

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2013/164



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J1-2095
Naslov projekta	Apoptoza tumorskih celic kot tarča kemoterapevtikov
Vodja projekta	7802 Tamara Lah Turnšek
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	4173
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	05.2009 - 04.2012
Nosilna raziskovalna organizacija	105 Nacionalni inštitut za biologijo
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	1 NARAVOSLOVJE 1.09 Farmacija
Družbeno-ekonomski cilj	07. Zdravje

2. Raziskovalno področje po šifrantu FOS¹

Šifra	3.01
- Veda	3 Medicinske vede
- Področje	3.01 Temeljna medicina

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta²

SLO

Glioblastoma multiformae (GBM) je visoko invaziven možganski tumor, katerega 5-letno preživetje bolnikov je pod 10%, kar zahteva učinkovitejše zdravljenje GBM. Veliko dokazov podpira uporabo proteaznih inhibitorjev v adjuvantnem zdravljenju raka. Predmet naših raziskav sta lizosomalni proteazi **katepsina L (CatL)** in **B (CatB)**, ki se aktivirata med napredovanjem GBM,

a imata v tem različno vlogo. Predlagali smo raziskati mehanizme delovanja specifičnih inhibitorjev CatL in CatB za razvoj novih terapij.

CatL naj bi imel v GBM predvsem anti-apoptozno vlogo. Predpostavljali smo, da inhibicija CatL poveča občutljivost celic GBM na citotoksične spojine z indukcijo apoptoze. V tem pogledu bi se sinteza visoko specifičnih molekul, t.i. lovka za CatL izkazala uporabno. Sintetizirali smo serijo inhibitorjev z **acetiloksimetil ketonsko (AOMK)** reaktivno skupino na ogrodju Cbz-Phe-Lys-CH₂OCO-(2,6-(CH₃)₂)Ph, spojine AT071 z izraženo specifičnostjo za oba CatB/CatL, z membransko prehodnostjo in z nizko citotoksičnostjo. To smo modificirali dalje za večjo CatL selektivnost in derivate testirali z rekombinantnima CatL in CatB ter v celicah GBM - U87. Te smo testirali v primerjavi s standardnim epoksidnim inhibitorjem CatL (Clik148) in z utišanjem (siRNA) CatL, na apoptozo, sproženo s citostatikom **Trisenoxom** - **As₂O₃** (uporabljen namesto predlaganega temazolamida) v U87 in v primarnih sferoidih GBM.

CatB pa naj bi sodeloval predvsem v invaziji GBM, kar smo dokazali v kulturah GBM sferoidov, medtem ko so v GBM matičnih celicah (GSC) katepsini slabo izraženi. Raziskave novih označevalcev GSC relevantnih za njihovo odpornost na citostatike in invazijo so v teku, razpolagamo že z naborom kandidatnih proteinov.

Rezultati, usklajeni s predlaganimi cilji so:

- I)
 - a) Uspešno smo sintetizirali selektivno spojino AT094, ki pospeši apoptozo v celicah GBM, sproženo z arzenitom.
 - b) Sintetizirali smo foto-inducibilno benzofenonsko lovko AT120Cy3S, ki ne prehaja v celice in je zato uporabna za selektivno zaznavo aktivnega izven celičnega CatL.
 - c) Dokazali smo, da AT094 selektivno inhibira aktivnost CatL v jedrni frakciji, ki je najverjetneje odgovorna za anti-apoptozno delovanje CatL v GBM.

- II)
 - a) Ugotovili smo mehanizem vpliva arzenita na autofagijo in apoptozo v celicah in sferoidih GBM ter sinergistično povišanje njegove citotoksičnosti ob inhibiciji CatL.
 - b) Prvi smo dokazali selektivno in učinkovito inhibicijo CatB z arzenitom, kar blokira autofagijo in posledično povzroči apoptozo v U87 celicah in sferoidih.
 - c) Selektivni inhibitorji CatB in ne CatL inhibirajo migracijo GBM sferoidov.
 - d) Dokazali smo toksičnost resveratrola in ksantohumola za celice GBM.

- III)
 - a) Dokazali smo nizko vsebnost katepsinov in nizko invazijsko sposobnost GSC kar je v obratni korelaciji z njihovim markerjem CCD133+ ter
 - b) prognostično uporabnost CD133/prominina za preživetje bolnikov z GBM.

ANG

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most invasive type of brain tumours with 5-years survival remaining less than 10%, urging for development of new therapies. Several evidence support the use of protease inhibitors as adjuvant drugs in cancer. Our research was focused on lysosomal proteases **cathepsin L (CatL)** and **B (CatB)**, which are highly active during GBM progression, where they act differently. We proposed to address the CatL/CatB mechanisms and specific inhibitors for novel GBM therapies design.

CatL was suggested to have anti-apoptotic role in GBM. We believe that CatL inhibition could enhance the sensitivity of GBM cells to apoptosis induced by cytotoxic drugs In this respect, the synthesis of a CatL selective probe would prove highly useful. Therefore, the inhibitors with **acyloxymethyl ketone (AOMK)** reactive group have been synthesised based on the Cbz-Phe-Lys-

CH₂OCO-(2,6-(CH₃)₂)Ph structure, named AT071 displaying CatB and CatL selectivity, penetrative properties and lacking cell's toxicity. AT071 was modified to allow for higher CatL specificity and tested on recombinant CatL and CatB and in U87 GBM cells. For a comparison the standard epoxide CatL inhibitor (Click148) and CatL silencing (siRNA) were tested for the effect on apoptosis and autophagy induced by **Trisenox-As₂O₃** (instead of planned temozolomide) in GBM cells and spheroids.

CatB was suggested to play a role in GBM invasion, which we demonstrated in GBM spheroids, whereas GBM stem cells (GSC) have a low level of cathepsins expression. Studies on new GSC markers relevant for their resistance and invasion are underway; we already have a list of candidate proteins at disposal.

Results, consistent with project proposal are:

- I.
 - a) We successfully synthesized a selective AT094 inhibitor, which enhances apoptosis induced by arsenite in GBM cells.
 - b) We proved that AT094 selectively inhibits CatL activity in the nuclear fraction of GBM cells presumably responsible for the anti-apoptotic effect.
 - c) We synthesized a photo inducible benzophenone AT120Cy3S probe, lacking penetrating ability that makes it promising for detecting active extracellular CatL.

- II.
 - a) We revealed the mechanism of arsenite's effect on autophagy and apoptosis in GBM cells and spheroids; proved synergistic increase of its toxicity upon CatL inhibition.
 - b) We were first to demonstrate selective and efficient CatB inhibition with arsenite, that blocks autophagy and consequently induces apoptosis in U87 cells.
 - c) Selective CatB, but not CatL inhibitors can inhibit GBM migration in spheroids.
 - d) We proved resveratrol and xanthohumol toxicity in GBM cells.

- III.
 - a) We proved low cathepsins' expression and low invasiveness of GSC, which inversely correlates with the expression of CD133+/prominin biomarker,
 - b) which proved prognostically relevant for GBM patient survival.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu³

V tem projektu smo si postavili cilje, kako vplivati na:

- povečano odpornost GBM celic na apoptozo, povzročeno s citostatiki,
- infiltrativno invazijo gijljivih celic GBM in GBM matičnih (CD133+) celic-

Orodje za potrditev teh hipotez so selektivni katepsinski inhibitorji, ki predstavljajo potencialno nova tarčna zdravila. Zato smo želeli:

- I. **Sintetizirati nove strukture selektivnih CatL inhibitorjev za pospešen apoptozni odziv celic GBM na As₂O₃ in TMZ.**
- II. Uporabiti **selektivne CatB inhibitorje za inhibicijo migracije celic GBM**, ki bi povečala **občutljivost teh celic na apoptozo** inducirano s kemoterapijo.
- III. Ta učinek **optimizirati tudi za GBM matične celice s kombinirano uporabo teh inhibitorjev in različnih odmerkov Trisenoxa oz TMZ.**

Specifični rezultati (v povzetku) naštetim ciljem so:

Ad Ia: Določitev in sinteza minimalnih peptidilnih inhibitornih motivov selektivnih za CatL, z uporabo enostavne in hitre peptidne sinteze na trdnih nosilcih. Tarčno specifična kovalentna inhibicija poteče v dveh korakih: najprej pride do vezave peptidilnega motiva z veliko afiniteto in

nato do kovalentne vezave z reaktivnim elektrofilom. S primerjavo struktur cisteinskih katepsinov, smo v tem delu izdelali knjižnico 51 di- in tripeptidnih molekul z visoko selektivnostjo za CatL. Te je možno pretvoriti v različne vrste inhibitorjev glede na kemijsko vezavo v aktivnem mestu (acil-oxy-metil ketoni=AMOK, epoksidi). Poleg tega je možno v inhibitorno molekulo uvesti tudi fluorescenčne skupine, kar pa zaradi velikosti lahko vpliva na selektivnost lovke. Strukture inhibitornih lovk smo pripravili z modifikacijami na P1, P2 in na P3 mestih. Na P1 smo kot najbolj učinkovitega za vezavo na CatL določili Lys (AT01), MeLys (AT10) in ornitin (AT11). Na P2 je bil to fenilni tiofen (AT21) in Tyr (AT24). Na P3 položaju so se pozitivno izkazale Trp (AT46), Leu (AT47), Arg (AT50) in Lys (AT51) z dodatno karboksi benzilno skupino na P4 mestu. Največjo selektivno vrednost smo izmerili pri spojinah AT42, AT47, AT50 in AT51, Ki za CatL pod 1 μ M pa smo izmerili pri vseh zgoraj omenjenih derivatih P3 mesta (AT28, AT46, AT47 in AT50), enem derivatu P2 mesta (AT21) ter pri posameznih derivatih z modificiranim P1 (AT21, AT01, AT10, AT11). Poleg tega smo izboljšali vodotopnosti molekul AT078 in AT091 s pomočjo bolj hidrofilnih fluorescenčnih skupin (Alexa fluor 488 in Cynine 3), vnosom kratkih polietilen gliokolov ali vnosom še enega lizina na P3 mesto. Vsi so se izkazali za kar 10-krat (AT091Cy celo 100 krat) bolj učinkovite inhibitorje CatL od znanih neselektivnih katepsinskih lovk GB111 in GB117. Ne glede na naravo fluorescentne skupine, vse te lovke dobro prehajajo v celice, ovrednotili smo njihovo selektivnost in kinetične lastnosti v in vitro celičnih ekstraktih ter vpliv na fenotip celic GBM: Članek z rezultati je bil poslan v objavo: **Torkar A. et al. Identification of new tri and tetrapeptide amides as potent and selective non-covalent inhibitors for cathepsin L: a first step towards selective irreversible inhibitors? 2013. Bioorg. Med. Chem. - Submitted**

Ad Ib: Benzofenonski inhibitorji - fotoafinitetne lovke. Sintetizirali smo selektivno fotoafinitetno benzofenonsko lovko (AsBp), ki ob osvetlitvi zamreži metionin (Met) blizu aktivnega mesta CatL, po katerem se le-ta specifično loči od homolognih katepsinov. Dokazali smo selektivnost Bp lovke za CatL na SDS-PAGE gelih v primerjavi s CatB, CatK, CatS in celo CatV, ki je najbolj soroden CatL. Bp lovka je specifično reagirala tudi s celičnim ekstraktom GBM celic (U87MG). Moč vezava nove Bp lovke je bila primerljiva z elektrofilnimi AOMK lovkami. Za razliko od AOMK lovk pa se je za Bp lovke izkazalo, da **ne prehajajo v celice** in zato predstavljajo novo orodje za določevanje aktivnega CatL v izven-celičnem prostoru bioloških vzorcev celo v pM koncentracijah. Objavljeno v članku: **Torkar A. et al. A novel photoaffinity-based probe for selective detection of cathepsin L active form. Chembiochem. 2012 Nov 26;13(17):2616-21.**

Obe deli sta bili izvedeni v okviru doktorskega študija Ane Torkar in v sodelovanju z Dr. Vincent Dive, CEA-Commissariat a l'energie atomique, France.

Ad Ic: V poskusih apoptoze so se novi inhibitorji CatL izkazali za bolj učinkovite od do sedaj uporabljenega manj specifičnega epoksidnega inhibitorja Clk148. Najprej smo se posvetili študiju mehanizma delovanja CatL v mehanizmu zaščite tumorskih celic pred apoptozo (anti-apoptotsko delovanje). Glede na literature podatke (Goulet et al, 2004) predpostavljamo, da je za to odgovoren CatL, ki se aktivira v jedru in vpliva na procesiranje in aktivnost transkripcijskih faktorjev (TF). To je dokazala dr. Saša Kenig v okviru svoje doktorske naloge. S fluorescenčnimi posnetki in Western odtisom je dokazala prisotnost CatL v jedrni frakciji U87MG celic, kjer CatL deluje so-odvisno od p53 in TF prohibina, kot posredni prožitelj prepisovanja anti-apoptoznih genov npr. BCL-2. Objavljeno v: **Kenig et al. Inhibition of cathepsin L lowers the apoptotic threshold of glioblastoma cells by up-regulating p53 and transcription of caspases 3 and 7. Apoptosis. 2011 Jul;16 (7):671-82.**

Ad Ila. Vpliv citostatika Trisenoxa (As_2O_3) v celicah GBM z utišanim CatL

Ker v začetku projekta še nismo razpolagali z ustreznimi lovskami smo predpodstavljeni koncept dokazali z utišanjem CatL s siRNA in inhibitorjem Clik148. Dokazali smo učinkovitost inhibicije CatL na povečanje citotoksičnega učinka Arzena v celicah U87 za več kot 10-krat. Utišanje CatL je zmanjšalo apoptozni prag celic U87 na arzen, mehanizem pa vključuje najprej klasično indukcijo autofagije, kjer pri tvorbi in aktivnosti autofagosomov sodeluje predvsem CatB, ki je bogato izražen v teh strukturah.

V sodelovanju s skupino dr. Milene Horvat (IJS) smo ob tem raziskali še vpliv arzena na izražanje metalotioneinov v U87 celicah GBM. Kljub splošnemu prepričanju, da npr. MT3 ne spada med inducibilne gene smo dokazali povečano izražanje vseh izo-oblik metalotioneinov v GBM, v koncentracijski odvisnosti od arzena. Povišano izražanje MT1X, MT1F in MT2A bi lahko sodelovalo pri vzpostavljanju rezistence GBM na arzen. Objavljeno v: **Falnoga I. et al. Arsenic trioxide (ATO) influences the gene expression of metallothioneins in human glioblastoma cells. Biol Trace Elem Res. 2012 Dec;149(3):331-9.**

Ad IIb. Citotoksično delovanje arzenita torej najprej v celicah sproži autofagijo, ki pa preide v apoptozo, najverjetneje zaradi blokade aktivnosti autofagosomov, ki so ključni za učinek "reševalnega mehanizma" autofagije. Vzrok je selektivna **inhibicija CatB z arzenitom**. S kinetskimi meritvam recCatB smo dokazali, da je ta strogo specifična, saj recCatL ni bi inhibiran - kar je povsem novo in nepričakovano spoznanje, katerega mehanizem še proučujemo. Delo je potekalo v okviru doktorske teme dr. Anje Pucer: **Pucer A. et al. Differential role of cathepsins B and L in autophagy-associated cell death induced by arsenic trioxide in U87 human glioblastoma cells. Biol Chem. 2010 May;391(5):519-31.**

Vpliv arzenita na GBM smo nadgradili še za 3D model U87 sferoidov, pripravljenih iz celic s trajno utišanim CatL (lentivirusna transdukcija), ki zaradi 3D strukture bolje posnemajo *in vivo* odziv tumorja. Pri tem smo prišli, do zaključka, da ima na citotoksičnost arzena velik vpliv t.i. multicelična odpornost (angl. *multicellular resistance effect*), ki sicer zniža občutljivost celic v sferoidih na arzenit, a se ob utišanju CatL kljub temu As toksičnost sinergistično poveča. Delo je bilo izvedeno v okviru doktorske naloge Monike Primon in poslano v objavo: **Monika P. et al. Cathepsin L Silencing Enhances Arsenic Trioxide - mediated in vitro Cytotoxicity and Apoptosis in Glioblastoma U87MG Spheroids. 2012. Expe. Cell Research – Submitted.**

Podobno smo razkrili mehanizem apoptoze v celicah GBM sprožene s ksantohumolom. Slednji sproža apoptozo v celicah GBM po intrinzični poti p53, ki vključuje aktivacijo kaspaz. Zaradi selektivne občutljivosti normalnih astrocit na ksantohumol, se slednji kaže v vlogi kandidata za adjuvantna zdravljenja. Objavljeno v: **Zajc I, Filipič M, Lah TT. Xanthohumol induces different cytotoxicity and apoptotic pathways in malignant and normal astrocytes. Phytother Res. 2012 Nov;26(11):1709-13.**

Ad IIc. Selektivni inhibitorji CatB in ne CatL inhibirajo migracijo GBM sferoidov. Kot je opisano v prijavi projekta, sta apoptoza in migracija povezana procesa in sicer tako, da se izključujeta: migratorne celice so bolj odporne na apoptozo, oz. se ob indukciji apoptoze migracija gensko izklopi. Raziskovali smo torej vpliv inhibitorjev tudi na migracijo GBM sferoidov. Naši predhodni poskusi so pokazali, da je za invazijo posameznih celic v kolagenski matriks najbolj odgovoren CatB, saj selektivni inhibitorji za CatL in CatS te ne zmanjšajo, kar smo opisali v (*Gole B, Pathol. oncol. res.*, 2009) in (*Colin et al., Acta Neuropathol*, 2009). To smo v nadaljevanju potrdili v

sodelovanju s prof. Rolfom Bjerkvigom (Univerza v Bergnu, Norveška), ko smo slednje uspeli dokazati tudi na U87MG ksenografnem modelu NOD/SCID-eGFP miši. Tako smo tudi *in vivo* potrdili sovpadanje rasti tumorja s povečanjem pretežno CatB (in ne CatL ter manj CatS) izražanja na invazivnem robu tumorja. Tam je bilo znižano izražanje njihovih inhibitorjev stefinov. Zelo pomembno je bilo odkritje da se je mRNA stefina A izkazala za nov prognostični označevalec agresivnega GBM. Objavljeno v: **Gole B et al. The regulation of cysteine cathepsins and cystatins in human gliomas. *Int J Cancer*. 2012, 131(8): 1779-1789.**

Ad IIIa. Študij invazije GBM matičnih celic in CD133/prominin obogatenih sferoidov. GBM matične celice (GSC) CD133+ celice so se izkazale za bolj invazivne od diferenciranih malignih U87 GBM celic, a le v 3D kulturah, kjer sicer prednjačijo v invazivnosti pred vsemi normalne neurosfere z drugačnim načinom razgradnje zunaj celičnega matriksa. V modelu sferoidov smo uspeli dokazati tudi obratno korelacijo med izražanjem CD133+ in izražanjem cisteinskih katepsinov. Objavljeno v: **Ardebili SY. et al. CD133/prominin1 is prognostic for GBM patient's survival, but inversely correlated with cysteine cathepsins' expression in glioblastoma derived spheroids. *Radiol Oncol*. 2011 Jun;45(2):102-15.**

V okviru doktorske naloge Katje Kološa pa je bil izveden test citotoksičnosti temazolamida (TMZ) in 5fluorouracila (5FU) na celice GMC. Preliminarni rezultati kažejo: da so vse **matične celice bolj odporne na apoptozo** z obema kemoterapvetikoma. Da je **vpliv TMZ dosežen in vitro le z veliko večjo dozo** kot se uporablja v kliniki in da imajo dodani sintetski **inhibitorji CatL manjši učinek kot če je encim gensko utišan** (primerjava z A. Torkar, A. Pucer in M. Primon, zgoraj).

Ad IIIb. Prvi smo dokazali, da v GBM izražanje GSC markerja CD133 na mRNA nivoju statistično značilno označuje GBM tumorje, ki so bolj odporni na terapijo in sovpada s krajšim preživetjem bolnikov. Vendar poskusov na GBM sferoidih nismo mogli nadaljevati zaradi uporabe le-teh na mednarodnih projektih (SysTher, GLIOMA): vzorci primarnega tkiva so omejeni in jih ne moremo kontrolirati, saj so odvisni od tekočih operacijskih posegov v UKC na Kliniki za nevrokirurgijo.

Ad IIIc. Namesto tega smo se poglobili v študij vpliva resveratrola in ksantohumola na apoptotski/diferencijski potencial GBM celic. Dokazali smo pozitiven vpliv kronične izpostavitve resveratrolu na povečanje diferenciacije celic GBM, ki bi v praksi lahko pozitivno vplival na potek kemoterapije astrocitomov. Objavljeno v: **Castino R. et al. Resveratrol reduces the invasive growth and promotes the acquisition of a long-lasting differentiated phenotype in human glioblastoma cells. *J Agric Food Chem*. 2011 Apr 27;59(8):4264-72 (A").**

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

V projektu smo načrtovali sledeč **potek aktivnosti**:

(1) Pripravo bioloških vzorcev (normalnih neurosfer, GBM-U87 sferoidov, primarnih sferoidov 10/leto, CD133+ sferoidov) in testiranje viabilnosti, invazije/migracije: **izvedeno v celoti**, razen priprave primarnih sferoidov, ki jih nismo dosegli zaradi objektivnih razlogov (število kliničnih posegov v UKC).

(2) Rezistenca na TMZ in analiza apoptoze v bioloških vzorcih: **izvedeno**. Namesto Temozolomida, ki smo ga sicer preliminarno testirali skupaj s 5FU na CD133+ GMC celicah, smo v tem delu projekta uporabili Trisenox (As₂O₃) in delo **izvedli v celoti**.

(3) Razvoj lovka, ki so zasnovane na aktivnosti katepsina L (ABP lovke): Nove strukture CatL inhibitorjev: **izvedeno v celoti**.

(4) Vpliv inhibitorjev CatL: Click148 in ABP na apoptozo; Določanje vpliva CatL –inhibitorjev ABP na apoptozo GBM v primerjavi z normalnimi neurosferami: **delno izvedeno**. Apoptoza z ABP še ni izvedena zaradi kompleksne optimizacije sinteze potrebnih količin inhibitorja, smo pa uporabili utišanje CatL s siRNA, lentivirusom, Click148 in te študije – **izvedli v celoti**.

(5) Vpliv splošnih inhibitorjev cisteinskih proteaz (E64d, JPMOEt, GB111and/or Gb117) in inhibitorja CatB (Ca075) na apoptozo povzročeno s temozolomidom; določanje vpliva inhibitorjev cisteinskih katepsinov na apoptozo povzročeno s kemoterapijo v modelu GBM v primerjavi z normalnimi neurosferami: **delno izvedeno, se končuje**

(6) Vplivi kombinacij inhibitorjev; določanje diferencialnega vpliva inhibitorjev v modelu neurosfer na apoptozo inducirano s temozolomidom: **delno izvedeno**. Namesto TMZ smo se v tem delu osredotočili na delovanje dveh alternativnih kandidatnih spojin za adjuvantno terapijo – resveratrol in ksantohumol – **izvedeno v celoti**.

Določanje diferencialnega vpliva katepsinskih inhibitorjev na apoptozo inducirano s temozolomidom v obogatenih primarnih GBM in sferoidih z GBM matičnimi celicami: **bo izvedeno v primeru večjega števila primarih GBM**

(7) Združevanje podatkov in objava:

Upešna **objava osmih (8) člankov** v mednarodno priznanih revijah s faktorjem vpliva, medtem ko na objavo **2 že poslanih člankov** še čakamo.

Projekt je podpiral bilateralni projekt ARRS-CEA (2010-2012), V letih 2011/2012 pa tudi Slo-Ita Interreg projekt GLIOMA.

V projekt je bilo delno vpetih **kar 5 doktorskih študentov** (Ana Torkar, Monika Primon,, Anja Pucer, Saša Kenig, Katja Kološa), od tega je **dvoje doktorskih del že zaključenih**.

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

Med izvajanjem projekta **ni prihajalo do bistvenih sprememb**, smo pa nekatere dele projekta zaradi zanimivih novosti bolj izčrpno raziskali, kot je bilo predvideno (npr. razvoj in sinteza novega selektivnega bifenonskega inhibitorja katepsina L).

V projektu smo tudi bolj izčrpno kot je bilo predvideno raziskal mehanizem arzenita in prvi poročali o njegovi specifični inhibiciji katepsina B.

Prav tako smo nenačrtovano ugotovili prognostično vrednost mRNA stefina A v napredovanem GBM.

Malo manj kot je bilo načrtovano smo raziskali razmerja med apoptozo in migracijo.

Prav tako poskusov na GBM sferoidih in matičnih celicah GBM - GSC nismo izvedli v celoti zaradi zmanjšanja števila primarnih glioblastomskih vzorcev, ki so nam bili na voljo, saj smo jih bili primorani uporabiti v večjem številu za izvedbo klinične študije na mednarodnih projektih "SysTher" in "GLIOMA". Število tumorskih vzorcev je bilo omejeno in odvisno od operativnih posegov pri GBM pacientih

Spremenili smo izbiro citostatikov. Namesto napovedanega temazolamida (ki se je v preliminarnih poskusih izkazal za preveč dragega - uporabiti bi namreč morali večje količine od planiranih), smo se osredotočili na (v terapiji raka in GBM že uporabljan) Trisenox (arzenit). Dodali pa smo študijo vpliva resveratrola na avtofagijo /apoptozo/diferenciacijo celic GBM.

V zvezi s finančnimi sredstvi so bili tudi poskusi določevanja novih markerjev odpornosti GBM matičnih celic (GSC) s proteomiko zaradi finančne in časovne zahtevnosti prenešeni v nov ARRS projekt J1-02474.

7.Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

		Znanstveni dosežek	
1.	COBISS ID	2681935	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Nova foto-afinitetna lovka za selektivno zaznavo aktivne oblike katepsina L
		ANG	A novel photoaffinity-based probe for selective detection of cathepsin L active form
	Opis	SLO	Zaznavanje aktivnih oblik proteaz z uporabo lovk za zaznavo njihove aktivnosti v kompleksnih proteomih je predmet intenzivnih raziskav. Zaznavanje katepsinov je doslej slonelo na uporabi lovk z vgrajeno elektrofilno strukturo za kovalentno modifikacijo cisteina v aktivnem mestu. Kot prvi objavljamo pripravo lovke za ciljno zaznavo aktivnih katepsinov z vključeno fotoaktivno benzofenonsko skupino za kovalentno vezavo. S testiranjem smo dokazali selektivno in specifično vezavo lovke na katepsin L in potrdili obetavnost fotoafinitetnega označevanja za razvoj selektivnih proteaznih lovk.
		ANG	Complexity of proteomes has become intensively investigated. The detection of cathepsins, has relied on using the probes that incorporate reactive electrophilic moieties to modify a cysteine in the active site covalently. We first report on the activity-based probe targeting cathepsins and incorporating a photo inducible benzophenone group for covalent labelling. When tested, this probe selectively and specifically detected cathepsin L making the photo affinity labelling promising for developing selective protease probes.
	Objavljeno v	Wiley-VCH; ChemBioChem; 2012; Vol. 13, issue 17; str. 2616-2621; Impact Factor: 3.944; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.525; A': 1; WoS: CQ, DX; Avtorji / Authors: Torkar Ana, Bregant S., Devel Laurent, Novinec Marko, Lenarčič Brigita, Lah Turnšek Tamara, Dive Vincent	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
2.	COBISS ID	3339642	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Inhibicija katepsina L zniža apoptotski prag glioblastomskih celic z zvišanjem p53 in transkripcijo kaspaz 3 in 7
		ANG	Inhibition of cathepsin L lowers the apoptotic threshold of glioblastoma cells by up-regulating p53 and transcription of caspases 3 and 7
	Opis	SLO	Glioblastoma ostaja smrtonosna bolezen, kljub znanstvenemu napredku, zato se zanj nujno potrebujejo novi načini zdravljenja. Inhibicija Katepsina L utegne imeti terapevtsko uporabnost, z razkritjem mehanizma anti apoptotskega delovanja katepsina L. Mi smo pokazali, da je v U87 GBM celicah, katepsin L prisoten v jedru, kjer uravnava delovanje kaspaz 3 in 7. Pri tem je pomemben protein p53, ki je pogosto mutiran v GBM. Pomembno odkritje naše raziskave je, da je uporaba inhibicije katepsina L v adjuvantnem zdravljenju GBM možna le pri subpopulaciji bolnikov, ki nimajo spremenjenega p53 proteina.
		ANG	Despite progress, glioblastoma remains a terminal disease and new therapeutic approaches are urgently needed. Cathepsin L inhibition appeared as a new therapeutic modality, where the mechanism of cathepsinL antiapoptotic activity needs to be resolved. We showed that in U87 GBM cells cathepsin L is present in the nucleus, where regulates the p53 dependent transcription of caspases 3/7. Since p53 is often mutated in GBM, these findings need to be considered at using cathepsin L inhibition for GBM therapy, as such adjuvant therapy may work efficiently only in p53 wt subpopulation of GBM patients.
		Rapid Science; Apoptosis; 2011; Vol. 16, no. 7; str. 671-682; Impact	

	Objavljeno v	Factor: 4.788;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.739; A': 1; WoS: CQ, DR; Avtorji / Authors: Kenig Saša, Frangež Robert, Pucer Anja, Lah Turnšek Tamara	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID	2378063	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Resveratrol znižuje invazivno rast in prispeva k dolgotrajni de-diferenciaciji človeških glioblastomskih celic
		ANG	Resveratrol reduces the invasive growth and promotes the acquisition of a long-lasting differentiated phenotype in human glioblastoma cells
	Opis	SLO	Resveratrol-fitoaleksin je sestavina živil, ki znano zavira celični cikel, apoptozo in senescenco. Z U87MG celicami in primarnimi glioblastomskimi celicami smo dokazali, da kronična izpostavljenost rezveratrolu ne vpliva le na ustavitev celičnega cikla temveč omeji gibljivost in invazijo celic in povzroča morfološke spremembe, ki spominjajo na diferenciacijo celic v zreli glioma fenotip. Celice, ki prežive kronično izpostavljenost resveratrolu povečajo ireverzibilno izražanje diferenciacijskih markejev glijalnih in neuralnih celic. To govori v prid uporabi resveratrola pri GBM kemoterapiji.
		ANG	Resveratrol-a phytoalexin elicits cell cycle arrest, apoptosis and senescence. With U87MG cells and primary glioblastoma cells we demonstrate, that its chronical administration elicits not only cell growth arrest, but limits cell migration and invasion and promoted longlasting morphological changes reminiscent of a mature glial phenotype. In the cells that survived chronic administration of resveratrol, the expression of differentiation markers of mature glial cells and of neurons, was reversibly increased. These findings support the introduction of resveratrol in GBM chemotherapy.
	Objavljeno v	American Chemical Society, Books and Journals Division; Journal of agricultural and food chemistry; 2011; Vol. 59, no. 8; str. 4264-4272; Impact Factor: 2.823;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 0.782; A': 1; WoS: AH, DW, JY; Avtorji / Authors: Castino Roberta, Pucer Anja, Veneroni Roberta, Morani Federica, Peracchio Claudia, Lah Turnšek Tamara, Isidoro Ciro	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
4.	COBISS ID	2501199	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Regulacija cisteinskih katepsinov in cistatinov v človeških gliomih
		ANG	The regulation of cysteine cathepsins and cystatins in human gliomas.
	Opis	SLO	Cisteinski katepsini sodelujejo pri infiltrativni rasti gliomov. Njihova aktivnost je dokazano povečana v invazivnih celicah GBM, najbrž tudi zaradi utišanja njihovih endogenih inhibitorjev cistatinov. Za potrditev te hipoteze in vivo smo izvedli poskuse na U87MG ksenograftnem modelu NOD/SCID-eGFP miši. In vivo smo potrdili sovpadanje rasti GBM s povečanjem aktivnosti katepsinov in znižanim izražanjem njihovih inhibitorjev stefinov. Z analizo primarnih humanih biopsij smo prvi razkrili povišan nivo izražanja stefina A na mRNA nivoju kot prognostični dejavnik za preživetje GBM pacientov.
		ANG	Cysteine cathepsins play an important role in infiltrative growth of gliomas. Their activity is elevated in invasive GBM cells, in part due to attenuation of their endogenous inhibitors, the cystatins. To investigate this hypothesis in vivo, we established U87-MG xenografts in NOD/SCID-eGFP mice. We confirmed that tumour growth correlated with an elevated enzymatic activity of cathepsins and reversely with the inhibitors stefins. Analysing primary human biopsies, we were first to reveal that significantly elevated StefA mRNA level is highly significant for GBM patients' survival.
		GOLE, Boris, HUSZTHY, Peter C., POPOVIĆ, Mara, JERUC, Jera, ARDEBILI,	

	Objavljeno v	Seyed Yousef, BJERKVIG, Rolf, LAH TURNŠEK, Tamara. The regulation of cysteine cathepsins and cystatins in human gliomas. Int J Cancer. 2012, vol. 131, issue 8, str. 1779-1789. IF=5,44	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
5.	COBISS ID	28580825	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Cd133CD133/prominin1 je prognostičen za preživetje bolnikov z glioblastomi vendar obratno korelira z izražanjem cisteinskih katepsinov
		ANG	CD133/prominin1 is prognostic for GBM patient's survival, but inversely correlated with cysteine cathepsin' expression in GBM derived spheroids
	Opis	SLO	CD133 je označevalec populacije glioblastomskih (GBM) matičnih celic in normalnih nevrlnih matičnih celic (nNSC). Želeli smo odkriti ali sta migracijski potencial in diferenciacija matičnih celic povezana z izražanjem CD133 in s katepsinskimi proteazami (Cat). Raziskava potrjuje, da je CD133 prognostičen kazalec za preživetje GBM bolnikov. Dokazali smo, da normalne nevrlnne matične celice in dediferencirane maligne GBM celice bolje in na drugačen način invadirajo v kolagen kakor CD133+ GBM matične celice. To spoznanje lahko vpliva na načrtovanje novih zdravil vključujoč proteazne inhibitorje.
		ANG	CD133 is a marker of glioblastoma (GBM) and normal neural stem cells (nNSC). We aimed to reveal whether the migratory potential and differentiation of stem cells is associated with CD133 expression and cathepsin proteases (Cats). The study confirms CD133 prognostic value for the survival of GBM patients. We demonstrated that nNSCs as well as differentiated malignant GBM cells have higher invasion potential and invade the collagen matrix in a mode different from that of CD133+ GBM stem cells. Results could be utilized for designing new therapeutics based on protease inhibitors.
	Objavljeno v	Slovenian Medical Society - Section of Radiology;Croatian Medical Association - Croatian Society of Radiology; Radiology and oncology; 2011; Vol. 45, no. 2; str. 102-115; Impact Factor: 0.912;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.889; WoS: DM; Avtorji / Authors: Ardebili Seyed Yousef, Zajc Irena, Gole Boris, Campos Benito, Herold-Mende Christel, Drmota Sara, Lah Turnšek Tamara	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	

8.Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁷

	Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID	26056921	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Organizacija mednarodnega simpozija: Forum za raziskave možganskih tumorjev.
		ANG	Organisation of international symposium: Glioma Invasion Forum.
	Opis	SLO	"Forum za raziskave možganskih tumorjev" se je udeležilo okoli 50 vrhunskih raziskovalcev, zdravnikov in predstavnikov biotehnoških in farmacevtskih firm. Že vrsto let se redno srečujemo vodje raziskovalnih skupin iz celega sveta, ki se že dalj časa ukvarjamo s to problematiko in s tem dvigujemo kvaliteto raziskav teh vrst tumorjev in njihovih kliničnih aplikacij. Srečanje je podprla tudi vrsta sponzorjev; pokrovitelj je bila Farmacevtska firma La Roche. S tem izkazujemo močno družbeno vpetost za zdravje prebivalstva in povezovanja s poslovnim sektorjem.
			»Glioma Invasion Forum« was attended by 50 prestigious scientists, physicians and representatives of pharmaceutical industry. Over a decade

		the leaders of the research groups from all around the world are having this kind of meetings, which raised the quality of our research and its clinical applications. The meeting was supported by a number of sponsors, the main being the Pharmaceutical Company La Roche. By this, we have proved the social importance of our research for the health of the population, as well as strong linkage with the industrial sector.
Šifra		B.01 Organizator znanstvenega srečanja
Objavljeno v		LAH TURNŠEK, Tamara. Towards novel prognostic markers for recurrent meningioma. V: Glioma Invasion Forum 2009, September 10-12, Piran, Slovenia. Programme & abstracts. [Ljubljana: National institute of biology, 2009], str. 46. [COBISS.SI-ID 26412249] Zbornik strokovnih ali nerecenziranih znanstvenih prispevkov na konferenci
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	2547023 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Matične celice v glioma tumorjih ANG Stem cells in glioma tumors
	Opis	SLO V sklopu odobrenega Slo-Ita Interreg projekta GLIOMA (v 2011) z Italjanskimi partnerji (prof. Beltrami, dr. Casselli) je bila nosilka projekta T.L.T vabljena predavateljica na odmevnem srečanju na Univerzi v Udinah. Doktorskim študentom medicine in zdravnikom je predavala na temo različnih vrst matičnih celic, ki v tumorski masi medsebojno vplivajo na njegovo rast ter o pomenu proteolize v teh procesih. ANG Due to granted SLO-Ita Interreg project GLIOMA (in 2011) with Italian researchers (prof. Beltrami, dr. Casselli), the PI of this project T.L.T. was invited to the renown meeting to the University of Udine to give an invited lecture for doctoral medical students and clinicians on the subject of various types of interacting (stem) cells within the tumour mass affecting tumour growth, the process where the role of proteolysis is of out most importance.
	Šifra	B.05 Gostujoči profesor na inštitutu/univerzi
	Objavljeno v	2012; Avtorji / Authors: Lah Turnšek Tamara
	Tipologija	3.14 Predavanje na tuji univerzi
3.	COBISS ID	2615887 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Mezenhimske matične celice znižujejo podvojevanje in invazijo glioblastomskih celic preko kemokinskih mediatorjev imunskega odziva ANG Mesenchymal stem cells lower proliferation and invasion of glioblastoma cells, exploiting the immune response mediating chemokines
	Opis	SLO Nosilka projekta T.L.T je bila povabljena na 16-ti sestanek brazilskega društva za celično biologijo, kjer je imela uvodni govor (spremno besedo) in vabljeno predavanje na temo medsebojne komunikacije MSC in GBM celic v in vitro ko-kulturah. ANG The PI of this project T.L.T. was invited to the 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology to give an introductory speech and an invited lecture on the subject of mutual MSC and GBM cross-talk in the in vitro cocultures.
	Šifra	B.04 Vabljeno predavanje
	Objavljeno v	s. n.; 10th International Congress on Cell Biology [and] 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, July 25th-28th, 2012, Rio de Janeiro, Brazil; 2012; Str. 62; Avtorji / Authors: Lah Turnšek Tamara, Motaln Helena, Gruden Kristina, Hren Matjaž, Primon Monika, Schichor Christian
	Tipologija	1.10 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (vabljeno predavanje)

4.	COBISS ID	32649472	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO	Članstvo v uredniškem odboru Radiology and Oncology
		ANG	Editorial board member of the Radiology and Oncology
	Opis	SLO	Vodja projekta je članica uredniškega odbora revije Radiology and Oncology, ki objavlja izvirne in pregledne znanstvene ter strokovne članke iz diagnostične in intervencijske radiologije, nuklearne medicine, ultrazvočne diagnostike, radioterapije, klinične in eksperimentalne onkologije, radiobiologije, radiofizike ter zaščite pred sevanjem. Revijo od leta 2009 dalje indeksira JCR/Science Edition. Cilj je revijo uvrstiti med SCI Indeksirane reije z IF nad 0.9. Revija objavlja prispevke mednarodnih konferenc CETO, ki jih organizira Društvo za radiologijo in onkologijo in izdaja Knjige povzetkov.
		ANG	The PI is a member of the Editorial board of Radiology and Oncology Journal. This publishes original and review articles in the fields of diagnostic and intervention radiology, nuclear medicine, ultrasound diagnostics, radiotherapy, clinical and experimental oncology, radiobiology, radiophysics and irradiation protection. From 2009 onwards the journal is indexed in JCR/Science Edition. The aim is to increase the Journal SCI Index above IF 0.9. The Journal publishes the contributions from the international meetings-CETO, that are organised by the Society, including the Books of abstracts.
	Šifra	C.05	Uredništvo nacionalne revije
	Objavljeno v	Radiology and oncology. Lah Turnšek, Tamara (član uredniškega odbora 2007)	
	Tipologija	2.31	Zbornik recenziranih znanstvenih prispevkov na mednarodni ali tuji konferenci

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

Dva relevantna projekta, ki sta bistveno prispevala k temi projekta J1-0295 sta potekala med CEA(Dept d'Ingenierie et D'Etides des Proteines) in ARRS na temo sinteze inhibitorjev katepsina L BI-FR/CEA/08-10-005 in : FR/ CEA-20101-2012 (nosilka T.T. Lah).

Tamara Lah je koordinatorica 3 letnega Interreg projekta GLIOMA: Določanje novih biomarkerjev možganskih tumorjev – gliomov za diagnozo in kot nove tarče zdravljenja. Projekt poteka v okviru programa čezmejnega sodelovanja Slovenija – Italija (2007-2013). Celotna vrednost projekta znaša 1.5 MIO EUR.

Predhodno (2007-2012) je bila skupina aktivna in nosilka T.T. Lah vodja koordinacije za NIB, Virtualnega instituta - 5 letnega projekta INREMOS SysTher (ERA-NET projekt): Systems Biology Tools Development for Cell Therapy and Drug Development - Razvoj orodij sistemske biologije za raziskave celičnih terapij in razvoj zdravil. Nemško slovenski bilateralni projekt je bil zaključen v februarju 2012 z mednarodnim simpozijem in javno predstavitvijo v Hotelu MONS.

Mentorstva vodje projekta je bistveno prispevalo k njegovi izvedbi in omogočalo boljše objave. Zaključena diplomska dela in tri doktorska dela med leti 2009-2012 pričajo o uspešnem pedagoškem delu skupine: PUCER, Anja, [3298068]; KENIG, Saša [3339028] in GOLE, Boris. [2118735].

V teku so še trije doktorati, ki bodo zaključeni v letu 2013 , zaključila pa so se tudi 4 diplomska dela - glej COBBIS: [35216645], [35373573], [34179333] in [33415941].

Nosilka (T.L.T.) je bila vabljen gostujoča profesorica SPINOZA na Academic Medical Center, Dept. Cell Biology and Histology, University of Amsterdam, v juniju 2011 [2548047]. Podoktorskim študentom medicine in zdravnikom ter drugi javnosti je predavala o matičnih celicah in raku ter o vlogi proteoliznih sistemov.

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

10.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

Številne mednarodno priznane objave, vključno z našim predhodnim delom kažejo na to, da bi bilo selektivno spremljanje aktivnosti posameznih katepsinov, kot je katepsin B (CatB) z neinvazivnimi in vivo metodami, lahko uporabno v smislu napovednega dejavnika za izid zdravljenja možganskega tumorja. Zato smo tekom tega projekta razvili orodja - fluorescenčne lovke za zaznavo aktivnih proteaz, ki so predvsem uporabne za označevanje in inhibicijo cisteinskih katepsinov. Lovke, ki smo jih uspeli razviti izražajo mnogo večjo selektivnost za CatB in CatL od obstoječih, znanih in objavljenih lovk. To je ključen uspeh tega projekta, ki je omogočil študije apoptoze GBM celic, ki ga povzročajo citostatiki.

Ob tem smo dokazali, da bi takšno ciljno zniževanje aktivnosti CatL z inhibitorji, zaradi sinergističnega delovanja znižanja CatL in določenih citotoksičnih učinkovin, še posebej prišlo v poštev pri kombinirani terapiji možganskih tumorjev s kemoterapevtiki v našem primeru arzenita /Trisenoxa/. Ker nam je uspelo dokazati povečano apoptozo glioblastomskih celic po tretiranju z arenom v kombinaciji CatL lovkami, smemo ambiciozno predvidevati, da bi se ciljno zniževanje aktivnosti CatL v človeškem možganskem tumorju s selektivnimi lovkami izrazilo v večji selektivni dovzetnosti tumorskih celic na kemoterapijo. Slednje bi omogočilo znižanje uporabljene doze toksičnih kemoterapevtskih učinkovin, zmanjšalo pojav negativnih stranskih učinkov citotoksičnih učinkovin in povečalo kvaliteto življenja rakavih bolnikov.

Poleg tega te lovke lahko naprej razvijemo tudi v smeri in vivo diagnostike in določevanja lokacije GBM med operativnimi posegi vezane na primerne tehnike vizualizacije. Tako razvite selektivne lovke za aktiven CatL bi predstavljale torej tudi izredno izpopolnjeno orodje za zaznavo lokalizacije aktivnega CatL na celični in subcelični ravni. Ker povišan katepsin L značilno označuje tumorsko tkivo, bi selektivne lovke lahko bile v pomoč pri lokalizaciji tumorja med samim operativnim posegom, s čemer bi se zagotovo izboljšala učinkovitost izreza primarnega tumorja pri bolnikih z možganskim tumorjem. Naši rezultati potrjujejo, da je možno z uporabo selektivnih lovk slediti celo malignim tumorskim celicam, ki prodirajo v normalno možganovino. Slednje bi lahko nevrokirurgom dodatno pomagalo pri jasni določitvi meje invazivnega tumorja, omogočilo celovitejši kirurški pristop in bolj osredotočeno lokalno terapijo (npr. z X žarki, »gama nož«). Naše raziskave že v temeljih slonijo na modelu možganskega tumorja - glioblastoma, ki je eden neozdravljivih, najbolj agresivnih tipov raka, katerega kirurška odstranitev predstavlja od vseh tumorjev največjo nevarnost za nepovratne poškodbe okoliškega tkiva.

Z raziskavo uporabe selektivnih in specifičnih lovk na glioblastomskih celicah in tumorskih vzorcih smo dokazali tudi prisotnost CatL tudi v GBM CD133+ matičnih celicah, ki pravzaprav predstavljajo novo tarčo uporabno za zdravljenje, saj naj bi predvsem odstranitev tumorskih matičnih celic učinkoviteje preprečila ponovitev tumorskega obolenja.

ANG

With respect to a vast body of literature and our previous work, we believe that the monitoring of selective activities of cathepsins (Cats) such as CatB, using non-invasive in vivo methods would represent a useful prognostic factor for brain tumours' therapy. Therefore, we developed the tools – activity based fluorescent probes, detecting active cysteine cathepsins to label and inhibit cathepsins selectively. The probes, which we have developed, display highly improved selectivity for CatB and CatL as do the existing available probes published in the past. This is the key success of this project, enabling the studies of GBM apoptosis, induced by cytostatics.

Additionally, we have presented a proof of principle that lowering CatL activity with these inhibitors could, because of their synergistic activity with known cytotoxic drugs i.e. Arsenite, be a useful strategy when combined with the chemotherapy. As we succeeded in proving the enhanced apoptotic activity in the tumour cells arising from the combined treatment consisting of CatL probes and chemotherapeutics, we feel confident to ambitiously predict, that targeting CatL by these highly selective probes in tumours during chemotherapy, would indeed enhance

the selectivity of tumour cells' response to therapy. This would allow for a decrease of the applicable therapeutic doses of toxic drugs, resulting in elimination of the toxic side effects and thereby increased the quality of brain tumour patients' life.

Besides the above the CatL markers also represent good tools for localising active forms of CatL at cellular and sub-cellular level. Since increased expression of CatL was observed only in tumour cells, the CatL selective probes would be of a great help to clinicians during surgery for tumour site localisations and successful complete brain tumour resection. Our results also indicate that with the use of those selective cathepsins' probes, one could successfully follow malignant tumour cells that are invading into normal brain parenchyma. By utilizing labelling with CatL selective probes at the resection site, the neurosurgeons would be able define the exact borders of the invasive brain tumour and thereby be able to proceed with much more focused local therapy (for example with X-rays and »gamma knife«). Our results are based on a model of brain tumours - glioblastoma, which is one of the incurable and most aggressive tumours, where surgical resection of it poses the highest danger for damaging the surrounding tissue crucial for human vital functions.

By studying the usefulness and applicability of highly selective cathepsins' probes for detection and cell death induction in GBM cells and primary tumour tissue, we have demonstrated the effect of CatL on a GBM CD133+ stem-like cells, which in fact represent a new target for GBM therapy, since GBM stem cells removal is believed to efficiently prevent the relapse of the disease.

10.2.Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Incidenca raka v Sloveniji hitro narašča, z upoštevanjem pojavnosti možganskih tumorjev, pa narašča tudi pri mlajši generaciji. Glioblastomski tumorji - možganski rak se tako vedno pogosteje pojavljajo tudi v Sloveniji. Kljub številnim raziskavam doma in po svetu pa ravno preživetje pacientov z diagnosticirano to obliko raka ostaja izjemno kratko (le 13 mesecev). Pri odkrivanju rakavih bolezni je na splošno ključnega pomena identifikacija specifičnih označevalcev - tumorskih markerjev pri pacientu. Specifični tumorski markerji možganskega raka, bi tako lahko omogočili zgodnje odkrivanje, diagnozo in nadzor nad napredovanjem bolezni in s tem izboljšali preživetje pacientov.

Med takšne označevalce potencialno spada tudi CatL, ki ga v povišani meri izražajo tumorske celice. Uspešna detekcija aktivnega CatL bi tako omogočila sledljivost malignih tumorskih celic, ki prodirajo v normalno možganovino. Slednje bi nevrokirurgom pomagalo določiti meje invazivnega tumorja in s tem omogočilo celovitejši in bolj popoln kirurški pristop. Poleg tega pa spremljanje selektivne aktivnosti kathepsinov in vivo z ne-invazivnimi metodami lahko predstavlja tudi uporaben napovedni faktor odziva tumorja na zdravljenje, ki bi se ga ne nazadnje lahko po izvedenih kliničnih študijah poslužili tudi v Sloveniji.

Zato predvidevamo, da tako razvite sonde za CatL ne bodo le v interesu onkoloških nevrokirurgov, temveč tudi slovenske farmacevtske industrije. Uporaba novih kathepsinskih označevalcev tako ne bi prispevala zgolj k izboljšanju preživetja rakavih bolnikov v Sloveniji, temveč tudi k izboljšanju zdravljenja bolnikov z drugimi obolenji. Naši rezultati so namreč širše uporabni, saj imata oba kathepsina B in L poleg vloge v tumorjih, tudi pomembno vlogo v patofiziologiji drugih bolezni, kot so vnetna obolenja (npr. revmatoidni artritis in peridontalna bolezen), ter dokazano sodelujeta tudi pri kostnem preoblikovanju in regulaciji celičnega cikla v postnatalnem razvoju centralnega živčevja.

Zelo pomembno je, da je prav ta projekt idejno in raziskovalno podpiral kar 5 doktorskih del, dva zaključena v letu 2010 in tri, ki so v fazi zaključevanja. V enem izmed slednjih je doktorandka odlično sodelovala z raziskovalno skupino CEA (Paris) tako, da smo bili uspešni celo pri ponovnem kandidiranju za podaljšanje projekta leta 2010 in pridobitvi financiranja za dodatni dve leti. Upajmo, da bodo tudi mladi doktorji znanosti izobraženi tekom tega projekta nadaljevali raziskave doma in prispevali k znanstveni odličnosti Slovenije v Evropskem prostoru.

ANG

The incidence of cancer is increasing in Slovenia, and frightfully the incidence of brain tumours is increasing also in younger generation. Glioblastomas are therefore becoming more often diagnosed also within Slovene population and despite advanced research in Slovenia and worldwide, the survival of glioblastoma patients remains rather poor (only 13 months). The key step in cancer diagnosis could be achieved by the identification of specific tumour markers, which would enable early detection, correct diagnosis and control over the spread of a disease, thereby increasing cancer patients' survival.

The selective CatL probes, which we synthesized would enable monitoring of malignant tumour cells, which invade into the normal parenchyma and this way they could help the neurosurgeons to more clearly define the borders of the invasive tumour and optimize their surgical approach. Besides selective monitoring of the cathepsins' activities in vivo by a non-invasive method, the selective CatL probes would prove useful also at evaluating of the predictive tumour response to therapy.

Therefore we predict that the probes developed for CatL would not only be of interest to clinicians working in the field of oncologic surgery, but would also be of interest to the Slovene pharmaceutical industry. Translating novel selective cathepsins probes to clinic, would not only enhance the treatment of cancer patients, but may also enhance the treatment of other types of diseases in Slovenia. The results have namely broader application, as both cathepsins B and L – besides having a role in tumours, also play an important role in processes, such as inflammation (i.e. rheumatoid arthritis and periodontal disease), as well as in bone remodelling and regulation of the cells cycle in postnatal development of the central nervous system.

Last, but no least important remains the fact that this project was providing the ideas and supporting research of five doctoral students, two of which completed with their studies in 2010 and the remaining three being just next to a completion. One of the remaining three doctoral students was supporting and excellent collaboration with the group at CEA Paris, to the point that we succeeded at obtaining continuation of this project for another two years. We hope that at least one of the young scientists trained during this project will continue to do the research in Slovenia and contribute to the scientific excellence of Slovenia.

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

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	

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

F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

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

F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

Komentar

--

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

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<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	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

	izdelkov/storitev na trgu					
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.06.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete					
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj					
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva					
G.09.	Drugo:					
		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

Komentar

--

13. Pomen raziskovanja za sofinancerje¹²

	Sofinancer			
1.	Naziv			
	Naslov			
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR	
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%	
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja	Šifra		
		1.		
		2.		
		3.		
		4.		
		5.		
	Komentar			
	Ocena			

14. Izjemni dosežek v letu 2012¹³

14.1. Izjemni znanstveni dosežek

Sinteza nove fotoafinitetne lovke za selektivno detekcijo aktivnega CatL

Objava: TORKAR, Ana, BREGANT, S., DEVEL, Laurent, NOVINEC, Marko, LENARČIČ, Brigita, LAH TURNŠEK, Tamara, DIVE, Vincent. A novel photoaffinity-based probe for selective detection of cathepsin L active form. ChemBioChem. 2012, 13 (17): 2616-2621. IF=3,94

Zaznavanje aktivnih oblik proteaz je oteženo v kompleksnih (tkivnih) vzorcih. Doslej je zaznavanje proteaz - katepsinov slonelo na uporabi lovke, z vgrajeno elektrofilno skupino za modifikacijo cisteina v aktivnem mestu. Skupina prof. T. T. Lah je v sodelovanju s CEA inštitutom (Francija) prva sintetizirala in objavila pripravo foto afinitetne lovke z benzofenonsko skupino za selektivno zaznavo aktivne oblike CatL.

S testiranjem na rekombinantnih proteinih in celicah U87-MG so dokazati selektivnost lovke na CatL. Nova lovka za zaznavo in inaktivacijo aktivnih oblik CatL ne prehaja v celice, zato ima prognostično in diagnostično vrednost za uporabo v kliniki.

14.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Pomembne raziskave in spoznanja tega projekta je potrebno tudi predstavljati javnosti, Za ozaveščanje možnih novih pristopih zdravljenja možganskih tumorjev, med njimi najbolj agresivnega glioma, se je nosilka projekta T.L.T. odzvala z intervjuji:

- Slovenski raziskovalci razvijajo nove pristope k zdravljenju raka: skupaj z nemškimi raziskovalci sodelujejo pri projektu razvoja celične terapije pri možganskih tumorjih. Dnevnik, 2012, [COBISS.SI-ID 29805529]
- V boju z možganskimi tumorji. Obala.net, 2012, [COBISS.SI-ID 29937113]
- V Piranu o učinkovitejšem diagnosticiranju možganskih tumorjev. Primorska.info, 2012, [COBISS.SI-ID 29805785]

In radijskimi srečanji:

- Marihuana za zdravstvene namene : Radio Europa 05, Oddaja Jutranji gost, 2012 [COBISS.SI-ID 2700879]; [COBISS.SI-ID 29877977]; [COBISS.SI-ID 29884121]

- LAH TURNŠEK, Tamara. Proti tumorjem s projektom Glioma : oddaja Pogled v znanost, Radio Slovenija, 3. program, 2012. [COBISS.SI-ID 2563151]

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Nacionalni inštitut za biologijo

Tamara Lah Turnšek

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana	14.3.2013
-----------	-----------

Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2013/164

¹ Opredelite raziskovalno področje po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science). Prevajalna tabela med raziskovalnimi področji po klasifikaciji ARRS ter po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science) s kategorijami WOS (Web of Science) kot podpodročji je dostopna na spletni strani agencije (<http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/preslik-vpp-fos-wos.asp>). [Nazaj](#)

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

³ Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

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

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

⁶ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

⁷ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

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

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

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru,

da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

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

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

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

¹² Rubrike izpolnite / prepisite skladno z obrazcem "izjava sofinancerja" <http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>, ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

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

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2013 v1.00

1B-5D-99-C3-E3-2B-9C-8D-26-42-51-09-6B-FD-03-F4-CE-00-38-FD

1 NARAVOSLOVJE

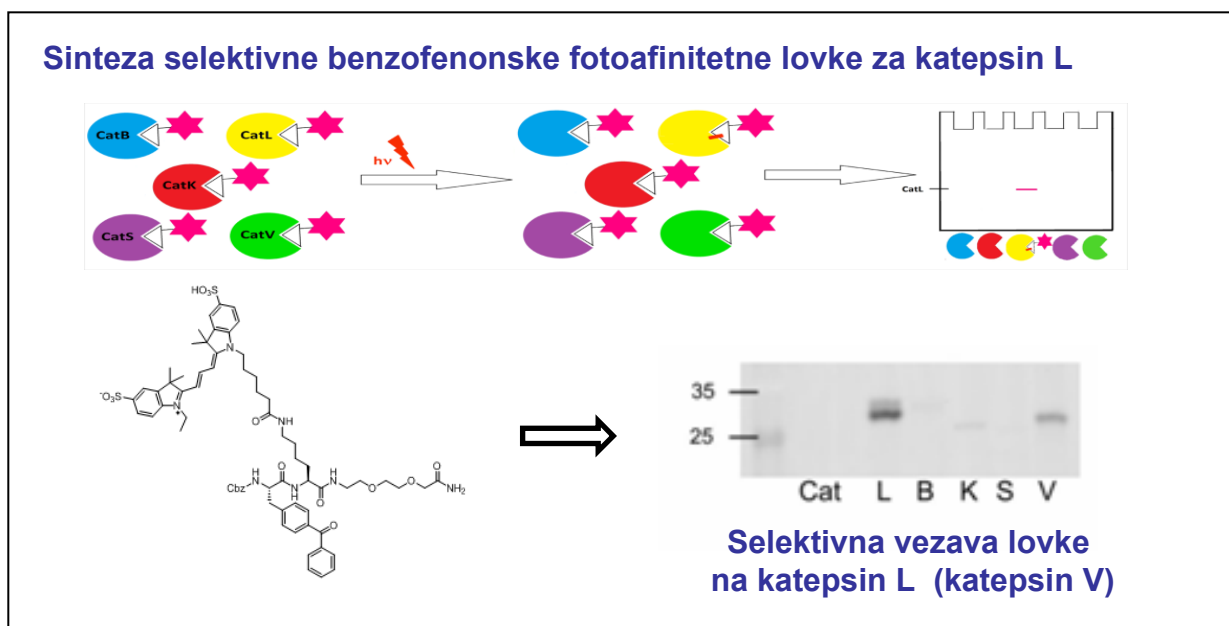
Področje: 1.03 Biologija

Dosežek 1: Sinteza nove fotoafinitetne lovke za detekcijo aktivnega katepsina L

Vir: *TORKAR, Ana, BREGANT, S., DEVEL, Laurent, NOVINEC, Marko, LENARČIČ, Brigita, LAH TURNŠEK, Tamara, DIVE, Vincent.*

A novel photoaffinity-based probe for selective detection of cathepsin L active form.

ChemBioChem., 2012, vol. 13, 17, 2616-2621. IF = 3,94 (A')



Zaznavanje aktivnih oblik proteaz predstavlja velik problem v kompleksnih (tkivnih) vzorcih. Doslej je zaznavanje proteaz - katepsinov slonelo predvsem na uporabi lovke, z vgrajeno elektrofilno skupino za kovalentno modifikacijo cisteina v aktivnem mestu. Skupina prof. T. T. Lah je v sodelovanju s CEA inštitutom (Francija) prva uspela sintetizirati in objaviti pripravo lovke za selektivno zaznavo aktivne oblike katepsina L z vključeno benzofenonsko skupino, ki se po obsevanju kovalentno veže na metioninski ostanek v aktivnem mestu.

S testiranjem na rekombinantih proteinih in ekstraktih celic U87-MG so uspeli dokazati selektivno vezavo lovke na katepsin L in v manjši meri na katepsin V. Lokalizacija katepsina V je za razliko od katepsina L, ki je prisoten v vseh celicah, omejena le na timus, testise in kožni epitelij.

Nedavno odkrita lovka za zaznavo in inaktivacijo aktivnih oblik katepsina L ne prehaja v celice, zato ima potencialno pomembno prognozično in diagnostično vrednost za uporabo v klinični praksi.