, na migracijo in invazivnost nespremenjenih celic MDA-MB-231, smo celice B1/C10 v odsotnosti seruma nacepili v spodnji, celice MDA-MB-231 pa v zgornji del komore. Ugotovili smo, da so celice MDA-MB-231 hitreje migrirale in vdirale skozi matrigel proti celicam B1/C10, kar kaže na pozitivni vpliv zunajcelične sPLA2-X na migracijo in invazivnost. Ti nasprotujoči si učinki endogeno sintetiziranega in izločenega ter eksogeno delujočega encima na invazivnost celic MDA-MB-231 kažejo na različne mehanizme delovanja sPLA2-X v odvisnosti od kombinacij avtokrinega in parakrinega delovanja sPLA2 tekom procesa izločanja iz celice, zunajceličnega delovanja ali internalizacije v isto ali sosednjo celico.

4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

Rezultati naše začetne študije so v popolnosti potrdili glavno hipotezo o vpletenosti nekaterih sPLA2 v razvoj in napredovanje raka dojke. Poglavitni cilj predlaganega projekta je bil identificirati te sPLA2 in določiti njihov vpliv na rast celic raka dojke in metabolizem arahidonske kisline. V skladu z načrtovanim planom projekta smo v prvem letu uspešno določili profile izražanja vseh človeških sPLA2 v sedmih celičnih modelih raka dojke in identificirali 4 diferencialno izražene sPLA2 in nekatere druge gene, vpletene v metabolizem arahidonske kisline. Diferenčno izražanje sPLA2 do sedaj še ni bilo pokazano pri raku dojke in kaže na specifične vloge posameznih encimov na različnih stopnjah razvoja bolezni. V drugem letu projekta smo se osredotočili na potrditev naše glavne hipoteze o vplivu sPLA2 na rast celic raka dojke. V skladu s planom in časovnim načrtom projekta je ta faza vključevala: pripravo rekombinantnih sPLA2, pripravo sesalskih ekspresijskih vektorjev za sPLA2, prehodno in stabilno ektopično izražanje sPLA2 v sesalskih celicah, optimizacijo in analizo izražanja sPLA2 z imunodetekcijo ter določanje vpliva ektopično izraženih in eksogeno dodanih sPLA2 na rast celic. Rezultati te faze so potrdili našo osnovno hipotezo in so

pokazali, da sPLA2-IIA in sPLA2-X vplivata na viabilnost in proliferacijo celic raka dojke. Izredno zanimivi rezultati o učinkih sPLA2 na število, viabilnost in proliferativno aktivnost visoko invazivnih celic raka dojke so nas na tej točki vzpodbudili k spremembi načrta, da bi podrobneje analizirali omenjene učinke. Dodatno so bili naši pridobljeni začetni rezultati o vplivu sPLA2-X na celično migracijo in invazivnost zelo vzpodbudni. Zato smo se odločili, čeprav v nasprotju s predlaganim planom projekta, da tretjo fazo le-tega posvetimo poglobljeni analizi učinkov sPLA2-X na celični cikel, proliferacijo, invazivnost in migracijo. Posledično smo, zaradi časovnih in finančnih omejitev tega majhnega projekta, morali izpustiti planirano analizo vpliva sPLA2 na sproščanje arahidonske kisline iz celic in študije izgube funkcije. Naše delo v zadnji fazi projekta pa je potrdilo pravilnost te odločitve, saj smo dobili nepričakovane in izjemno pomembne rezultate, še posebej glede vpliva sPLA2-X na celični cikel in invazivnost, s katerimi se porajajo nove ideje in smeri raziskovanja o vplivu sPLA2 na rast in invazivnost tumorjev. Naša začetna študija o vpletenosti sPLA2 pri raku dojke je torej zelo obetavna, saj prvič razkriva diferencialno izražanje sPLA2-IIA, -III, -V and -X v celicah raka dojke in, kar je še pomembneje, kaže na vlogo sPLA2-X pri zaviranju njihove rasti in invazivnosti.

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

Bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta ter povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine ni bilo.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

		Znanstveni rezultat	
1.	Naslov	SLO	Strukturni model proteinskega kompleksa med kalmodulinom in sekretorno fosfolipazo A2
		ANG	Structural model of the protein complex between calmodulin and secreted phospholipase A2
	Opis	SLO	Nevrotoksična sekretorna fosfolipaze A2, amoditoksin, se z visoko afiniteto veže na kalmodulin (CaM), kar vodi v njegovo stabilizacijo v redukcijskih pogojih in dvig encimske aktivnosti tako v redukcijskih kot tudi v neredukcijskih pogojih. Zgradili smo energetsko najbolj ugoden model kompleksa, s katerim smo na strukturni ravni razložili omenjene opažene učinke. Na osnovi modela smo predlagali, da strukturno podobne sesalske sPLA2 skupin V in X, ne pa IB in IIA, tvorijo stabilni kompleks, kar naj bi tudi vodilo v povišanje njihove encimske aktivnosti. To smo tudi eksperimentalno potrdili.
		ANG	A neurotoxic secreted phospholipase A2, ammodyotoxin, forms a high-affinity complex with calmodulin (CaM) which leads to increase of its stability and enzymatic activity. We generated energetically the most favorable model of the complex. It explains, in structural terms, all of the effects observed. Based on the proposed structure we suggested that structurally similar mammalian sPLA2s of groups V and X, but not of IB and IIA, form stable complexes with CaM, which should also result in the augmentation of their catalytic activity. By confirming the latter, the model was validated.
	Objavljeno v	Kovačič, L., Novinec, M., Petan, T. and Križaj, I. (2010) Structural basis of the significant calmodulin-induced increase in the enzymatic activity of secreted phospholipases A2. Protein Eng. Des. Sel. 23, 479-487.	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
COBISS.SI-ID	23512103		
2.	Naslov	SLO	Bakterijsko izražanje in enostavno čiščenje človeške sekretorne fosfolipaze A2 skupine X
			Bacterial expression and simple purification of human group X secretory

	ANG	phospholipase A2
Opis	SLO	V članku smo opisali razvoj našega učinkovitega ekspresijskega sistema bakterije <i>Escherichia coli</i> , kot tudi in vitro renaturacijo in enostaven postopek čiščenja, ki omogoča donos do 10 mg človeške sPLA2-X na liter kulture. Za razliko od naravnega proteina je bil rekombinantni encim pridobljen v bakterijskih celicah brez N-terminalnega propeptida, tj. kot zrel protein, in ni bil N-glikoziliran, je pa zadržal vse encimske lastnosti pri hidrolizi vezikularnih substratov s fosfatidilglicerolom ali fosfatidilholinom.
	ANG	We developed an effective <i>Escherichia coli</i> expression system, together with an in vitro refolding and simple purification procedure, which yields up to 10 mg of mature human sPLA2-X from a litre of culture. In contrast to the natural protein, the recombinant enzyme was produced in bacterial cells without the N-terminal propeptide, i.e. as a mature protein, and was not N-glycosylated. It however retained all the enzymatic properties for hydrolysis of vesicular substrates composed of either phosphatidylglycerol or phosphatidylcholine.
Objavljeno v		Jerman, B. and Pungerčar, J. (2010) Bacterial expression and simple purification of human group X secretory phospholipase A2. <i>Acta Chim. Slov.</i> 57, 888-894.
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
COBISS.SI-ID		24268839
3. Naslov	SLO	Sekretorne fosfolipaze A2 ter njihova fiziološka in patofiziološka vloga
	ANG	Secretory phospholipase A2 enzymes, and their physiological and pathophysiological roles
Opis	SLO	Pri sesalcih je bilo doslej prepoznanih 29 fosfolipaz A2, ki delujejo znotraj- in/ali zunajcelično. Večino slednjih predstavljajo sekretorne fosfolipaze A2, ki so kot encimi ali ligandi za različne receptorje vpletene v številne fiziološke in patološke procese. To je spodbudilo farmacevtska podjetja k intenzivnemu razvoju specifičnih inhibitorjev za lajšanje, preprečevanje in zdravljenje obolenj, povezanih s sekretornimi fosfolipazami A2, kot so npr. vnetja, ateroskleroza, nevrodegenerativna in rakava obolenja.
	ANG	In mammals, 29 enzymes with phospholipase A2 activity, which act intra- and/or extracellularly, have been identified. Most of the latter are secretory phospholipases A2. By their enzymatic activity or by binding to receptors, as ligands, sPLA2s play an important role in a variety of physiological and pathological processes. This has attracted the interest of pharmaceutical companies in developing sPLA2 inhibitors which could be helpful in sPLA2 related diseases, such as inflammation, atherosclerosis, neurodegeneration and cancer.
Objavljeno v		Jerman, B. and Pungerčar, J. (2008) Sekretorne fosfolipaze A2 in njihova (pato)fiziološka vloga / Secretory phospholipase A2 enzymes and their (patho)physiological role. <i>Farm. Vestn.</i> 59, 9-15.
Tipologija		1.02 Pregledni znanstveni članek
COBISS.SI-ID		21552167
4. Naslov	SLO	Kalmodulin deluje kot neesencialni aktivator sekretornih fosfolipaz A2
	ANG	Calmodulin acts as a non-essential activator of secreted phospholipases A2
Opis	SLO	Kalmodulin stabilizira konformacijo nevrotoksične sekretorne fosfolipaze A2 skupine IIA, amoditoksina, in hkrati poviša njeno encimsko aktivnost. Dobljeni rezultati ne dajejo le vpogleda v nevrotoksično delovanje amoditoksinov, temveč tudi v mehanizme, ki so vključeni v regulacijo delovanja strukturno podobnih sesalskih sPLA2, kot npr. skupin V in X, v citosolu.
	ANG	Calmodulin stabilizes the conformation of a group IIA neurotoxic secreted PLA2, amodytoxin, and thereby restores its activity. These results provide insights not only into the neurotoxic action of amodytoxins, but also into the mechanisms involved in the regulation of activity of structurally similar sPLA2s, such as mammalian group V and X enzymes, within the cytosol.
Objavljeno v		Kovačič, L., Novinec, M., Petan, T., Baici, A. and Križaj, I. (2009) Calmodulin is a non-essential activator of secretory phospholipase A2. <i>Biochemistry</i> 48, 11319-11328.
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

	COBISS.SI-ID	23138087
5.	Naslov	SLO
		ANG
	Opis	SLO
		ANG
	Objavljeno v	
	Tipologija	
	COBISS.SI-ID	

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine⁶

Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat			
1.	Naslov	SLO	Študij sekretornih fosfolipaz A2 na celičnih modelih raka dojke
		ANG	Study of the secretory phospholipases A2 on cell models of breast cancer
	Opis	SLO	V projekt je bila s temo doktorske naloge vključena mlada raziskovalka Anja Pucer, vpisana v program Nanoznanosti in nanotehnologije na Mednarodni podiplomski šoli Jožefa Stefana. Pripravila je vektorje z zapisi za izbrane humane sPLA2 in nekatere druge encime, ki jih namerava z metodo transfekcije vstaviti v različne sesalske celice. Tako bo v posameznih celičnih modelih mogoče opazovati učinek prekomernega izražanja posameznega gena na proliferativne lastnosti in in vitro invazivnost. Razvila je tudi celično linijo raka dojke MDA-MB-231, ki stabilno prekomerno izraža humano sPLA2-X.
		ANG	Young researcher Anja Pucer has been involved in the project with her doctoral thesis program, within the program Nanoscience and Nanotechnologies, at the Jozef Stefan International Postgraduate School. She constructed several vectors harboring genes of selected human sPLA2s and some other enzymes, aimed to transfect them into different mammalian cells. On the cellular models, she will study the effects of overexpression of each gene on proliferation and in vitro invasiveness. Anja also prepared a breast cancer cell line MDA-MB-231 that stably overexpressed human sPLA2-X.
	Šifra	D.09 Mentorstvo doktorandom	
	Objavljeno v	Neobjavljeno	
	Tipologija	3.25 Druga izvedena dela	
	COBISS.SI-ID	00000000	
	2.	Naslov	SLO
ANG			Educational activities
Opis		SLO	Prof. Jože Pungerčar je nosilec in predavatelj dveh dodiplomskih predmetov na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani. V zadnjem obdobju je bil mentor pri več diplomskih in doktorskih delih (3 diplomska dela, ki so v zaključni fazi, so s področja projekta). Sodeluje pri treh interdisciplinarnih doktorskih študijskih programih, in sicer na Mednarodni podiplomski šoli Jožefa Stefana v Ljubljani ter Medicinski fakulteti in Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Pedagoško sta precej aktivna tudi ostala dva člana projektne skupine, prof. Igor Križaj in doc. Toni Petan.
		ANG	Prof. Jože Pungerčar is a lecturer of two undergraduate subjects at the Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana (UL). In the last period he mentored several BSc and PhD theses (3 BSc theses, all in the final stage, are from the field of this project). He is participating at three interdisciplinary doctoral programmes, at the Jozef Stefan International Postgraduate School in Ljubljana, and the Medical Faculty and the Biotechnical Faculty, UL. Two other members of the project group, Prof. Igor Križaj and Assist. Prof. Toni Petan, are also educationally very active.
Šifra	D.10 Pedagoško delo		

	Objavljeno v	http://www.fkkt.uni-lj.si/ , http://www.cobiss.si/ , http://www.mps.si/ , http://www.bioznanosti.si/	
	Tipologija	3.25 Druga izvedena dela	
	COBISS.SI-ID	0000000	
3.	Naslov	SLO	Soustanovitelji in partnerji Centra odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov (CIPKeBiP)
		ANG	Co-founders and partners of the Centre of Excellence for Integrated Approaches in Chemistry and Biology of Proteins (CIPKeBiP)
	Opis	SLO	CIPKeBiP povezuje znanje, izkušnje in tehnologije vrhunskih slovenskih raziskovalnih skupin, ki se ukvarjajo z raziskovanjem proteinov ter njihovih lastnosti in funkcij. Center vključuje deset organizacij iz centralne in severovzhodne Slovenije, med njimi pet podjetij. Partnerji se osredotočamo na specifične biološke probleme visoke znanstvene in biomedicinske relevance (infekcijske bolezni, signalne poti) in pomembne za okolje (adaptacija ekstremofilnih organizmov). Izsledke in znanja iz raziskav bomo uporabili pri razvoju procesov in znanja pri skupnih projektih z industrijskimi partnerji.
		ANG	CIPKeBiP is connecting the top available expertise, knowhow, and technology of Slovenian research laboratories in protein science, thus emphasizing biomedical relevance of the applied project (priority health and life sciences). The Centre includes ten partner institutions from central and northeastern region of Slovenia, among them five industrial entities. We are focused on specific biological issues of high scientific relevance and of high biomedical (infectious diseases, signaling pathways) and environmental (adaption mechanisms of extremophiles) importance.
	Šifra	D.02 Ustanovitev raziskovalnega centra, laboratorija, študija, društva	
	Objavljeno v	http://www.cipkebiP.org/	
	Tipologija	3.25 Druga izvedena dela	
	COBISS.SI-ID	0000000	
4.	Naslov	SLO	Vabljen predavanje o fosfolipazah A2
		ANG	Invited lecture on phospholipases A2
	Opis	SLO	Prof. Jože Pungerčar je imel vabljen predavanje na mednarodnem znanstvenem srečanju, v katerem je med drugim predstavil naše zadnje rezultate raziskovanja molekulskega mehanizma delovanja presinaptičnih fosfolipaznih nevrotoksinov na osnovi celičnega modela motoričnih nevronov in na dejanskem živčno-mišičnem sistemu. Prvič doslej je bilo jasno pokazano, da lahko ti nevrotoksini vstopijo v celice motoričnih nevronov, kjer encimsko delujejo na različne celične membrane in z vezavo na določene znotrajcelične vezavne/tarčne proteine ovirajo njihovo fiziološko delovanje.
		ANG	Prof. Jože Pungerčar had an invited lecture at the international scientific meeting, where he presented the latest results of our study of the molecular mechanism of presynaptic phospholipase neurotoxins using a cellular model of motoneurons and the actual neuromuscular (in vivo) system. For the first time, it has been clearly shown, that these neurotoxins are able to internalize into the cells of motoneurons, where they enzymatically act on various cellular membranes and bind to certain intracellular target/binding proteins, thus interfering with their physiological action.
	Šifra	B.04 Vabljen predavanje	
	Objavljeno v	Pungerčar, J., Jenko Pražnikar, Z., Logonder, U., Kovačič, L., Scott-Davey, T., Harris, J. B. and Križaj, I. (2009) Neurotoxicity of snake venom phospholipases A2 is mediated by their internalization into motor nerve terminals. V: Goličnik, Marko (Ed.), Bavec, Aljoša (Ed.). Joint Congress of the Slovenian Biochemical Society and the Genetic Society of Slovenia with International Participation, Otočec, Slovenia, str. 53.	
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci		
COBISS.SI-ID	512085305		
5.	Naslov	SLO	Lapanjetovo priznanje
		ANG	Lapanje Young Award
		Doc. Toni Petan je v letu 2010 prejel Lapanjetovo priznanje, ki ga Slovensko	

Opis	SLO	biokemijsko društvo podeljuje mlademu članu za vrhunske dosežke na področju biokemijskih znanosti.
	ANG	Assist. Prof. Toni Petan received in 2010 Lapanje Award for Young Scientists, which is granted by the Slovenian Biochemical Society to a young member for outstanding achievements in the field of biochemical sciences.
Šifra	E.01	Domače nagrade
Objavljeno v	http://www.sbd.si/sl/nagrajenci/11/lapajnetovo-priznanje/toni-petan	
Tipologija	3.25	Druga izvedena dela
COBISS.SI-ID	0000000	

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

Rezultati dosežkov raziskovalnega projekta so bili predstavljeni na več znanstvenih srečanjih, kot npr.:

COBISS.SI-ID: 23610919

Opis: Ugotovili smo, da se sPLA2 skupine X prekomerno izraža le v zmerno tumorigenih celičnih linijah, medtem ko njenega izražanja skorajda nismo zasledili v visoko tumorigenih in invazivnih rakastih celicah. Da bi analizirali vpliv povečanega izražanja sPLA2 v visoko invazivnih celicah, smo razvili novo celično linijo, ki je prekomerno izražala sPLA2 skupine X. Rezultati so pokazali, da 10-milijonkratno povečanje izražanja sPLA2-X v visoko invazivnih rakastih celicah MDA-MB-231 privede do znatnega zmanjšanja hitrosti proliferacije in spremeni njihove invazivne lastnosti.

Objava: Pucer, A., Pungerčar, J. and Petan, T. (2010) Priprava in analiza celične linije raka dojke s prekomerno izraženo sekretorno fosfolipazo A2 skupine X / Generation and analysis of a breast cancer cell line overexpressing group X secreted phospholipase A2. 4. dan mladih raziskovalcev KMBO, Ljubljana, Slovenija, str. 81.

COBISS.SI-ID: 23611175

Opis: Diferenčni vzorci izražanja sPLA skupin IIA, III, V in X kažejo na možno vlogo sPLA2 pri človeškem raku dojke in da imajo lahko te sPLA2 specifične vloge na različnih stopnjah razvoja te bolezni. Naši rezultati so dodatno pokazali, da prekomerno izražanje sPLA2 skupine X v visoko invazivnih celicah raka dojke MDA-MB-231 privede do občutnega zmanjšanja hitrosti njihove proliferacije in invazivnega potenciala. Prav tako zmanjša hitrost proliferacije rakastih celic MDA-MB-231 tudi eksogeni dodatek rekombinantne človeške sPLA2 skupine X, pridobljene v našem bakterijskem ekspresijskem sistemu.

Objava: Pucer, A., Mounier, C. M., Lambeau, G., Pungerčar, J. and Petan, T. (2010) Differential expression of the full set of human secretory phospholipases A2 in breast cell lines. 6th Conference on Experimental and Translational Oncology, Kranjska gora, Slovenia, str. 126.

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

9.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

Proučevanje vloge sekretornih fosfolipaz A2 (sPLA2) pri fizioloških in bolezenskih procesih pri človeku je v zadnjem času zelo aktualno, še posebej v povezavi z metabolizmom arahidonske kisline in biosintezo eikozanoidov. Vloga sPLA2 pri razvoju raka dojk, najpogostejšem raku žensk v razvitem svetu, pa je še posebej neraziskana. Raziskovanje vpletenosti posameznih sPLA2 v metabolizem arahidonske kisline v povezavi z rakom dojke po eni strani prispeva k boljšemu razumevanju celičnih procesov, ki vplivajo na nastanek in razvoj raka dojke, po drugi strani pa odpira nove raziskovalne poti tudi pri študiju drugih vrst raka. Izsledki naših raziskav bodo vplivali tako na razvoj temeljnega znanja o mehanizmih delovanja sPLA2 in metabolitov arahidonske kisline kot na razvoj raziskovalnih smeri pri iskanju novih kemopreventivnih in/ali kemoterapevtskih učinkovin, ki bodo delovale na osnovi preprečevanja celotne biosintezne poti eikozanoidov.

ANG

The role of secretory phospholipases A2 (sPLA2s) in different physiological and pathophysiological processes is a topic that currently receives a lot of attention in the scientific community, especially with regard to the arachidonic acid metabolism and eicosanoid biosynthesis. However, the role of sPLA2s in breast cancer, the most common type of cancer among women in the developed world, has not been addressed to a significant extent yet. Our

initial study of the role of sPLA2s in the arachidonic acid metabolism and its connection to breast cancer will presumably not only contribute to a better understanding of the cellular processes that enable breast cancer development and progression, but may also have an impact on research development in cancer in general. The results of the project represent an important contribution to our current knowledge of the mechanisms of action of sPLA2s and arachidonic acid metabolites in different physiological settings. Additionally, our study may open the way to developing new chemopreventive and/or chemotherapeutic modalities, based on inhibition of the eicosanoid biosynthetic pathway as a whole.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Projekt je bil v skladu z Resolucijo o nacionalnem raziskovalnem in razvojnem programu 2006-2010 in s prvo tematsko prioriteto javnega razpisa: Raziskovanje genomike in biotehnologije za zdravje, kakovost in varnost živil ter trajnostnega razvoja.

Dolgoročni cilj projekta je bil razvoj novih pristopov preprečevanja in zdravljenja rakavih obolenj na osnovi novih inhibitorjev ali drugih medicinsko pomembnih spojin, ki bi vplivali na delovanje sPLA2 in/ali metabolizem arahidonske kisline. Farmakološko zanimivi rezultati bi lahko omogočili poglobitev sodelovanja s farmacevtsko industrijo in razvoj tesnejšega sodelovanja med gospodarstvom in raziskovalno sfero v Sloveniji. Nove metode preprečevanja in zdravljenja raka dojke bi pomembno prispevale k manjši pojavnosti bolezni, preprečevanju ponavljanja bolezni in manjši smrtnosti obolelih za rakom dojke, kar bi ugodno vplivalo na družbeno-ekonomski razvoj Slovenije. V Sloveniji namreč za rakom dojke letno zbolijo okoli 1.000 žensk, umre pa jih okoli 400. Po napovedih epidemioloških raziskav naj bi se v prihodnosti število obolelih še povečalo.

Nove metode preprečevanja in zdravljenja raka dojke bi lahko bistveno prispevale k izboljševanju kvalitete življenja obolelih za rakom dojke, ki se, poleg neposrednih zdravstvenih težav, dolgoročno soočajo s psihološkimi in sociološkimi problemi. Poleg tega smo pri izvajanju projekta posredno prispevali k izobraževanju in razvoju strokovnih kadrov. V okviru raziskav so se v okviru doktorskega študija izobraževali mladi raziskovalci, vključili pa smo tudi dodiplomske študente s pripravo diplomskih del. V naše raziskave smo prav tako vključili nekatere tuje raziskovalce, s katerimi želimo nadaljevati sodelovanje tudi v prihodnje.

Verjamemo, da smo že z dosedanjimi rezultati projekta, publikacijami in predstavitvami na mednarodnih znanstvenih srečanjih večali prepoznavnost in znanstveni ugled Slovenije v svetu.

ANG

This project was harmonized with the National Research and Development Programme 2006-2010 and with the first thematic priority of the Public Call: Genomic research and biotechnology for health, quality and safety of food, and sustainable development.

The long-term objective of our project was the development of alternative ways to prevent and treat cancer on the basis of inhibitors, or other medically important agents, which would interfere with the action of sPLA2s and/or the arachidonic acid metabolism. Pharmacologically interesting results could enable further strengthening of our collaboration with the pharmaceutical industry and improvement of the relationship between the scientific community and the economy in Slovenia. The development of new methods for prevention and/or treatment of breast cancer could have an important role in the efforts to lower the incidence and reoccurrence of this common disease, as well as lower the mortality rates of breast cancer patients, thereby positively influencing the socio-economic development of Slovenia. Namely, the incidence of breast cancer in Slovenia is about 1.000 cases per year and 400 women die every year due to the disease. According to the predictions of epidemiological studies the incidence of breast cancer in Slovenia is still expected to rise in the future.

The development and implementation of alternative strategies for prevention and treatment of breast cancer could have a significant impact on the improvement of the quality of life of breast cancer patients, which are confronted with long-term psychological and sociological problems in addition to their health concerns. Apart from that, the project already had a significant impact on the field of education and provided training of new research professionals in the field of life sciences. In the course of the proposed project young researchers (graduate students) were trained and undergraduate students were involved in the project during their work on the diploma theses. We also included in our study several foreign researchers and we would like to continue this collaboration also in the future. In addition, we believe that our work within the project already had a positive impact on the recognition and scientific reputation of Slovenia, especially through publications in international peer-reviewed journals and presentations at international scientific meetings.

10. Samo za aplikativne projekte!

Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri aplikativnem projektu, katere

konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
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!

Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visoko-šolskega 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="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"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo:	<input type="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:		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
--------------	---------------	--	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	--

Komentar

--

12. Pomen raziskovanja za sofinancerje, navedene v 2. točki [12](#)

1.	Sofinancer		
	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			
2.	Sofinancer		
	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			
3.	Sofinancer		
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%

Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja		Šifra
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
Komentar		
Ocena		

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja, za objavo 6., 7. in 8. točke na spletni strani <http://sicris.izum.si/> 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:

Jože Pungerčar	in	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščenca oseba RO

Kraj in datum:

Ljubljana

21.4.2011

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/101

¹ Zaradi spremembe klasifikacije družbeno ekonomskih ciljev je potrebno v poročilu opredeliti družbeno ekonomski cilj po novi klasifikaciji. [Nazaj](#)

² Samo za aplikativne projekte. [Nazaj](#)

³ Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja ter rezultate in učinke raziskovalnega projekta. Največ 18.000 znakov vključno s presledki (približno tri strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti 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 (obrazložitev). V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁶ Navedite največ pet najpomembnejših znanstvenih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov v slovenskem in angleškem jeziku (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki) v slovenskem in angleškem jeziku, navedite, kje je objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote.

Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>.

PRIMER (v slovenskem jeziku):

Naslov: Regulacija delovanja beta-2 integrinskih receptorjev s katepsinom X;

Opis: Cisteinske proteaze imajo pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju raka. Zadnje študije kažejo njihovo povezanost s procesi celičnega signaliziranja in imunskega odziva. V tem znanstvenem članku smo prvi dokazali... (največ 600 znakov vključno s presledki)

Objavljeno v: OBERMAJER, N., PREMZL, A., ZAVAŠNIK-BERGANT, T., TURK, B., KOS, J.. Carboxypeptidase cathepsin X mediates $\beta 2$ - integrin dependent adhesion of differentiated U-937 cells. Exp. Cell Res., 2006, 312, 2515-2527, JCR IF (2005): 4.148

Tipologija: 1.01 - Izvirni znanstveni članek

COBISS.SI-ID: 1920113 [Nazaj](#)

⁷ Navedite največ pet najpomembnejših družbeno-ekonomsko relevantnih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki), izberite ustrezen rezultat, ki je v Sifrantu raziskovalnih rezultatov in učinkov (Glej: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/sif-razisk-rezult.asp>), navedite, kje je rezultat objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote.

Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>. [Nazaj](#)

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki. [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/prepišite skladno z obrazcem "Izjava sofinancerja" (<http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>), ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2011-1 v1.01

F6-BF-3E-2F-A1-E0-56-B5-5D-66-9D-BA-E0-12-29-B8-E8-5C-1F-22