

Oznaka poročila: ARRS-RPROG-ZP-2015/140



## ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROGRAMA

(za obdobje 1. 1. 2009 - 31. 12. 2014)

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROGRAMU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem programu

<b>Šifra programa</b>	P3-0310	
<b>Naslov programa</b>	Celična fiziologija1 10-7 Cell Physiology	
<b>Vodja programa</b>	3702 Robert Zorec	
<b>Obseg raziskovalnih ur (vključno s povečanjem financiranja v letu 2014)</b>	50376	
<b>Cenovni razred</b>	C	
<b>Trajanje programa</b>	01.2009 - 12.2014	
<b>Izvajalci raziskovalnega programa (javne raziskovalne organizacije - JRO in/ali RO s koncesijo)</b>	381 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta 1683 CELICA, biomedicinski center, d.o.o. 2334 Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta	
<b>Raziskovalno področje po šifrantu ARRS</b>	3 MEDICINA 3.03 Nevrobiologija	
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	13.03 Medicinske vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)	
<b>Raziskovalno področje po šifrantu FOS</b>	3 Medicinske vede 3.01 Temeljna medicina	

### B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROGRAMA

#### 2. Povzetek raziskovalnega programa<sup>1</sup>

SLO

Dolgoročni cilj programa P3 310 CELIČNA FIZIOLOGIJA je razumeti mehanizme, s katerimi celice med seboj komunicirajo v normalnih in patoloških razmerah.

Pomemben proces komunikacij epredstavlja eksocitoza, ki vodi v nastanek fuzijske pore, ozkega vodnega kanala, preko katerega se vsebina mešička izloči v zunajcelični prostor (1). Eksocitoza ni prisotna zgolj v nevronih. Najdemo jo praktično v vseh evkariontskih celicah in ta proces smo študirali v različnih tipih celic: v hipofiznih celicah, v astrocitih, v adipocitih, v klonalnih celicah, da bi si odgovorili na specifična vprašanja, ki so povezana:

- i. z mehanizmi transporta mešičkov do in od plazemske membrane,
- ii. z mehanizmi fuzije membrane mešička s plazmalemo in drugimi mešički,
- iii. z mehanizmi citosolnega signaliziranja, ki uravnava transport mešičkov in fuzijo mešičkov s plazmalemo,
- iv. s procesi celične fiziologije v tkivnih rezinah.

V obdobju 2009-2014 so naše raziskave zelo napredovale in utrdile mednarodno prepoznavnost. Citiranost naših del se je na letni ravni več kot podvojila:

<http://izumbib.izum.si/bibliografije/W20140412121614-P3-0310.html>

Napredek je na kratko predstavljen, kakor sledi:

**TRANSPORT MEŠIČKOV:** Raziskovali smo naravo mobilnosti mešičkov v astrocitih in ugotovili, da je mobilnost mešičkov odvisna od vsebine mešička (2, 3) od fiziološkega stanja celic (4-9). Naše raziskave so pokazale, da Fingolimod (Gilenya), prvo oralno zdravilo družbe Novartis za zdravljenje multiple skleroze (10), vpliva na transport mešičkov. V nasprotju s pogledom, da je mehanizem delovanja Fingolimoda indirektn, preko učinkovanja na imunski sistem (11), so naši rezultati pokazali, da Fingolimod in njemu podobni lipidi neposredno delujejo na nevroglio v možganih, specifično na transport mešičkov (12).

**MEŠIČKI IN FUZIJA MEMBRAN:** Rezultati poskusov, ki smo jih v našem laboratoriju pridobili v obdobju 2009-2014 so razkrili, da je potrebno konvencionalne razlage, ki so nastale pred nekaj desetletji (13), nadgraditi. Kar so pokazala objavljena dela (14-23 in 40-41).

**CITOSOLNO SIGNALIZIRANJE IN METABOLIZEM:** Za študij uravnavanja transporta mešičkov in fuzije membrane smo uvedli nove metode, kakor na primer spremljanje cAMP in citosolne aktivnosti glukoze in objavili več del (24-32).

**CELIČNA FIZIOLOGIJA V TKIVNIH REZINAH IN MODELI BOLEZNI:** V obdobju 2009-2014 smo objavili več člankov, kjer smo študirali od glukoze odvisne spremembe citosolne koncentracije kalcija v celicah v Langerhansovih otočjih akutno pripravljenih rezin trebušne slinavke (33 -39).

V oklepajih so reference, ki so razvrščene v točki 3.

ANG

The long term goal of the Programme P3 310 CELL PHYSIOLOGY is to understand the mechanisms by which cells communicate with each other in normal and pathologic conditions.

A key process mediating cell-to-cell communication regulated exocytosis which leads to the formation of a water filled fusion pore, which mediates the exit of molecules, stored in the vesicle lumen, into the extracellular space (1). Exocytosis is not exclusively present in neurones. All other eukaryotic cells exhibit this process, and we have studied several cell types, including pituitary cells,

astrocytes, adipocytes, clonal cells to address specific questions related to the:

- i. mechanisms of vesicle trafficking to and from the plasma membrane,
- ii. mechanisms of vesicle fusion with the plasma membrane and between other vesicles,
- iii. mechanisms of cytosolic signalling regulating vesicle traffic and vesicle membrane fusion,
- iv. cell physiology in tissue slices.

During 2009-2014 we have made significant advances with a global impact. Citations were more than doubled in these years:

<http://izumbib.izum.si/bibliografije/W20140412121614-P3-0310.html>

In brief the progress of the work is as follows.

**VESICLE TRAFFIC:** We have characterized the nature of vesicle traffic in astrocytes and found that vesicle traffic depends on the vesicle cargo (2, 3), physiological state of cells (4-9). We discovered that Fingolimod (Gilenya), introduced by Novartis recently as the first oral drug to treat multiple sclerosis (10), affects vesicle traffic. In contrast to the believe that the mode of action of this drug is indirect via the immune system (11), our results have shown that Fingolimod and similar lipids target directly neuroglia in the brain, specifically vesicle traffic (12).

**VESICLE AND MEMBRANE FUSION:** The experimental evidences gathered in our laboratories during the period 2009-2014 revealed that the conventional view developed several decades ago (13) needs upgrading (14-23 and 40-41).

**CYTOSOLIC SIGNALLING AND METABOLISM:** To study the regulation of vesicle traffic and membrane fusion we introduced new methods, such as monitoring cAMP and cytosolic glucose were introduced and used in publications (24-32).

**CELL PHYSIOLOGY IN TISSUE SLICES AND DISEASE MODELS:** During 2009-2014 several papers have been published studying glucose-stimulated calcium dynamics in cells from islets of Langerhans in acute pancreas tissue slice (33-39).

References (in parentheses) are listed in point 3.

**3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem programu, (vključno s predloženim dopolnjenim programom dela v primeru povečanja financiranja raziskovalnega programa v letu 2014)<sup>2</sup>**

SLO

V skladu z načrtom ob prijavi programa raziskav, ugotavljamo, da smo realizirali vse načrtovane raziskovalne dejavnosti.

Reference iz točke 2:

1. Vardjan N, *et al.* (2013) *Neuroscientist* 19(2):160-174.
2. Potokar M, *et al.* (2011) *Histol Histopathol* 26(2):277-284.
3. Potokar M, *et al.* (2013) *Int J Mol Sci* 14(6):11238-11258.

4. Potokar M, *et al.* (2010) *Glia* 58(10):1208-1219.
5. Stenovec M, *et al.* (2011) *Acta Physiol (Oxf)* 203(4):457-471.
6. Vardjan N, *et al.* (2012) *J Neuroinflammation* 9:144.
7. Potokar M, *et al.* (2008) *Glia* 56(2):135-144.
8. Potokar M, *et al.* (2012) *Glia* 60(4):594-604.
9. Wilhelmsson U, *et al.* (2012) *Stem Cells* 30(10):2320-2329.
10. Brinkmann V, *et al.* (2002) *J Biol Chem* 277(24):21453-21457.
11. Matloubian M, *et al.* (2004). *Nature* 427(6972):355-360.
12. Trkov S, *et al.* (2012). *Glia* 60(9):1406-1416.
13. Katz B (1969) *The release of neural transmitter substances* (Liverpool University Press, Liverpool) p 60.
14. Jorgacevski J, *et al.* (2010) *Mol Membr Biol* 27(2-3):65-80.
15. Vardjan N, *et al.* (2007) *J Neurosci* 27(17):4737-4746.
16. Jorgacevski J, *et al.* (2011) *J Neurosci* 31(24):9055-9066.
17. Calejo AI, *et al.* (2013) *J Neurosci* 33(18):8068-8078.
18. Calejo AI, *et al.* (2012) *Neuroscience* 201:57-66.
19. Kabaso D, *et al.* (2012) *ScientificWorldJournal* 2012:983138.
20. Kabaso D, *et al.* (2013) *Front Cell Neurosci* 7:33.
21. Rituper B, *et al.* (2013) *Biochim Biophys Acta* 1831(7):1228-1238.
22. Rituper B, *et al.* (2012) *Cell Calcium* 52(3-4):250-258.
23. Flašker A, *et al.* (2013) *Mol Cell Endocrinol* 376(1-2):136-147.
24. Kovacic PB, *et al.* (2011) *J Biol Chem* 286(15):13370-13381.
25. Prebil M, *et al.* (2011) *Glia* 59(6):903-913.
26. Prebil M, *et al.* (2011) *Biochem Biophys Res Commun* 405(2):308-313.
27. Prebil M, *et al.* (2011) *Arch Physiol Biochem* 117(2):64-69.
28. Kreft M, *et al.* (2013) *Cell Mol Life Sci* 70(8):1483-1492.
29. Vardjan N, *et al.* (2014) *Glia*.
30. Kreft M, *et al.* (2004) *Glia* 46(4):437-445.

31. Pangrsic T, et al. (2006) *J Neurochem* 99(2):514-523.
32. Pangrsic T, et al. (2007) *J Biol Chem* 282(39):28749-28758.
33. Dolenšek J, et al. (2013) *PLoS One* 8(12):e82374.
34. Stožer A, et al. (2013) *PLoS One* 8(1):e54638.
35. Lipovšek S, et al. (2013) *Gen Comp Endocrinol* 185:67-79.
36. Sedej S, et al. (2013) *PLoS One* 8(10):e78883.
37. Huang YC, et al. (2013) *Diabetes* 62(2):519-530.
38. Potokar M, et al. (2009) *Biochem Biophys Res Commun* 390(4):1192-1196.
39. D'Adamo P, et al. (1998) *Nat Genet* 19(2):134-139.

Zaradi povečanja smo lahko dodatno objavili naslednje publikacije:

40. COSTA CALEJO, Ana-Isabel, REVERENDO, Marisa, SILVA, Virgília S., PEREIRA, Patrícia M., SANTOS, Manuel A. S., ZOREC, Robert, CONÇALVES, Paula P. Differences in the expression pattern of HCN isoforms among mammalian tissues : sources and implications. *Molecular biology reports*, ISSN 0301-4851, Jan. 2014, vol. 41, iss. 1, str. 297-307, ilustr., doi:

41 . SINGH, Priyanka, JORGAČEVSKI, Jernej, KREFT, Marko, GRUBIŠIĆ, Vladimir, STOUT, Randy F., POTOKAR, Maja, PARPURA, Vladimir, ZOREC, Robert. Single-vesicle architecture of synaptobrevin2 in astrocytes. *Nature communications*, ISSN 2041-1723, 2014, vol. 5.

42. POTOKAR, Maja, KORVA, Miša, JORGAČEVSKI, Jernej, AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana, ZOREC, Robert. Tick-borne encephalitis virus infects rat astrocytes but does not affect their viability. *PloS one*, ISSN 1932-6203, Jan. 2014, vol. 9, iss. 1.

#### 4. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem programu in zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>3</sup>

SLO

Izvedba programa je potekala skladno s predvidenim programom kljub temu, da se je med časom izvajanja programa spremenilo financiranje. Pravzaprav smo pšresegli vsa pričakovanja z objavami del v dveh revijah skupine Nature (Nature Protoc v letu 2013 in Nature Comm v letu 2014). Tako smo po naših ocenah delali nadpovprečno dobro oz. odlično.

#### 5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega programa oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave programske skupine v letu 2014<sup>4</sup>

SLO

Sprememb programa ni bilo. V letu 2014 smo prejeli povečanje financiranje, ki pa je prčelo finančno učinkovati konel leta 2014. V tem času smo pospešili delo in v pripravi so trije pregledni članki. Eden je v času pisanja tega poročila že izšel v reviji *Neurochem Research* (Vardjan in Zorec 2015). Dva sta bila sprejeta v reviji *Neuroscience* (Zorec et al., 2015 in Rodrigues et al., 2015). Četrti pa je v tisku v reviji *Cell Transplantation* (Vardjan, Verkhatsky in Zorec, 2015).

#### 6. Najpomembnejši znanstveni rezultati programske skupine<sup>5</sup>

Znanstveni dosežek

1.	COBISS ID	30613977	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Visoko ločljivostne meritve membranske kapacitivnosti za spremljanje eksocitoze in endocitoze	
	ANG	High-resolution membrane capacitance measurements for the study of exocytosis and endocytosis	
Opis	SLO	Za študij eksocitoze in endocitoze so nujne neposredne meritve tega procesa. Eleganten način predstavlja spremljanje membranske kapacitivnosti, ki je sorazmerna s spremembami v površini plazemske membrane. Do sprememb v površini plazemske membrane pride v procesih ekso in endocitoze. V tem članku natančno opišemo protokol za meritve membranske kapacitivnosti. Ta protokol navadno uporabljamo za meritve na izoliranih hipofiznih celicah, se ga pa da enostavno prilagoditi kateremukoli drugemu tipu celic. Časovno potratna je predvsem postavitve sistema, izvajanje meritev pa je po tem, ko operater dobi nekaj izkušenj, hitro in relativno enostavno.	
	ANG	In order to understand exocytosis and endocytosis, it is necessary to study these processes directly. An elegant way to do this is by measuring plasma membrane capacitance (Cm), a parameter proportional to cell surface area, the fluctuations of which are due to fusion and fission of secretory and other vesicles. Here we describe protocols that enable high-resolution Cm measurements in macroscopic and microscopic modes. Macroscopic mode, performed in whole-cell configuration, is used for measuring bulk Cm changes in the entire membrane area, and it enables the introduction of exocytosis stimulators or inhibitors into the cytosol through the patch pipette. Microscopic mode, performed in cell-attached configuration, enables measurements of Cm with attofarad resolution and allows characterization of fusion pore properties. Although we usually apply these protocols to primary pituitary cells and astrocytes, they can be adapted and used for other cell types. After initial hardware setup and culture preparation, several Cm measurements can be performed daily.	
Objavljeno v	Nature Pub. Group; Nature protocols; 2013; Vol. 8, no. 6; str. 1169-1183; Impact Factor: 7.782; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.066; A': 1; WoS: CO; Avtorji / Authors: Rituper Boštjan, Guček Alenka, Jorgačevski Jernej, Flašker Ajda, Kreft Marko, Zorec Robert		
Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek		
2.	COBISS ID	25625305	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Sfingozin facilitira nastajanje kompleksa SNARE in aktivira eksocitozo sinaptičnih mešičkov	
	ANG	Sphingosine facilitates SNARE complex assembly and activates synaptic vesicle exocytosis	
Opis	SLO	Fuzijo membran omogočajo proteini SNARE: synaptobrevin na membrani mešička, sintaksin in SNAP-25 na plazmalemi. Recentni rezultati kažejo, da je proces fuzije tudi pod nadzorom lokalne presnove lipidov. V tej študiji smo pregledali knjižnico lipidov, da bi identificirali tiste, ki pozitivno uravnavajo sinaptobrevin. Rezultati kažejo, da sfingozin, lipid, ki se sprošča iz sfingolipidov, aktivira sinaptobrevin in sinaptične mešičke, da nastane kompleks SNARE, ki deluje pri fuziji membran.	
		Synaptic vesicles loaded with neurotransmitters fuse with the plasma membrane to release their content into the extracellular space, thereby allowing neuronal communication. The membrane fusion process is mediated by a conserved set of SNARE proteins: vesicular synaptobrevin and plasma membrane syntaxin and SNAP-25. Recent data suggest that the fusion process may be subject to regulation by local lipid metabolism. Here, we have performed a screen of lipid compounds to identify positive	

			<p>regulators of vesicular synaptobrevin. We show that sphingosine, areleasable backbone of sphingolipids, activates synaptobrevin in synaptic vesicles to form the SNARE compJex implicated in membrane fusion. Consistent with the roJe of synaptobrevin in vesicle fusion, sphingosine upregulated exocytosis in isolated nerve terminais, neuromuscular junctions, neuroendocrine celi s and hippocampal neurons, but not in neurons obtained from synaptobrevin-2 knockoutmice. Further mechanistic insights suggest that sphingosine acts on the synaptobrevin/phospholipid interface, defining anovel function for this important lipid regulator.</p>
	Objavljeno v	Cell Press; Neuron; 2009; Letn. 62; str. 683-694; Impact Factor: 13.260;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.486; A": 1;A': 1; WoS: RU; Avtorji / Authors: Darios Frédéric, Wasser Catherine, Shakirzyanova Anastasia, Giniatullin Artur, Jorgačevski Jernej, Kreft Marko, Zorec Robert	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID	63941377	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Znotrajcelični serotonin modulira sekrecijo inzulina iz pankreatičnih celic beta preko serotoninacije
		ANG	Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic $\beta$ -cells by protein serotonylation
	Opis	SLO	S kombinacijo biokemičnih in elektrofizioloških analiz miši, ki imajo selektivno odsotno periferno triptofan-hidroksilazo (Tph1-/-) in 5-HT smo pokazali, da znotrajcelični 5-HT uravnava sekrecijo inzulina preko serotoninacije GTPaz.
		ANG	While serotonin (5-HT) co-localization with insulin in granules of pancreatic $\beta$ -cells was demonstrated more than three decades ago, its physiological role in the etiology of diabetes is stili unclear. We combined biochemical and electrophysiological analyses of mice selectively deficient in peripheral tryptophan hydroxylase (Tph1-/-) and 5-HT to show that intracellular 5-HT regulates insulin secretion. We found that these mice are diabetic and have an impaired insulin secretion due to the lack of 5-HT in the pancreas. The pharmacological restoration of peripheral 5-HT levels rescued the impaired insulin secretion in vivo. These findings were further evidenced by patch clamp experiments with isolated Tph1-/- $\beta$ -cells, which clearly showed that the secretory defect is downstream of Ca <sup>2+</sup> -signaling and can be rescued by direct intracellular application of 5-HT via the clamp pipette. In elucidating the underlying mechanism further, we demonstrate the covalent coupling of 5-HT by transglutaminases during insulin exocytosis to two key players in insulin secretion, the small GTPases Rab3a and Rab27a. This renders them constitutively active in a receptor-independent signaling mechanism we have recently termed serotonylation. Concordantly, an inhibition of such activating serotonylation in $\beta$ -cells abates insulin secretion. We also observed inactivation of serotonylated Rab3a by enhanced proteasomal degradation, which is in line with the inactivation of other serotonylated GTPases. Our results demonstrate that 5-HT regulates insulin secretion by serotonylation of GTPases within pancreatic $\beta$ -cells and suggest that intracellular 5-HT functions in various microenvironments via this mechanism in concert with the known receptor-mediated signaling.
	Objavljeno v	Public Library of Science; PLoS biology; 2009; Vol. 7, iss. 10; str. [1-10], e1000229; Impact Factor: 12.916;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.031; A": 1;A': 1; WoS: CQ, CU; Avtorji / Authors: Paulmann Nils, Grohmann Maik, Voigt Jörg-Peter, Bert Bettina, Vowinckel Jakob, Bader Michael, Skelin Maša, Jevšek Marko, Fink Heidrun, Rupnik Marjan, Walther Diego J.	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	

4.	COBISS ID	28521433	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Munc18-1 uravnava zlivanje mešičkov s plazemsko membrano in lastnosti fuzijske pore
		ANG	Munc 18-1 tuning of vesicle merger and fusion pore properties
	Opis	SLO	Fuzijska pora je lahko pomemben dejavnik za uravnavanje sproščanja hormonov in živčnih prenašalcev. Domneva se, da je fuzijska pora v začetni fazi ozka in stabilna, pozneje pa se razširi in omogoči popolno zlitje mešička s plazmalemo. Namen raziskave je bil preveriti vpliv proteinov SecI/Munc18 na lastnosti fuzijske pore z elektrofiziološko metodo spremljanja membranske kapacitivnosti v majhni krpici membrane. V izolirane podganje laktotrofe smo vnesli mutante Munc18-1, ki vplivajo na vezavo tega proteina s sintaksinom1 (R39C), proteinom Rab3A (E466K) in proteini Mint (P242S). V primerjavi s celicami, ki so izražale le nativni protein Munc18-1, je Munc18-1 E466K povečal frekvenco fuzijskih dogodkov in podaljšal povprečni odprti čas fuzijske pore. Munc18-1 P242S je podaljšal povprečni odprti čas fuzijske pore. Vse mutante so stabilizirale fuzijsko poro v začetni fazi. Posledica vnosa mutant Munc18-1 je bilo tudi zlivanje večjih mešičkov, kar pa najverjetneje ni bila posledice sestavljene fuzije, kar smo potrdili z mikroskopijo STED. Mikroskopija na atomsko silo je pokazala, da vezava Munc18-1 na t.i. zaprto obliko sintaksina1 prepreči vezavo sintaksina1 na sinaptobrevin2 kar prepreči sidranje mešička. V kolikor je sintaksin1 že vezan na protein SNAP25, Munc18-1 ne prepreči vezave s sinaptobrevinom2. Ena od vlog Munc18-1 je torej zagotavljanje sidranja mešičkov prek vezi sintaksin1-SNAP25-sinaptobrevin2, ki je stabilnejša od vezi sintaksin1-sinaptobrevin2. Munc18-1 pa se veže tudi na kompleks sintaksin1-SNAP25-sinaptobrevin2, kar omogoči uravnavanje fuzijske pore.
		ANG	The release of hormones and neurotransmitters, mediated by regulated exocytosis, can be modified by regulation of the fusion pore. The fusion pore is considered stable and narrow initially, eventually leading to the complete merger of the vesicle and the plasma membranes. By using the high-resolution patch-clamp capacitance technique, we studied single vesicles and asked whether the Sec1/Munc18 proteins, interacting with the membrane fusion-mediating SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) proteins, affect fusion pore properties. Munc18-1 mutants were transfected into lactotrophs to affect the interaction of Munc18-1 with syntaxin1 (Synt1) (R39C), Rab3A (E466K), and Mints (P242S). Compared with wild-type, Munc18-1 E466K increased the frequency of the fusion event. The latter two mutants increased the fusion pore dwell-time. All the mutants stabilized narrow fusion pores and increased the amplitude of fusion events, likely via preferential fusion of larger vesicles, since overexpression of Munc18-1 R39C did not affect the average size of vesicles, as determined by stimulated emission depletion (STED) microscopy. Single-molecule atomic force microscopy experiments revealed that wild-type Munc18-1, but not Munc18-1 R39C, abrogates the interaction between synaptobrevin2 (Syb2) and Synt1 binary trans-complexes. However, neither form of Munc18-1 affected the interaction of Syb2 with the preformed binary cis-Synt1-SNAP25B complexes. This indicates that Munc18-1 performs a proofreading function by inhibiting tethering of Syb2-containing vesicles solely to Synt1 at the plasmalemma and favoring vesicular tethering to the preformed binary cis-complex of Synt1A-SNAP25B. The association of Munc18-1 with the ternary SNARE complex leads to tuning of fusion pores via multiple and converging mechanisms involving Munc18-1 interactions with Synt1A, Rab3A, and Mints.
	Objavljeno v		The Society; The Journal of neuroscience; 2011; Vol. 31, issue 24; str. 9055-9066; Impact Factor: 7.115; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.602; A': 1; WoS: RU; Avtorji / Authors:



		Jorgačevski Jernej, Potokar Maja, Grilc Sonja, Kreft Marko, Zorec Robert	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
5.	COBISS ID	31384793	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Arhitektura sinaptobrevina 2 v mešičku astrocita
		ANG	Single-vesicle architecture of synaptobrevin2 in astrocytes
	Opis	SLO	Sproščanje kemičnih prenašalcev uravnava kompleks proteinov SNARE. Med te proteine sodi tudi sinaptobrevin 2, a ni znano, kako je ta protein razporejen v posameznem mešičku. Uporabljena je bila super-ločljivostna mikroskopija za slikanje posameznih mešičkov v astrocitu. Protein sinaptobrevin2 smo označili na koncih z dvema fluoroforoma. Za študij fuzijske pore smo astroците stimulirali z ATPjem, ki stimulira od kalcija odvisno eksocitozo in povzroča alkalinizacijo v mešičku. Rezultati so pokazali, da je v posameznem astrocitu manj kot 25 molekul sinaptobrevina 2 in da so ti razporejeni v gručo ali snop.
		ANG	Exocytic transmitter release is regulated by the SNARE complex, which contains a vesicular protein, synaptobrevin2 (Sb2). However, Sb2 vesicular arrangement is unclear. Here we use super-resolution fluorescence microscopy to study the prevalence and distribution of endogenous and exogenous Sb2 in single vesicles of astrocytes, the most abundant glial cells in the brain. We tag Sb2 protein at C- and N termini with a pair of fluorophores, which allows us to determine the Sb2 length and geometry. To estimate total number of Sb2 proteins per vesicle and the quantity necessary for the formation of fusion pores, we treat cells with ATP to stimulate Ca <sup>2+</sup> -dependent exocytosis, increase intracellular alkalinity to enhance the fluorescence presentation of yellow-shifted pHluorin (YpH), appended to the vesicle lumen domain of Sb2, and perform photobleaching of YpH fluorophores. Fluorescence intensity analysis reveals that the total number of endogenous Sb2 units or molecules per vesicle is <-25.
	Objavljeno v	Nature Publishing Group; Nature communications; 2014; Vol. 5; Impact Factor: 10.742; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.663; A": 1; A': 1; WoS: RO; Avtorji / Authors: Singh Priyanka, Jorgačevski Jernej, Kreft Marko, Grubišić Vladimir, Stout Randy F., Potokar Maja, Parpura Vladimir, Zorec Robert	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	

## 7. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati programske skupine

	Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID	31163353	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Virus klopnega meningoencefalitisa inficira astroците a ne zmanjša njihove viabilnosti.
		ANG	Tick-borne encephalitis virus infects rat astrocytes but does not affect their viability
	Opis	SLO	V Evropi in Aziji predstavlja virus klopnega encefalitisa (TBEV) eno od najbolj nevarnih oblik možganskih vnetij pri ljudeh. Za infekcijo nevronov mora virus prečkati krvno-možgansko pregrado (KMP) in celice, ki ležijo med KMP in nevroni. Ene od najpomembnejših celic, ki ločujejo nevrone od KMP so astrociti, najštevilčnejše celice glije. O virusnih infekcijah astrocitov še ni veliko znanega, zato smo raziskali, če TBEV inficira podganje astroците. Podgane predstavljajo naravni rezervoar in enega od gostiteljev TBEV. Vstop virusa TBEV v astroците, mobilnost TBEV v citoplazmi, vlogo citoskeleta in viabilnost astrocitov po infekciji smo spremljali z

		visokoločljivostno fluorescenčno mikroskopijo. Število TBEV v citoplazmi in njihova mobilnost sta se povečevali s časom izpostavljenosti astrocitov virusu TBEV. Večdnevna infekcija astrocitov s TBEV je vplivala na aktinski citoskelet, ni pa vplivala na viabilnost teh celic. Ti rezultati so skladni z objavljenimi raziskavami na ostalih sesalskih celicah. Zaključili smo, da lahko podganji astrociti predstavljajo pomemben naravni rezervoar virusa TBEV.
	ANG	Tick-borne encephalitis virus (TBEV) causes one of the most dangerous human neuroinfections in Europe and Asia. To infect neurons it must cross the blood-brain-barrier (BBB), and presumably also cells adjacent to the BBB, such as astrocytes, the most abundant glial cell type. However, the knowledge about the viral infection of glial cells is fragmental. Here we studied whether TBEV infects rat astrocytes. Rats belong to an animal group serving as a TBEV amplifying host. We employed high resolution quantitative fluorescence microscopy to investigate cell entry and cytoplasmic mobility of TBEV particles along with the effect on the cell cytoskeleton and cell survival. We report that infection of astrocytes with TBEV increases with time of exposure to TBEV and that with post-infection time TBEV particles gained higher mobility. After several days of infection actin cytoskeleton was affected, but cell survival was unchanged, indicating that rat astrocytes resist TBEV-mediated cell death, as reported for other mammalian cells. Therefore, astrocytes may present an important pool of dormant TBEV infections and a new target for therapeutic intervention.
	Šifra	D.04 Pobuda za uvedbo novega raziskovalnega področja v Sloveniji
	Objavljeno v	Public Library of Science; PloS one; 2014; Vol. 9, iss. 1; Impact Factor: 3.534; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.663; A': 1; WoS: RO; Avtorji / Authors: Potokar Maja, Korva Miša, Jorgačevski Jernej, Avšič-Županc Tatjana, Zorec Robert
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	31149273 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Dinamika beta-adrenergičnega/cAMP signaliziranja in morfološke spremembe v astrocitih v kulturi
		ANG Dynamics of [beta]-adrenergic/cAMP signaling and morphological changes in cultured astrocytes
	Opis	SLO Morfologija astrocitov, ki je verjetno uravnavana s cAMP, določa strukturne povezave med astrociti in sinapso, kar lahko modulira delovanje sinaptičnega prenosa. Beta adrenergični receptorji (beta-AR), ki zvišajo citosolno koncentracijo cAMP ([cAMP]i), lahko vplivajo na obliko celic. Vendar pa dinamika signaliziranja s cAMP v realnem času v posameznem astrocitu in njen vpliv na celično morfološko, še nista bila raziskana. V raziskavi smo uporabili nanobiosenzor Epac1-camps, ki temelji na tehniki prenosa energije z resonanco fluorescece (angl. "fluorescence resonance energy transfer" (FRET)), da bi v času spremljali spremembe v [cAMP]i. Stimulacija beta-AR z adrenalinom, noradrenalinom in izoprenalinom, specifičnim agonistom beta-AR, je v astrocitih povzročila porast [cAMP]i (15 s). Odgovor signala FRET na stimulacijo beta-AR je bil dvakrat hitrejši v prisotnosti forskolina, ki neposredno aktivira adenilatno ciklazo, in >35-krat hitrejši kot po stimulaciji z dibutilil-cAMP, ki neposredno aktivira Epac1-camps, najverjetneje zaradi počasnega vstopa reagentov skozi plazemsko membrano v citosol. Oscilacij v [cAMP]i nismo opazili, kar kaže na to, da od cAMP odvisni procesi delujejo v počasni časovni domeni. Večina astrocitov, ki je izražala Epac1-camps, je v 1 h po aktivaciji beta-AR spremenilo svojo obliko v zvezdasto. Opazili smo 5-10 % zmanjšanje površine prečnega prereza celic in 30-50 % povečanje obsega celic, najverjetneje zaradi premika citoplazme proti perinuklearni regiji in pojava izrastkov na površini astrocitov. Ker astrocitni izrastki tesno obdajajo nevrone, beta-AR/cAMP-

		posredovane morfološke spremembe lahko spremenijo geometrijo zunajceličnega prostora, kar lahko vpliva na delovanje sinaps, nevronov in astrocitov v normalnih in bolezenskih stanjih.
	ANG	The morphology of astrocytes, likely regulated by cAMP, determines the structural association between astrocytes and the synapse, consequently modulating synaptic function. Beta-Adrenergic receptors (beta-AR), which increase cytosolic cAMP concentration ([cAMP] <sub>i</sub> ), may affect cell morphology. However, the real-time dynamics of beta-AR-mediated cAMP signaling in single live astrocytes and its effect on cell morphology have not been studied. We used the fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based cAMP biosensor Epac1-camps to study time-dependent changes in [cAMP] <sub>i</sub> ; morphological changes in primary rat astrocytes were monitored by real-time confocal microscopy. Stimulation of beta-AR by adrenaline, noradrenaline, and isoprenaline, a specific agonist of beta-AR, rapidly increased [cAMP] <sub>i</sub> (15 s). The FRET signal response, mediated via beta-AR, was faster than in the presence of forskolin (twofold) and dibutyryl-cAMP (>35-fold), which directly activate adenylyl cyclase and Epac1-camps, respectively, likely due to slow entry of these agents into the cytosol. Oscillations in [cAMP] <sub>i</sub> have not been recorded, indicating that cAMP-dependent processes operate in a slow time domain. Most Epac1-camps expressing astrocytes revealed a morphological change upon -AR activation and attained a stellate morphology within 1 h. The morphological changes exhibited a bell-shaped dependency on [cAMP] <sub>i</sub> . The 5-10% decrease in cell cross-sectional area and the 30-50% increase in cell perimeter are likely due to withdrawal of the cytoplasm to the perinuclear region and the appearance of protrusions on the surface of astrocytes. Because astrocyte processes ensheath neurons, beta-AR/cAMP-mediated morphological changes can modify the geometry of the extracellular space, affecting synaptic, neuronal, and astrocyte functions in health and disease. GLIA 2014.
	Šifra	D.04 Pobuda za uvedbo novega raziskovalnega področja v Sloveniji
	Objavljeno v	A.R. Liss; Glia; 2014; Vol. 62, iss. 4; str. 566-579; Impact Factor: 5.466; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.675; A': 1; WoS: RU; Avtorji / Authors: Vardjan Nina, Kreft Marko, Zorec Robert
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
3.	COBISS ID	2814543 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Visokoločljivostna fluorescenčna mikroskopija
		ANG Superresolution microscopy
	Opis	SLO Visokoločljivostna mikroskopija je napredna tehnologija, kjer dosežemo ločljivost, ki je vsaj dvakrat boljša od ločljivosti običajne svetlobne mikroskopije. Organizacija srečanja, ki je spremljal uradni začetek mikroskopije STED v Sloveniji. Eden od ključnih instrumentov visokoločljivostnih mikroskopij predstavlja platforma STED, ki ga imamo sedaj tudi v Sloveniji. Tehnologija STED, ki je sestavljena iz najbolj naprednih optičnih, mehanskih in električnih komponent, predstavlja instrument, ki omogoča meritve na meji danosti. Mikroskop STED omogoča vizualizacijo živih celic z ločljivostjo med 35 in 40 nm, v idealnih pogojih pa okoli 30 nm. Znanstveno srečanje z delavnico visokoločljivostne mikroskopije je bilo namenjeno predstavitvi tovrstne mikroskopije.
		Super resolution microscopy is the cutting edge technology with the resolution that is at list twice better than the resolution of conventional far field microscopy. One of the key instuments of super resolution microscopy is STED technology based instrument, which is now located also in Slovenia. It represents the most advanced technology in the field of optical

		microscopy, comprised of most advanced optics, mechanics and electronics. It enables observation of living objects at resolution between 35 and 40 nm with the potential to visualize objects beyond these limits. The conference with a workshop of the demonstration of the super-resolution microscopy is dedicated to the introduction of this technological novelty.
	ANG	
Šifra	F.04	Dvig tehnološke ravni
Objavljeno v	Centre of Excellence for Integrated Approaches in Chemistry and Biology of Proteins; 2013; 44 str.; Avtorji / Authors: Zorec Robert, Kreft Marko, Tušar Livija, Turk Dušan	
Tipologija	2.25	Druge monografije in druga zaključena dela
4.	COBISS ID	26685401   Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Izzivi z naprednimi medicinskimi izdelki in kako jih obravnavati
	ANG	Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them
Opis	SLO	Pregledni članek je nastal v okviru znanstvene komisije pri Evropski agenciji za zdravila in obravnava ključne znanstvene in tudi regulatorne izzive pri razvoju naprednih medicinskih izdelkov ANG
	ANG	Advanced therapy medicinal products (ATMPs), which include gene therapy medicinal products, somatic cell therapy medicinal products and tissue-engineered products, are at the cutting edge of innovation and offer a major hope for various diseases for which there are limited or no therapeutic options. They have therefore been subject to considerable interest and debate. Following the European regulation on ATMPs, a consolidated regulatory framework for these innovative medicines has recently been established. Central to this framework is the Committee for Advanced Therapies (CAT) at the European Medicines Agency (EMA), comprising a multidisciplinary scientific expert committee, representing all EU member states and European Free Trade Association countries, as well as patient and medical associations. In this article, the CAT discusses some of the typical issues raised by developers of ATMPs, and highlights the opportunities for such companies and research groups to approach the EMA and the CAT as a regulatory advisor during development.
Šifra	F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja
Objavljeno v	Nature Pub. Group; Nature reviews, Drug discovery; 2010; Letn. 9, št. 3; str. 195-201; Impact Factor: 28.712; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.772; A": 1; A': 1; WoS: DB, TU; Avtorji / Authors: Schneider Christian, Celis Patrick, Zorec Robert, Marinko Petra	
Tipologija	1.01	Izvorni znanstveni članek
5.	COBISS ID	28263129   Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Novi pogledi v uravnavanje citosolne koncentracije glukoze med diferenciacijo fibroblastov 3T3-L1 v adipocite
	ANG	New insights into cytosolic glucose levels during differentiation of 3T3-L1 fibroblasts into adipocytes
		Citosolna koncentracija glukoze zrcali bilanco med procesi vstopa glukoze preko plazmaleme in med procesi porabe glukoze. V adipocitih so dosedanji pogledi predvidevali, da je poraba glukoze v citosolu zelo hitra, kar pomeni, da se vsaka molekula, ki vstopi v citosol, zelo hitro fosforilira. Zato se predvideva, da je citosolna koncentracija glukoze zanemarljivo nizka, a še nikoli izmerjena. V pričujoči študiji smo merili dinamiko citosolne glukoze v fibroblastih 3T3-L1 in adipocitih tako, da smo izražali fluorescenčni proteinski nanosenzor (FRET) za določanje koncentracije glukoze FLIPglu-

Opis	SLO	<p>600mu. Merili smo spremembe citosolne koncentracije glukoze tako, da smo spreminjali koncentracijo zunajcelične glukoze in s tem spreminjali koncentracijski gradient za glukozo preko plazemske membrane. Spremembe v citosolni koncentraciji glukoze so bile izmerjene le v 56% 3T3-L1 fibroblastov in 14% v 3T3-L1 adipocitih. V adipocitih je bila mirovna koncentracija glukoze nižja od tiste izmerjene v fibroblastih. Permeabilizacija membrane je povečala citosolono koncentracijo glukoze v adipocitih in inhibitor glikolize iodoacetat ni preprečil porasta citosolne koncentracije glukoze, kar kaže na relativno nizko membransko permeabilnost za glukozo v mirovanju. Študirali smo tudi učinek inzulina in adrenalina. Prvi je povečal koncentracijo citosolne glukoze za 3.6 krat v adipocitih, a ne v fibroblastih. Adrenalin pa je povečal koncentracijo glukoze v fibroblastih a ne v adipocitih. Pač pa je v adipocitih po stimulaciji z insulinom potekalo pospešeno odstranjevanje glukoze po dodatku adrenalina v primerjavi s kontrolo (<math>p &lt; 0.001</math>). Ti rezultati kažejo, da se med diferenciacijo v adipocitih razvijejo učinkoviti mehanizmi za vzdrževanje nizke koncentracije citosolne glukoze, ki predvsem temeljijo na nizki prepustnosti membrane za glukozo.</p>
	ANG	<p>Cytosolic glucose concentration reflects the balance between glucose entry across the plasma membrane and cytosolic glucose utilization. In adipocytes, glucose utilization is considered very rapid, meaning that every glucose molecule entering the cytoplasm is quickly phosphorylated. Thus, the cytosolic free glucose concentration is considered to be negligible; however, it was never measured directly. In the present study, we monitored cytosolic glucose dynamics in 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes by expressing a fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based glucose nanosensor: fluorescent indicator protein FLIPglu-600mu. Specifically, we monitored cytosolic glucose responses by varying transmembrane glucose concentration gradient. The changes in cytosolic glucose concentration were detected in only 56% of 3T3-L1 fibroblasts and in 14% of 3T3-L1 adipocytes. In adipocytes, the resting cytosolic glucose concentration was reduced in comparison with the one recorded in fibroblasts. Membrane permeabilization increased cytosolic glucose concentration in adipocytes, and glycolytic inhibitor iodoacetate failed to increase cytosolic glucose concentration, indicating low adipocyte permeability for glucose at rest. We also examined the effects of insulin and adrenaline. Insulin significantly increased cytosolic glucose concentration in adipocytes by a factor of 3.6; however, we recorded no effect on delta ratio (DeltaR) in fibroblasts. Adrenaline increased cytosolic glucose concentration in fibroblasts but not in adipocytes. However, in adipocytes in insulin-stimulated conditions, glucose clearance was significantly faster following adrenaline addition in comparison with controls (<math>p &lt; 0.001</math>). Together, these results demonstrate that during differentiation, adipocytes develop more efficient mechanisms for maintaining low cytosolic glucose concentration, predominantly with reduced membrane permeability for glucose.</p>
Šifra	F.02 Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
Objavljeno v	American Society of Biological Chemists.; The Journal of biological chemistry; 2011; Vol. 286, no. 15; str. 13370-13381; Impact Factor: 4.773; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.739; A': 1; WoS: CQ; Avtorji / Authors: Kovačič Petra Brina, Chowdhury Haque Helena, Velebit Marković Jelena, Kreft Marko, Jensen Jorgen, Zorec Robert	
Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	

## 8. Drugi pomembni rezultati programske skupine<sup>Z</sup>

Organizacija mednarodnega evropskega srečanja fiziologov FEPS 2009  
<http://lnmcp.mf.uni-lj.si/>, ki je potekalo od 12. do 15. novembra v Ljubljani. Organizacija je potekala v okviru naše programske skupine, kjer je bilo preko 500 udeležencev.

## 9. Pomen raziskovalnih rezultatov programske skupine<sup>8</sup>

### 9.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>2</sup>

SLO

Raziskovalno delo izvedenega programa je pomembno na več ravneh. Predvsem nudi novo znanje o splošnih bioloških procesih na celični ravni, ki so trenutno še slabo raziskani, na primer eksocitoza, transport mešičkov, citosolna homeostaza sekundarnih prenašalcev in metabolitov. Poleg tega delo predstavlja modelni sistem za proučevanje »funkcionalne genomike in proteomike«. Pri večini zapletenih bioloških procesov, ki vključujejo delovanje različnih genov in proteinov ni mogoče spremljati fiziološkega procesa v času v živih organizmih. Pri študiju takšnih bioloških procesov se uporabljajo posamezne celice in pa številne tehnike, ki jih uporabljamo bodisi posamezno ali pa sočasno v kombinaciji z drugimi tehnikami. Pri tem želimo odgovoriti na vprašanja glede lastnosti posameznih funkcionalnih modulov, ki prispevajo k delovanju posamezne celice in pa celotnega organizma. Na takšen način lahko proučujemo proces eksocitoze pri laktotrofih. Dinamiko mešičkov pred in po eksocitozi lahko proučujemo tudi pri posameznih celicah, na primer pri astrocitih. Recentne raziskave kažejo, da so astrociti zelo pomembni pri procesiranju informacij v centralnem živčnem sistemu, tako v bolezenskem kot tudi normalnem stanju. Pri našem delu smo uporabili najnaprednejše metode in odkrili, da so proteini, ki so pomembni za proces uravnavanja fuzije razporejeni v skupku in da je na mešičku manj kot 25 teh proteinov.

Čeprav predlagano raziskovalno delo ni neposredno povezano s specifičnim bolezenskim stanjem, verjamemo, da bo pripomoglo k ohranitvi in vzpostavljanju zdravja ljudi. Anteriorni hipofizni hormoni uravnavajo pomembne telesne funkcije kot so rast, razvoj, razmnoževanje in odzivi na stres. Sproščanje teh hormonov iz mešičkov je ozko grlo, ki ga je treba poznati zaradi možnega razvoja novih strategij za zdravljenje ne le endokrinih pač pa nevroloških motenj. Poznavanje uravnavanj afuzijske pore je tudi pomembno za načrtovanje proizvodnje rekombinantnih proteinov, saj se tudi ti skladiščijo v mešičkih in se izločajo, ko se fuzijska pora razširi. Poznavanje teh mehanizmov pa je poznano le v obrisih. Šele pred nedavnim so opisali pomembno vlogo astrocitov pri delovanju centralnega živčnega sistema in sicer prav z raziskavami na posameznih celicah. Te celice imajo ključno homeostatično vlogo v osrednjem živčevju, zato je logično, da se bodo bodoča zdravila osredotočala na uravnavanje funkcije teh celic v možganih pri boleznih. Naše odkritje, da prvo oralno zdravilo za zdravljenje multiple skleroze deluje na astrocite, na mobilnost mešičkov in na izločanje signalnih molekul iz mešičkov, je odprlo nove načelne možnosti za razvoj zdravil za nevrološke bolezni, katerih tarča so celice glija.

ANG

The conducted research is significant at several levels. It provides new insights into fundamental cell processes including exocytosis, vesicle transport, cytosolic homeostasis of second messengers and metabolites. Moreover this research provides a model system to study functional aspects of »genomics and proteomics«. In complex biological systems in which several genes and proteins participate, it is very difficult, if not impossible, to monitor physiological processes in living organisms in real-time. Therefore, to study such processes isolated cells and tissues are suitable models, together with dedicated combinations of techniques. The focus in such efforts are properties of functional modules, which shape the function of a single cell and the whole organism. With this aim we are studying the process of regulated exocytosis in pituitary lactotrophs. Dynamics of vesicles before and after the exocytotic merger of vesicles with the plasma membrane is studied also in other cell types, such as astrocytes. Recent experimental evidences revealed that astrocytes are playing a key role in signal processing in the central nervous system, in normal and in pathological conditions. By using most advanced electrophysiological and optophysiological methods the results showed that a single vesicle in Astrocytes contains less than 25 synaptobrevin 2 molecules and that these molecules are clustered. In comparison to neurons where there are over 70 molecules per single vesicle, the paucity of synaptobrevin molecules may explain the relative slowness of regulated exocytosis in astrocytes. Finally, it seems reasonable to hope that this work, while not

targeted to any particular disease, will be useful for helping to preserve and promote human health. Anterior pituitary hormones control important bodily functions including growth, development, reproduction, and responses to stress. The release of hormones is controlled by factors released from innervating neurons (pars intermedia), or by circulating hypothalamic factors which via their interaction with specific surface membrane receptors and subsequent activation of intracellular signalling mechanisms control exocytosis. Thus a key to understanding neuroendocrine integration is to understand the mechanisms that control exocytosis. Astrocytes play important roles in the CNS function that have only recently been described, much of this has to be thanked to single cell studies in particular. Addressing the role of regulated exocytosis in cells playing a role in metabolic syndrome and diabetes, will potentially generate new vistas that will help formulate new paradigms for diagnostic/therapeutic approaches. Therefore, the conducted research does not only examine fundamental physiological/biophysical aspects of exocytosis, vesicle traffic, cytosolic signaling with second messengers and metabolites, but additionally reveals new aspects of physiological regulation of hormone and neurotransmitter release, vesicle traffic and cytosolic homeostasis in terms of conditions related to neurodegeneration, brain trauma, metabolic syndrome and diabetes.

## 9.2. Pomen za razvoj Slovenije<sup>10</sup>

SLO

Celična fiziologija je temeljna disciplina, ki prispeva k razvoju novih terapevtskih in diagnostičnih metod v moderni molekularni medicini. Strategija, ki podpira temeljne in aplikativne raziskave na celični ravni, predstavlja pot, ki bo omogočila prenos znanja v podporo hitrejšemu razvoju celotne družbe, vključno slovenske. Bazične raziskave so ključne za izobraževanje bodočih strokovnjakov in širše javnosti. Širša javnost mora biti poučena o razvoju celične biologije in molekularne medicine. Na primer, najnovejše obetajoče raziskave na področju matičnih celic, subcelične fiziologije, celičnega inženirstva, transplantacije celic, biologije in mehanizmov določenih bolezni, mehanizmov zdravljenja, itd. morajo biti predstavljene širši javnosti. Nadalje, reševanje problemov v okviru svetovnih problemov na najvišji možni metodološki ravni bo prispevalo k večji prepoznavnosti, kredibilnosti in kompetentnosti celotne slovenske družbe. Strokovno znanje s področja celične fiziologije, ki je v Sloveniji prisotno že nekaj desetletij, je potrebno za spodbujanje hitrejšega razvoja in ne le v Sloveniji, pač pa globalnem smislu.

ANG

Cell Physiology represents an essential discipline for the development of new therapeutic and diagnostic methods in modern molecular medicine. Therefore, the strategy to support fundamental research and applied research at cellular level represents a strategy to deliver and support a much more rapid development of the whole society, including that in Slovenia. Fundamental research is essential for the education of future experts and also lay public. The latter needs to be educated in term of understanding the new developments in cell biology and molecular medicine. For example: the promising new discoveries in stem cell research, subcellular physiology, cell engineering, cell transplantation, the biology and mechanisms of diseases, the mechanisms of treatment, and others need to be presented to the public. Furthermore, problem solving of universal problems at the highest possible methodological level is increasing the visibility, credibility and competence of the whole society. Expertise in the field of Cell Physiology, which has a tradition of several decades in Slovenia, promises to support more rapid development for Slovenia, contributing significance for global efforts with the family of other nations.

## 10. Zaključena mentorstva članov programske skupine pri vzgoji kadrov v obdobju 1.1.2009-31.12.2014<sup>11</sup>

### 10.1. Diplome<sup>12</sup>

vrsta usposabljanja	število diplom
bolonjski program - I. stopnja	2

bolonjski program - II. stopnja	4
univerzitetni (stari) program	1

## 10.2. Magisterij znanosti in doktorat znanosti<sup>13</sup>

Šifra raziskovalca	Ime in priimek	Mag.	Dr.	MR	
32000	Boštjan Rituper	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
32068	Ajda Flašker	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
32132	Andraž Stožer	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
27585	Jernej Jorgačevski	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
28325	Mateja Lobe Prebil	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
28638	Petra Brina Kovačič	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
29565	Maša Skelin Klemen	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
36369	Anemari Horvat	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	
31114	Valentina Lacovich	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
0	Ana Costa Calejo	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	
0	Priyanka Singh	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="checkbox"/>	

Legenda:

**Mag.** - Znanstveni magisterij

**Dr.** - Doktorat znanosti

**MR** - mladi raziskovalec

## 11. Pretok mladih raziskovalcev – zaposlitev po zaključenem usposabljanju<sup>14</sup>

Šifra raziskovalca	Ime in priimek	Mag.	Dr.	Zaposlitev	
32000	Boštjan Rituper	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	D - Javni zavod	
32068	Ajda Flašker	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	F - Drugo	
32132	Andraž Stožer	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	D - Javni zavod	
27585	Jernej Jorgačevski	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	D - Javni zavod	
28325	Mateja Lobe Prebil	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	C - Gospodarstvo	
28638	Petra Brina Kovačič	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	F - Drugo	
29565	Maša Skelin Klemen	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	D - Javni zavod	
36369	Anemari Horvat	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	D - Javni zavod	
31114	Valentina Lacovich	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	E - Tujina	

Legenda zaposlitev:

**A** - visokošolski in javni raziskovalni zavodi

**B** - gospodarstvo

**C** - javna uprava

**D** - družbene dejavnosti

**E** - tujina

**F** - drugo



**12. Vključenost raziskovalcev iz podjetij in gostovanje raziskovalcev, podoktorandov ter študentov iz tujine, daljše od enega meseca, v obdobju 1.1.2009-31.12.2014**

Šifra raziskovalca	Ime in priimek	Sodelovanje v programski skupini	Število mesecev	
35043	Priyanka Singh	C - študent - doktorand	30	
0	Urszula Gorska	C - študent - doktorand	6	
0	Susana Cerqueira	C - študent - doktorand	3	
0	Paula Maria Goncalves	A - raziskovalec/strokovnjak	1	
0	Ana Costa Calejo	C - študent - doktorand	4	
0	Rhea Teng	C - študent - doktorand	3	

Legenda sodelovanja v programski skupini:

- A** - raziskovalec/strokovnjak iz podjetja
- B** - uveljavljeni raziskovalec iz tujine
- C** - študent - doktorand iz tujine
- D** - podoktorand iz tujine

**13. Vključevanje v raziskovalne programe Evropske unije in v druge mednarodne raziskovalne in razvojne programe ter drugo mednarodno sodelovanje v obdobju 1.1.2009-31.12.2014<sup>15</sup>**

SLO

V obdobju 2009-2014 smo bili vključeni v naslednje programe EU:

V letu 2009 (30. 6. 2009), se je zaključil program **NEUROIMAGE FP7 INCO** (vodja/koordinator: prof. dr. Robert Zorec).

V letih 2009-2011 se je nadaljevalo sodelovanje preko projekta **COST BM 0602** (vodja/coordinator: prof. dr. Robert Zorec) z naslovom: »Adipose tissue: A key target for prevention of the metabolic syndrome«, kjer letno sodelujemo na vsaj treh dogodkih. Ta projekt se zaključil v avgustu 2011. Zadnje srečanje je potekalo na Finskem, kjer smo predstavili rezultate meritev citosolne glukoze v posameznih celicah.

V letu 2009 smo začeli s projektom **EDuGlia** (vodja/coordinator: prof. dr. Robert Zorec), ki predstavlja ITN za izobraževanje doktorandov. V letu 2013 se je ta projekt nadaljeval in zaključil. V mreži je bilo 11 partnerjev, sodelovanje skupaj je obsegalo 48 mesecev (od 15. 9. 2009 do 15. 9. 2013). V okviru slednjega smo tujih kandidatov s štipendijo Marie Curie. V letu 2010 smo zaposlili eno kandidatko za 6 mesecev iz Srbije. V letu 2011 smo zaposlili za 6 mesecev kandidatko iz Estonije in od meseca septembra 2011 kandidatko iz Indije, ki je v Sloveniji vpisala doktorski študij, in svoje delo zaključila v letu 2013.

V letu 2010 smo se povezali v COST aktivnosti **COST MP 1005 NAMABIO** (vodja/coordinator: prof. dr. Robert Zorec): od nano do mikro biomaterialov (načrtovanje, procesiranje, karakterizacija, modeliranje) in uporaba v regenerativni ortopedski in dentalni medicini projekta. Uradni začetek tega sodelovanja se je začel 14. 4. 2011. V letu 2012 smo se udeležili srečanja na Dunaju, v letu 2013 v mesecu juniju pa srečanja v Patrasu v Grčiji, ter v februarju 2014 v Berlinu,

Sodelovali smo tudi v projektu **COST NANONET BM1002** (vodja/coordinator: prof. dr. Robert Zorec), kjer je 22 članic, obdobje tega projekta je 09/11/2010 - 24/05/2014. Prvo srečanje slednjega COSTA je bilo Novembra 2010. V letu 2013 je potekalo srečanje v Amsterdamu na Nizozemskem, kjer smo imeli vabljen

predavanja in se dogovarjali za pripravo prijav na projekte EU in marca leta 2014 v Gothenburgu na Švedskem.

V okviru teh projektov smo porabili sredstva za materialne stroške in za dodatno financiranje velike opreme. V letu 2011 smo obnavljali zastarele platforme mikroskopov. Leta 2013 smo zagnali obnovljene platforme mikroskopov in izvedli predavanja na Hrvaškem (Univerza Reka), da bi spodbudili regionalno sodelovanje. V juniju 2013 smo preko centra odličnosti otvorili platforme super-resolucijskih mikroskopov.

V avgustu 2013 se je prof.dr.M. Kreft udeležil delavnice o presnovi v možganih na Univerzi Oslo (koordinator Dr. Linda. H. Bergersen).

V letu 2014 se je dr. Nina Vardjan povezala s projektom COST BM1402 in projektom GLISTEN | COST Action CM1207

#### **14.Vključenost v projekte za uporabnike, ki so v obdobju trajanja raziskovalnega programa (1.1.2009–31.12.2014) potekali izven financiranja ARRS<sup>16</sup>**

*SLO*

V obdobju 2009-2014 smo sodelovali (vodja: dr. R. Zorec; koordinator: dr. M. Kreft) pri raziskavah z industrijo (Carl Zeiss), od leta 2012 smo sodelovali z Univerzo v Bilbau, Španija, zaradi uporabe njihove infrastrukture za transgene živali.

Dr. Rupnik je v letih 2009-2014 nadaljeval s svojimi stiki kot zunanji laboratorij ustanove Max-Planck Gesselshaft v Goettingenu.

Člani naše programske skupine so v obdobju 2009-2014 sodelovali pri dodiplomskem pouku Splošne fiziologije, Temeljne fiziologije in Celičnega inženirstva za študente biokemije na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo in na Univerzi v Ljubljani, Biotehniški fakulteti pri predmetu Molekulska fiziologija. V letu 2013 smo organizirali IBRO delavnico s področja visokoločljivostne elektrofiziologije v San Juanu, ZDA (<http://glia2013.uccaribe.net/> & [http://lnmcp.mf.uni-lj.si/obrazci/IBRO\\_workshop\\_2013.pdf](http://lnmcp.mf.uni-lj.si/obrazci/IBRO_workshop_2013.pdf)).

#### **15.Ocena tehnološke zrelosti rezultatov raziskovalnega programa in možnosti za njihovo implementacijo v praksi (točka ni namenjena raziskovalnim programom s področij humanističnih ved)<sup>17</sup>**

*SLO*

Na temelju raziskav membranske fuzije smo v obdobju 2009-2014 uvedli sistem GMP za pripravo avtoložnih celičnih medicinskih izdelkov in pridobili vsa dovoljenja za izvedbo klinične raziskave (EudraCT # 2012-005498-29).

V skladu z vodenjem sistema kakovosti po standardu SIST/ISO 17025 smo pridobili akreditacijsko listino za kalibracijske laboratorije:

Slovenska akreditacija (Slovenian Accreditation) <http://www.sa.gov.si/teksti-1/slo/katalog.htm>, LK-024, LK-025

V obdobju 2009-2014 smo aktivno prijavljali patentne prijave (#EP13173446.9-1405,#P-201100250, # WO/2013/007325), da bi vzpostavili razmere za implementacijo rezultatov raziskav. Poleg tega smo prijavili dve blagovni znamki HybriCure® in SmartCure®.

Ker je translacijski proces lahko tudi daljši od procesa samih raziskovalnih odkritij,

ocenjujemo, da je strategija, ki smo jo ubrali taka, da poleg objavljanja v visoko prepoznavnih znanstvenih revijah, omogoča pogoje tudi za koriščenje rezultatov. V naslednjem obdobju pričakujemo prve konkretne implementacije v praksi (na področju onkologije in na področju izvajanja storitev v večjem obsegu z industrijskim partnerjem na področju delovanja bioloških zdravil).

**16. Ocenite, ali bi doseženi rezultati v okviru programa lahko vodili do ustanovitve spin-off podjetja, kolikšen finančni vložek bi zahteval ta korak ter kakšno infrastrukturo in opremo bi potrebovali**

možnost ustanovitve spin-off podjetja	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
potrebni finančni vložek	EUR
ocena potrebne infrastrukture in opreme <sup>18</sup>	

**17. Izjemni dosežek v letu 2014<sup>19</sup>**

**17.1. Izjemni znanstveni dosežek**

Izjemni znanstveni dosežek v letu 2014 je objava v Nature Comm (Singh et al., 2014)

**17.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek**

Izjemna družbeno-ekonomska dosežka v letu 2014 sta objavi v reviji Plos ONE (Potokar et al, 2014) in v reviji GLIA (Vardjan et al. 2014), ki prinašata uporabo novih tehnologij in priprvem tudi novo spoznanje povezano z okužbami z virusom klopnega meningoencefalitisa, kar predstavlja v Evropi in Aziji velik zdravstveni problem.

## 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 in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS;
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v papirnati obliki;
- so z vsebino poročila seznanjeni in se strinjajo vsi izvajalci raziskovalnega programa.

**Podpisi:**

*zastopnik oz. pooblaščen oseba  
matične RO (JRO in/ali RO s  
koncesijo):*

in

*vodja raziskovalnega programa:*

Univerza v Ljubljani, Medicinska  
fakulteta

Robert Zorec

**ŽIG**

Kraj in datum:

Ljubljana

10.3.2015

**Oznaka poročila: ARRS-RPROG-ZP-2015/140**

<sup>1</sup> Napišite povzetek raziskovalnega programa v slovenskem jeziku (največ 3.000 znakov vključno s presledki – približno pol strani, velikost pisave 11) in angleškem jeziku (največ 3.000 znakov vključno s presledki – približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>2</sup> Napišite kratko vsebinsko poročilo, v katerem predstavite raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega programa in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. V primeru odobrenega povečanja obsega financiranja raziskovalnega programa v letu 2014 mora poročilo o realizaciji programa dela zajemati predložen program dela ob prijavi in predložen dopolnjen program dela v letu 2014. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>3</sup> Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>4</sup> V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa dela raziskovalnega programa, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega programa oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave programske skupine v zadnjem letu izvajanja raziskovalnega programa, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, navedite: "Ni bilo sprememb.". Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>5</sup> Navedite znanstvene dosežke (največ pet), ki so nastali v okviru izvajanja raziskovalnega programa. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja programa vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'. [Nazaj](#)

<sup>6</sup> Navedite družbeno-ekonomske dosežke (največ pet), ki so nastali v okviru izvajanja raziskovalnega programa. Družbeno-ekonomski dosežek iz obdobja izvajanja programa 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 programa ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

<sup>7</sup> Navedite rezultate raziskovalnega programa iz obdobja izvajanja programa 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 (približno 1/3 strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>8</sup> Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://www.sicris.si/> za posamezen program, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

<sup>9</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki (približno 2/3 strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>10</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki (približno 2/3 strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>11</sup> Upoštevajo se le tiste diplome, magisteriji znanosti in doktorati znanosti (zaključene/i v obdobju 1.1.2009–31.12.2014), pri katerih so kot mentorji sodelovali člani programske skupine. [Nazaj](#)

<sup>12</sup> Vpišite število opravljenih diplom v času izvajanja raziskovalnega programa glede na vrsto usposabljanja. [Nazaj](#)

<sup>13</sup> Vpišite šifro raziskovalca in/ali ime in priimek osebe, ki je v času izvajanja raziskovalnega programa pridobila naziv magister znanosti in/ali doktor znanosti ter označite doseženo izobrazbo. V primeru, da se je oseba usposabljala po programu Mladi raziskovalci, označite "MR". [Nazaj](#)

<sup>14</sup> Za mlade raziskovalce, ki ste jih navedli v tabeli 11.2. točke (usposabljanje so uspešno zaključili v obdobju od 1.1.2009 do 31.12.2014), izberite oz. označite, kje so se zaposlili po zaključenem usposabljanju. [Nazaj](#)

<sup>15</sup> Navedite naslove projektov in ime člana programske skupine, ki je bil vodja/koordinator navedenega projekta. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>16</sup> Navedite naslove projektov, ki ne sodijo v okvir financiranja ARRS (npr: industrijski projekti, projekti za druge naročnike, državno upravo, občine idr.) in ime člana programske skupine, ki je bil vodja/koordinator navedenega projekta. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>17</sup> Opišite možnosti za uporabo rezultatov v praksi. Opišite izdelke oziroma tehnologijo in potencialne trge oziroma niše, v katere sodijo. Ocenite dodano vrednost izdelkov, katerih osnova je znanje, razvito v okviru programa oziroma dodano vrednost na zaposlenega, če jo je mogoče oceniti (npr. v primerih, ko je rezultat izboljšava obstoječih tehnologij oziroma izdelkov). Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>18</sup> Največ 1.000 znakov vključno s presledki (približno 1/6 strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

<sup>19</sup> Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega programa v letu 2014 (največ 1000 znakov, vključno s presledki, velikost pisave 11). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.rrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.rrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROG-ZP/2015 v1.00b

AE-42-F3-7D-B6-E3-7B-A6-A9-8F-6A-65-DC-D2-22-66-A3-AD-09-37