

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/41

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J1-0185
Naslov projekta	Proteomska identifikacija izvenceličnih substratov cisteinskih proteaz
Vodja projekta	18801 Marko Fonovič
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	4.170
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	07.
Naziv	Zdravje

2. Sofinancerji²

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

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta³

Proteaze imajo pomembno vlogo pri urejanju signalnih poti na celični površini in pri preurejanju izvenceličnega matriksa. Proteine na celični površini lahko aktivirajo, inaktivirajo ali pa kako drugače vplivajo na njihovo delovanje. Cisteinski katepsini so skupina papainu sorodnih cisteinskih proteaz, ki se pri številnih rakastih obolenjih prenesejo na zunanji del celične membrane in v zunajcelični prostor. Tam cepijo membranske proteine in izvencelični matriks, s čimer pripomorejo k napredovanju tumorja. Mikroskopije tumorja poleg tumorskih celic sestavljajo tudi normalne epitelijske celice in imunske celice, vse prisotne celice pa izločajo proteaze in njihove substrate, ki omogočijo napredovanje rakastega tkiva. Do sedaj je bilo znanih le malo izvenceličnih proteinskih substratov katepsinov, zato smo v okviru našega dela izvedli sistematično proteomsko identifikacijo membranskih substratov katepsinov z uporabo masne spektrometrije. Fiziološki pomen odkritih cepitev smo preverili tudi na celičnih in živalskih modelih.

Naše delo je bilo razdeljeno v štiri sklope:

1. Tretiranje celic z rekombinantnimi katepsini
2. Identifikacija odcepljenih proteinov z masno spektrometrijo
3. Validacija substratov v celičnih kulturah
4. Detekcija procesiranja substratov v živalskih modelih

1. Tretiranje celic z rekombinantnimi katepsini

V naši študiji smo uporabili človeške katepsine B, L in S za katere je znano, da imajo povišano izražanje v tumorjih in da sodelujejo pri procesu tumorigeneze. Omenjeni katepsini so bili pri številnih vrstah raka detektirani tudi v izvencelični obliki. Katepsine smo pridobili v rekombinantni obliki. Človeški katepsin B smo izrazili v bakteriji *E. coli*, katepsina L in S pa v kvasovki *P. pastoris*. Katepsine smo izolirali s kromatografskimi metodami in njihovo aktivnost preverili s titracijo aktivnega mesta.

Izvencelični katepsini v tumorskem mikrokolju ne izvirajo le iz rakastih celic, ampak tudi iz lokalnih epitelijskih in imunskih celic. V raziskavo smo zato poleg rakastih vključili tudi endotelijske, epitelijske in imunske celice. Celice smo gojili v kulturi in jih po spiranju ločili od podlage z raztopino za disociacijo celic brez encimov (Millipore). Potem smo jih resuspendirali v puferski raztopini, ki je vsebovala 1uM koncentracijo katepsina in jih inkubirali eno uro pri 37°C. Čas inkubacije in koncentracijo katepsina smo predhodno optimizirali. Cepitve s katepsini smo izvajali pri kislem pH (pH=6), ker je pH v okolici tumorja pogosto rahlo kisel. Kasneje smo cepitve testirali tudi pri pH=7 in ugotovili, da so bili identificirani substrati cepljeni tudi pri nevtralnem pH. Po inkubaciji smo supernatant z odcepljenimi peptidi pripravili za analizo z masno spektrometrijo. Kot negativno kontrolo smo uporabili celice tretirane s katepsinom, ki je bil predhodno inhibiran s splošnim ireverzibilnim inhibitorjem cisteinskih proteaz (E-64). V okviru našega dela smo s katepsini testirali naslednje celične linije: MDA-MB-231 (rak dojke), MCF-7 (rak dojke), HeLa (rak materničnega vratu), CaCo2 (kolorektalni adenokarcinom), T-98 (glioblastom), HT-144 (melanom), SY5Y (neuroblastom), HaCaT (keratinociti) in HL-60 (monociti).

2. Identifikacija odcepljenih proteinov z masno spektrometrijo

Supernatant z odcepljenimi peptidi smo denaturirali v prisotnosti uree, reducirali z DTT in alkilirali z jodoacetamidom. Prvotno smo vzorce cepili s tripsinom v raztopini in jih identificirali s tehniko MudPIT LC-MS/MS (Washburn in sod., 2001). Kasneje smo postopek spremenili tako, da smo namesto na dvodimenzionalno kromatografijo vzorce nanegli na SDS-PAGE. Iz akrilamidnega gela smo potem izrezali proteinske lise celotnega vzorca in ga pripravili za analizo z "in gel" razgradnjo s tripsinom. Z uporabo SDS-PAGE gelov smo olajšali tehnično izvedbo eksperimentov, ter zvišali občutljivost detekcije proteinov v vzorcih. Identifikacijo proteinov smo opravili z masnima spektrometroma Agilent MSD Trap XCT Ultra (Agilent, ZDA) in LTQ Orbitrap Velos ETD (Thermo, ZDA). Za iskanje po bazah podatkov smo uporabili programske pakete Spectrum Mill (Agilent, ZDA), Mascot (Matrix Science, VB) in Sequest (Thermo, ZDA),

končno statistično evaluacijo rezultatov pa smo opravili s programom Scaffold (Proteome Software, ZDA). V posameznem eksperimentu smo identificirali 400-500 proteinov. Njihovo relativno količino (glede na negativno kontrolo) smo ocenili z metodo spektralnega štetja. Po pričakovanju so v posamezni analizi večino identificiranih proteinov (90%) predstavljali znotrajcelični proteini (citosolni, citoskeletni in jedrni), ki so izhajali iz celic poškodovanih med pripravo vzorca. Pri celicah tretiranih s katepsinom L in S smo opazili skupino ekstracelularnih domen (ektodomen) membranskih proteinov, ki je bila prisotna izključno v tretiranih vzorcih in ne v negativni kontroli. Ti membranski proteini so bili izbrani za nadaljno delo kot možni substrati katepsinov. Ob uporabi katepsina B teh substratov nismo detektirali. Vsako identifikacijo smo izvedli s tremi biološkimi ponovitvami in vsi identificirani substrati so imeli 100% ponovljivost. Tako smo identificirali 8 substratov, katere lahko razdelimo v dve skupini:

- receptorji (TfR1, neuropilin 1, CD44, EphA2)
- adhezijski proteini (ALCAM, NrCAM, CD109, L1CAM)

Identificirane substrate v supernatantu celic tretiranih s katepsini smo detektirali tudi imunološko s protitelesi specifičnimi proti ekstracelularnim domenam substratov. Imunološka detekcija je pokazala, da katepsina L in S pri vseh identificiranih substratih cepita segmente ekstracelularnih domen in substratov ne razgrajujeta nespecifično. Pri uporabi katepsina B cepitev ekstracelularnih domen nismo opazili, kar je v skladu z njegovo eksopeptidazno aktivnostjo. Katepsin B zato ne more cepiti posameznih proteinskih domen, lahko jih le razgradi s C-terminalnega konca. Ti eksperimenti kažejo, da podobno kot metaloproteinaze tudi katepsini lahko odcepljajo ekstracelularne domene membranskih proteinov, kar do sedaj se ni bilo opisano v literaturi. Taksna fiziološka aktivnost katepsinov bi lahko pojasnila številna objavljena opažanja o vplivu izvenceličnih katepsinov na fiziologijo celic. Za vse naše identificirane substrate je tudi znano, da sodelujejo pri procesih kancerogeneze. Njihova proteolitska cepitev bi zato lahko bistveno vplivala na nekatere pomembne celične procese.

3. Validacija substratov v celičnih kulturah

V naslednji stopnji našega dela smo na celičnih modelih preverili kako prisotnost izvenceličnega katepsina vpliva na fiziologijo celic. Celice smo za kratek čas (10 min) tretirali s rekombinantnimi katepsini B, L in S in spremljali spremembo proliferacije in migracije. Kot negativno kontrolo smo uporabili katepsin inhibiran z inhibitorjem E-64. Pri celični proliferaciji nismo opazili signifikantnih sprememb med tretiranimi celicami in negativno kontrolo. Sprememb nismo opazili pri nobenem izmed treh uporabljenih katepsinov. Popolnoma drugačen rezultat smo dobili pri testih migracije, kjer je prisotnost katepsina bistveno zvišala migracijo celic. Zvišanje koncentracije dodanega katepsina je sorazmerno zvišalo tudi migracijo. Sprememba migracije celic bi lahko bila povezana s cepitvijo CAM proteinov (ALCAM, NrCAM, L1CAM), ki uravnavajo celično adhezijo. To smo potrdili s pomočjo legumaina. Legumain je cisteinska proteaza sorodna katepsinom, ki pa se od njih razlikuje po tem da ima bolj specifičen spekter delovanja. Peptidno verigo lahko cepi le za asparaginom. S proteomsko in imunološko detekcijo smo pokazali, da legumain ne cepi CAM proteinov, cepi pa nekatere druge substrate (CD44, neuropilin 1, TfR1). S testi migracije celic smo tudi pokazali, da legumain v nasprotju s katepsini ne vpliva na celično migracijo. Naši eksperimenti tako nakazujejo, da katepsini lahko vplivajo na celično migracijo preko cepitev CAM proteinov, kar do sedaj še ni bilo znano.

5. Detekcija procesiranja substratov v živalskih modelih

Za in vivo detekcijo cepitev substratov smo uporabili mišji model raka trebušne slinavke Rip1Tag2. Ta model je bil v preteklosti uporabljen za številne študije vloge cisteinskih katepsinov v procesih tumorigeneze, njegova velika prednost pa je, da je na voljo tudi v kombinaciji z genotipom z izbitimi katepsinskimi geni. Preko sodelave z raziskovalno skupino prof. dr. Johanne

Joyce (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, ZDA) smo dobili Rip1Tag2 tumorje iz WT miši, pa tudi Rip1Tag2 tumorje miši z izbitimi geni za katepsina S in B. Prisotnost cepljenih oblik substratov smo imunološko detektirali v topnem lizatu tumorjev. Cepljene oblike substratov so bile prisotne pri WT tumorjih, ne pa pri catS -/- tumorjih, kar pomeni, da jih katepsin S cepi in vivo. Pri catB -/- tumorjih smo opazili le rahlo zmanjšanje prisotnosti cepljenih substratov. Naši rezultati kažejo, da v tumorskem mikrookolju in vivo dejansko pride do cepitev izvenceličnih domen identificiranih membranskih substratov.

Zaključimo lahko, da smo uspešno dokazali našo hipotezo, da katepsini cepijo izvencelične domene (ektodomene) membranskih proteinov in na ta način vplivajo na fiziološke lastnosti celic. Potrdili smo tudi domnevo, da so ti procesi še posebej pomembni pri razvoju raka, kar uvršča ta projekt med visoko kompetitivne raziskave. Z odkritjem novih substratov cisteinskih katepsinov, smo odprli tudi nove možnosti za nadaljne raziskave mehanizmov delovanja njihovih proteolitskih cepitev.

4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

Ocenjujemo, da smo izpolnili zadane raziskovalne cilje. V okviru predlaganega dela je bilo potrebno uvesti številne nove eksperimentalne tehnike, ki v Sloveniji še niso bile uporabljene. Kljub tehnični zahtevnosti je delo večinoma potekalo brez zastojev, določene eksperimentalne težave so se pojavile pri kemijskem označevanju N- in C- terminalnih peptidov. Zaradi tega je bilo potrebno eksperimentalni pristop večkrat modificirati in optimizirati, kar je upočasnilo izvajanje eksperimenta. Zaradi zastoja pri uvajanju te metodologije identifikacija mest cepitev še vedno poteka. Posledično smo se pri uporabi katepsinov omejili predvsem na tiste z endopeptidazno aktivnostjo. Z realizacijo projekta in kvaliteto pridobljenih rezultatov smo izjemno zadovoljni. Znanstveni članek o opravljenem delu je trenutno v pripravi.

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

V programu raziskovalnega projekta ni bilo bistvenih odstopanj, prav tako ni bilo sprememb v sestavi projektne skupine.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

		Znanstveni rezultat	
1.	Naslov	SLO	Zmanjšanje proliferacije rakastih celic in tvorbe metastaz pri karcinomu mlečne žleze miši brez katepsina B
		ANG	Reduced tumour cell proliferation and delayed development of high-grade mammary carcinomas in cathepsin B-deficient mice.
	Opis	SLO	Testirali smo vpliv izbitja gena za katepsin B na razvoj raka pri PyMT mišjem modelu raka. Izbitje katepsina B je znižalo število metastaz in proliferacijo celic karcinoma mlečne žleze.
		ANG	Influence of cathepsin B knockout on cancer progression of PyMT mouse cancer model was tested. It was observed that deletion of cathepsin B reduced metastatic burden and cell proliferation in mammary carcinomas.
	Objavljeno v	Oncogene (Basingstoke), 2008, vol. 27, no. 30, str. 4191-4199.	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
COBISS.SI-ID	21554983		
2.	Naslov	SLO	Nasprotujoča vloga cisteinskih katepsinov pri razvoju raka: apoptoza proti tumorski invaziji.
		ANG	Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression : apoptosis versus tumour invasion.

	Opis	SLO	Pripravili smo pregledni članek v katerem smo predstavili mehanizme preko katerih cisteinski katepsini vplivajo na apoptozo in invazijo tumorskih celic.
		ANG	This mini review provides an insight into the mechanisms by which cysteine cathepsins modulate apoptosis and participate in tumor invasion.
	Objavljeno v	Biochimie (Paris), 2008, vol. 90, no.2, str. 380-386.	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
	COBISS.SI-ID	21287207	
3.	Naslov	SLO	Sinergijski antitumorski vpliv odsotnosti katepsinov B in Z na razvoj raka dojke in tvorbo metastaz v miših.
		ANG	Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice.
	Opis	SLO	Določili smo vpliv odsotnosti katepsinov B in Z na napredovanje raka dojke in tvorbo metastaz. Opazili smo, da odsotnost obeh katepsinov vodi do bistvenega zastoja pri tvorbi tumorjev in zmanjšanja števila metastaz. Odsotnost obeh katepsinov ima tako sinergijski efekt na inhibicijo kancerogeneze.
		ANG	We have studied the effects of cathepsin B and cathepsin Z double knockout on breast cancer progression and methastasis formation was studied. It was found that combined loss of both cathepsins resulted in significant delay of tumor formation and the number of lung methastases. It was concluded, that double deficiency exerts synergistic anticancer effects
	Objavljeno v	Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2010, vol. 107, no. 6, str. 2497-2502.	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
COBISS.SI-ID	23396391		
4.	Naslov	SLO	
		ANG	
	Opis	SLO	
		ANG	
	Objavljeno v		
	Tipologija		
	COBISS.SI-ID		
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	Proteomska identifikacija izvenceličnih substratov cisteinskih proteaz
		ANG	Proteomic identification of extracellular substrates of cysteine proteases
	Opis	SLO	Marko Fonovic je kot vabljeni predavatelj predstavil delo na področju proteomske identifikacije novih substratov cisteinskih katepsinov na mednarodni konferenci posvečeni proteomiki.
		ANG	Marko Fonovic was invited to present his work on proteomic identification of novel substrates of cysteine cathepsins on a proteomics conference in Greece.
	Šifra	B.04 Vabljeno predavanje	
	Objavljeno v	1st International Proteomics Conference, 7 October 2010, Crete, Hellas. 2010	
	3.16 Vabljeno predavanje na konferenci brez natisa		

	Tipologija		
	COBISS.SI-ID	24072999	
2.	Naslov	SLO	Shedazna aktivnost cisteinskih katepsinov
		ANG	Sheddase activity of cysteine cathepsins.
	Opis	SLO	Marko Fonovič je kot vabljeni predavatelj predstavil delo na področju identifikacije in validacije izvenceličnih membranskih substratov cisteinskih katepsinov. Delo je bilo predstavljeno na uglednem mednarodnem znanstvenem srečanju posvečenemu proteazam.
		ANG	As an invited speaker, Marko Fonovic presented his work on identification and validation of extracellular membrane substrates of cysteine cathepsins. Work was presented on a scientific meeting dedicated to proteases.
	Šifra	B.04	Vabljeno predavanje
	Objavljeno v	XIIth Symposium on Proteases, Inhibitors and Biological Control, Portorož, Slovenia, September 25-29, 2010. Book of abstracts. Ljubljana: Jožef Stefan Institute, 2010, str. 17.	
	Tipologija	1.12	Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
	COBISS.SI-ID	24059687	
3.	Naslov	SLO	Biological chemistry. Turk, Boris (član uredniškega odbora 2003-2008, urednik 2008-).
		ANG	Biological chemistry. Turk, Boris (member of editorial board 2003-2008, editor 2008-).
	Opis	SLO	Boris Turk je bil član uredniškega odbora od 2003-2008 in je urednik od leta 2008.
		ANG	Boris Turk was a member of editorial board from 2003 to 2008 and is editor from 2008.
	Šifra	C.06	Članstvo v uredniškem odboru
	Objavljeno v	Biological chemistry. Berlin; New York: Walter de Gruyter. ISSN 1431-6730.	
	Tipologija	4.00	Sekundarno avtorstvo
	COBISS.SI-ID	1541908	
4.	Naslov	SLO	XII Simpozij o proteazah, inhibitorjih in biološki kontroli, Portorož, Slovenia, September 25-29, 2010
		ANG	XIIth Symposium on Proteases, Inhibitors and Biological Control, Portorož, Slovenia, September 25-29, 2010
	Opis	SLO	Boris Turk je bil član organizacijskega odbora simpozija posvečenega proteazam, ki je vsaki dve leti organiziran v Portorožu. Znanstvenega srečanja se redno udeležujejo vrhunski raziskovalci s tega področja.
		ANG	Boris Turk was a member of organizing committee of biannual symposium dedicated to proteases, which is held at Portorož. The meeting is regularly attended by the most prominent scientists from the field.
	Šifra	B.01	Organizator znanstvenega srečanja
	Objavljeno v	Book of abstracts. Ljubljana: Jožef Stefan Institute, 2010. 130 str. ISBN 978-961-264-022-4.	
	Tipologija	4.00	Sekundarno avtorstvo
	COBISS.SI-ID	252579328	
5.	Naslov	SLO	Current pharmaceutical design. Turk, Boris (gostujoči urednik 2007-)
		ANG	Current pharmaceutical design. Turk, Boris (guest editor 2007-)
	Opis	SLO	Boris Turk deluje kot gostujoči urednik revije od leta 2007.
		ANG	Boris Turk is appointed as a guest editor of the journal since the year 2007.
	Šifra	C.03	Vabljeni urednik revije (guest-associated editor)
	Objavljeno v	Current pharmaceutical design. Schiphol: Bentham Science Publishers. ISSN 1381-6128.	
	Tipologija	4.00	Sekundarno avtorstvo
	COBISS.SI-ID	16094247	

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

--

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

9.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

Katepsini imajo pomembno vlogo pri procesu razvoja raka. Znano je, da pospešujejo invazijo, proliferacijo, apoptozo in angiogenezo, vendar pa njihovo delovanje na molekularnem nivoju še ni popolnoma razjasnjeno. Opravljena raziskava predstavlja prvo identifikacijo izvenceličnih membranskih substratov cisteinskih katepsinov z uporabo proteomike. Identifikacija novih substratov in njihova validacija v celičnih in živalskih modelih bo omogočila boljše razumevanje fiziološke vloge katepsinov, še posebej pa njihove vloge pri razvoju rakastih obolenj. Pridobljeni rezultati so nam odprli izjemne možnosti za nadaljne mednarodno kompetitivne raziskave na področju kancerogeneze. Rezultati tega projekta bodo v oporo tudi drugim raziskavam na našem odseku, v prihodnosti pa bi lahko prispevali tudi k razvoju novih pristopov zdravljenja raka.

Proteomika je postala nepogrešljivo orodje v modernih biomedicinskih raziskavah in brez tega znanja bi slovenska znanost zaostala za razvitim svetom. V okviru opravljenega raziskovalnega dela smo pridobili številne izkušnje na področju proteomske analize in uvedli metodologije, katerih do sedaj v Sloveniji še ni bilo. S pridobljenim znanjem bomo prispevali k boljši uveljavitvi proteomike v slovenskem raziskovalnem prostoru, kar bo izboljšalo tudi kvaliteto biomedicinskih raziskav v Sloveniji.

ANG

Cathepsins have been identified as important players in the process of cancer progression. They are known to promote invasion, proliferation, apoptosis and angiogenesis. Despite that, their exact mode of action on molecular level still remains largely unknown. Research performed within this project was the first large scale proteomic identification of extracellular cathepsin substrates. Identification of those substrates and their validation on cellular and animal models will provide a better understanding of cathepsin physiological function and especially their role in tumor progression. Results obtained in this project have opened numerous possibilities for further competitive research in the field of cancerogenesis. Obtained results will also promote other cancer related projects within our department and could open the way toward new approaches in cancer treatment.

Proteomics has become an indispensable tool for advancement of biomedical research in the modern world and without this know-how, Slovenian research would start lagging behind. While working on this project we have expanded our experience in proteomic analysis. We have introduced methodologies which are completely novel in slovenian research community. With this experience, we will be able to introduce proteomics technology to Slovenian research community. This advancement will be beneficial for the quality of all biomedical and biological research in Slovenia.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Kot prvi proteomski laboratorij v državi naše znanje in storitve delimo tudi z drugimi slovenskimi raziskovalnimi institucijami in gospodarskimi družbami. Proteomika ni pomembna le za osnovne biomedicinske raziskave, temveč je postala tudi nepogrešljiv del moderne farmacevtske industrije. Izdelava rekombinantnih zdravil zahteva natančno poznavanje primarne strukture in posttranslacijskih modifikacij proteina, to pa je mogoče doseči le z proteomsko analizo. Razvoj metodologij proteomske analize povezan z opravljenim projektom je razširil obseg naših analitskih storitev, okreplil pa je tudi naše sodelovanje s farmacevtsko in biotehnološko industrijo. S proteomiko naš odsek sodeluje z industrijo tudi preko centra odličnosti CIPKEBIP in centra kompetentnosti Brin.

Prepričani smo, da bodo naši raziskovalni rezultati imeli velik vpliv na področju raziskav raka ter, da bodo promovirali slovensko znanost na številnih mednarodnih kongresih in preko objav v visoko rangiranih znanstvenih revijah. Okrepili smo tudi naše sodelovanje z nekaterimi elitnimi svetovnimi raziskovalnimi institucijami. Te povezave nam bodo omogočile nadaljno sodelovanje pri vodilnih mednarodnih raziskovalnih projektih, preko tega pa bo Slovenija še naprej ostala v stiku z vrhunsko svetovno znanostjo.

ANG

Being the first proteomic laboratory in the country, our services and know-how is also available

to other research and development oriented institutions and companies in Slovenia. Proteomics is important part of basic biological and medical research but it is even more crucial in modern pharmaceutical industry. Production of recombinant drugs requires the exact knowledge of the protein sequence and its posttranslational modifications. This can only be achieved through proteomic analysis. While working on this project, we have expanded our experimental knowledge and introduced new methodologies in our workflow. This will enable us to provide better service to other Slovenian research institutions and it will also further our collaborations with pharmaceutical and biotech industry. By proteomics, our department has also established beneficial collaborations with industrial partners through Centre of excellence CIPKEBIP and Centre of competence Brin.

We are confident, that research results obtained from this project will have significant impact in the field of cancer research and will promote Slovenian science through many international research conference participations and publications in high impact scientific journals. They have also tighten our connections with some of the worlds top research institutions. Those connections will increase our possibilities for participation in leading international research projects and will keep Slovenia in touch with worlds cutting edge science.

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 upravljaljskih 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="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
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="text"/>	<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	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
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	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
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.		
2.	Sofinancer		
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja		Šifra
	1.		
	Komentar		
	Ocena		
	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:

Marko Fonovič	in	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseba RO

Kraj in datum:

Ljubljana

19.4.2011

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/41

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 Šifrantu 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

85-08-01-B5-E8-A0-D9-E9-C9-41-A6-24-CD-EF-3B-96-D4-13-92-0C