



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J3-3632
Naslov projekta	Molekularne lastnosti fuzijske pore
Vodja projekta	3702 Robert Zorec
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	7560
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	05.2010 - 04.2013
Nosilna raziskovalna organizacija	1683 CELICA, biomedicinski center, d.o.o.
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	3 MEDICINA 3.03 Nevrobiologija
Družbeno-ekonomski cilj	13.03 Medicinske vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	3 Medicinske vede 3.05 Druge medicinske vede

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

2. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Na področju nevrobiologije je ključni problem, ki ga je treba rešiti, razumevanje mehanizma signalne transdukcije v kemični sinapsi in mehanizma sproščanja hormonov iz neuroendokrinih celic. Pri obeh procesih igrajo pomembno vlogo sekretorni mešički, v katerih so shranjeni kemični prenašalci in hormoni. Proces sproščanja vsebine mešičkov se imenuje eksocitoza. Zlivanje membrane mešička s plazmalemo se začne z vzpostavitvijo ozkega kanala – fuzijske pore, ki poveže notranjost mešička z zunajceličnim prostorom. Pretekle raziskave kažejo, da mehanizem nastanka fuzijske pore poteka v dveh stopnjah. V prvi stopnji nastane metastabilno stanje ozke fuzijske pore, ki ji sledi druga stopnja, nenadna razširitev. Natančni molekularni mehanizem, ki vodi ta proces, ni znan. Predvsem je pomanjkljivo poznavanje

zgradbe fuzijske pore in vloga posameznih proteinov in drugih molekul pri nenadni razširitvi fuzijske pore. V raziskavi smo preverili vlogo nekaterih proteinov in lipidov pri procesu fuzije. Raziskave smo opravili na podganjih laktotrofih z elektrofiziološkimi metodami, konfokalno mikroskopijo, mikroskopijo s strukturiranim osvetljevanjem ter metodami molekularne biologije. Prednost laktotrofov pred živčnimi celicami je izredno pogosta prehodna fuzija, medtem ko je v živčnih celicah prerodka, da bi lahko zagotavljala zanesljive eksperimentalne podatke. Po drugi strani pa so v obeh modelih prisotne podobne oblike proteinov, ki sodelujejo pri fuziji. Zlivanje bioloških membran je energetsko zahteven proces, za katerega se najverjetneje pridobi energija z nastankom kompleksa SNARE. Kompleks se začne sestavljati z interakcijo vijačnih domen proteinov na N-koncu in nadaljuje s prepletanjem vijačnih domen proti C-koncu. Rezultati raziskav kažejo, da je nastanek kompleksa SNARE verjetno uravnavan tudi s proteini Sec1/Munc 18 (proteini SM), in sicer prek interakcije s syntaksinom1, ki je eden od proteinov SNARE. Rezultati amperometričnih raziskav so pokazali, da naj bi SM proteini vplivali na stabilnost fuzijske pore. To smo preverili z visoko ločljivimi meritvami membranske kapacitivnosti. Ta metoda nam omogoča neposredno spremljanje lastnosti fuzijske pore tudi pri prehodni fuziji. V raziskavi smo preučili, kako mutacije posameznih proteinov SM vplivajo na syntaksin1 in posredno na nastanek kompleksa SNARE. Spremljali smo, kako posamezne mutacije proteina Munc18-1, ki vplivajo na različne stopnje nastanka kompleksa SNARE, spremenijo lastnosti fuzijske pore. Naši poskusi so osvetlili morebitno vlogo proteinov SM pri regulaciji kinetike in prevodnosti fuzijske pore. S tem smo potrdili, da je sproščanje vsebine mešičkov pri prehodni fuziji lahko regulirano tudi na ravni lastnosti fuzijske pore. Poleg tega smo preverili tudi vlogo nekaterih lipidov in sekundarnega obveščevalca cAMP pri lastnostih elementarne fuzije posameznih mešičkov s plazmalemo.

ANG

A key problem to be solved in neurobiology is to understand the mechanism of signal transduction in a chemical synapse and the release of hormones from neuroendocrine cells. In both cases, the critical process involves vesicles in which the chemical messengers and hormones are stored. The release of vesicle cargo to the extracellular medium is mediated by exocytosis, the merger of vesicular and plasma membranes, which leads to the formation of a fusion pore, an aqueous channel providing a conduit through which secretory products exit cells. Studies point to a two-stage mechanism of fusion pore formation – an initially metastable narrow fusion pore is followed by a sudden enlargement. However, the molecular mechanisms governing this process are unclear. Specifically, we lack an insight into the nature of the supramolecular structure of the fusion pore and how specific proteins and other fusion pore associated molecules modulate the rapid transition of the fusion pore from a relatively impermeable to a fully permeable state. To understand the fusion pore mechanisms we studied the role of several proteins at the level of a single fusion pore in pituitary lactotrophs by electrophysiological, optical and molecular biology approaches. The advantage of using lactotrophs as a model system over neurones is that the transient fusion pores in lactotrophs exhibit a remarkable robust stability, whereas in neurons this intermediate fusion state is too short to be reliably detected experimentally. SNARE proteins are thought to mediate membrane fusion by forming stable complexes which are initiated at their N-terminal ends and then progress towards the C-terminal membrane anchors (zippering), thereby releasing energy. This process appears to be modulated by SNARE-associated proteins such as Sec1/Munc 18 (SM proteins) via their interaction with specific SNARE partners, such as syntaxin1. Previous amperometric studies indicated that SM proteins may affect the stability of the fusion pore. However, the critical question is to directly monitor the fusion pore properties, which we did by high-resolution membrane capacitance technique. Our results confirm that the interactions between the SM proteins and SNARE complex proteins affect the physiological properties of the transient fusion pore, the intermediate state leading to full fusion. We studied how mutations of the SM proteins, affecting the SNARE protein syntaxin 1 at different stages of SNARE zippering, modulate the single fusion pore properties. We strongly believe that these results provide new direct evidence that transient fusion pore properties are subject to physiological regulation in terms of kinetics and fusion pore diameter by the SM proteins. Additionally, we confirmed that cholesterol, extracellular sphingosine and cAMP likely affect kinetics and fusion pore diameter of fusing secretory vesicles.

3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

V prvem letu izvajanja raziskovalnega projekta smo v celoti uresničili specifični cilj (i). Optimizirali smo pripravo primarne kulture podganjih laktotrofov, da smo dobili kulturo s čim večjim deležom teh celic. Delež laktotrofov v kulturi smo določili tako, da smo laktotrofe označili s primarnimi

protitelesi, ki prepoznajo prolaktin in fluorescentno označenimi sekundarnimi protitelesi, ki prepoznajo primarna protitelesa. Delež fluorescentno označenih celic, smo določili s konfokalnim mikroskopom, in sicer je ta bil $\sim 90\%$. Z metodo dvojnega označevanja s specifičnimi protitelesi, ki prepoznajo Munc18-1 in sintaksin1 smo označili omenjena proteina v podganjih laktotrofi. Nato smo s konfokalnim mikroskopom potrdili, da se Munc18-1 in sintaksin1 nativno izražata v podganjih laktotrofi. Nadalje smo ugotovili, da se znotrajcelična razporeditev obeh proteinov ujema s sekretornimi mešički, ki so prisotni ob plazmalemi. Sekretorni mešički laktotrofov vsebujejo peptidni hormon – prolaktin. Zato smo izvedli poskuse, v katerih smo z imunocitokemično metodo dvojnega označevanja (s protitelesi, ki prepoznajo prolaktin in Munc18-1 oz. sintaksin1) preverili prekrivanje signala Munc18-1 in sintaksina1 s sekretornimi mešički. Stopnjo kolokalizacije slikovnih elementov dveh fluorescenčno označenih proteinov smo določili z računalniškim programom ColocANA, ki avtomatsko sešteje območje slikovnih elementov nad določeno prazno vrednostjo za vsak posamezen kanal zajemanja slike. Enako naredi še za dele celice, ki so označeni z obema barvama (rdečo in zeleno) ter izračuna število vseh zelenih, rdečih in kolokaliziranih slikovnih elementov (rdečih in zelenih hkrati) v vsaki sliki. Začeli smo z uresničevanjem specifičnih ciljev raziskave (ii), ki vključujejo elektrofiziološko metodo spremljanja membranske kapacitivnosti v majhni krpici membrane. S to metodo lahko določimo lastnosti (kinetiko in prevodnost) fuzijske pore. Omenjeno metodo smo optimizirali, tako da smo ugotovili najprimernejše parametre za ta tip meritev. Elektrofiziološke meritve smo opravili s pomočjo steklene mikropipete (s premerom odprtine približno $1\ \mu\text{m}$), s katero smo izolirali krpico membrane. Na pipeto smo dovedli sinusno napetost (1591 Hz, 111 mV r.m.s.), medtem ko je bil potencial pipete nastavljen na 0 mV. Merjeni signal smo vodili na fazno občutljivi ojačevalnik (SWAM IIC, Celica, Slovenija), katerega izhoda dajeta Realno (Re) in Imaginarno (Im) komponento sinusnega toka. Fazno občutljivi ojačevalnik loči ortogonalni komponenti, saj je Im komponenta v fazi z napetostjo, Re pa je zamaknjena za $\pi/2$. Re komponenta signala med drugim odraža prevodnost plazmaleme, medtem ko je Im komponenta sorazmerna kapacitivnosti plazmaleme. Oba signala smo vzorčili prek A/D pretvornika (National Instruments, ZDA) in dobljene vrednosti zajemali s pomočjo računalniškega programa Cell (Celica, Slovenija) na osebni računalnik. Steklene mikropipete smo pripravili iz borosilikatnih kapilar z notranjim filamentom (Clark Electromedical, Velika Britanija) s pomočjo vlačilca pipet (Palmer Bioscience, Velika Britanija). Pred uporabo smo mikropipete zgladili ob razžarjeni žici in jih obdali s Sylgardom (Midland, USA). Mikropipete smo napolnili z zunajcelično raztopino in jih vstavili v sondo, v kateri je bila Ag/AgCl elektroda. V merilno kamrico smo namestili krovno stekelce s celicami in dodali 200 μl zunajcelične raztopine. Nato smo s pomočjo mikromanipulatorja (Eppendorf, Nemčija) v zunajcelično raztopino potopili mikropipeto in ji izmerili upornost (upornost mikropipet je bila 2–4 M Ω). Mikropipeto smo previdno privedli do celice, se je dotaknili in jo s podtlakom zapečatili. Z elektronskim vezjem "C-fast" smo kompenzirali raztreseno kapacitivnost pipete in vhoda sonde. Pravilno nastavitev faznega kota smo med merjenjem s proženjem kalibracijskih pulzov znane amplitude (10 fF) preverjali vsakih deset sekund. Kalibracijski pulz predstavlja dodajanje kapacitivnostnega artefakta v ojačevalniku. Pri pravilni nastavitvi faznega kota se kalibracijski pulzi odražajo le na delu signala Im, ne pa tudi na delu Re. Izvedli smo tudi preliminarne elektrofiziološke meritve kapacitivnosti, s katerimi želimo določiti lastnosti (kinetiko in prevodnost) fuzijske pore v

spontanih razmerah.

V drugem letu izvajanja raziskovalnega projekta smo v celoti uresničili specifični cilj (ii).

Z elektrofiziološko metodo spremljanja membranske kapacitivnosti v majhni krpici membrane smo spremljali lastnosti (kinetiko in prevodnost) fuzijske pore. Uporabili smo optimizirane parametre (optimizacija je potekala lansko leto) in povečali število poskusov, da smo lahko ovrednotili rezultate tretjega specifičnega cilja (vpliv treh različnih mutant Munc18-1 (E466K, R39C in P242S) na lastnosti fuzijske pore).

Za celovito potrditev specifičnega cilja (iii) smo v tretjem letu potrdili hipotezo, da je fuzijska pora dinamičen kompleks, ki se lahko pred popolno fuzijo mešička ponavljajoče odpira do diskretnih vrednosti odvisnih od velikosti mešička in regulacije. Potrdili smo, da ima fuzijska pora pomembno regulacijsko vlogo pri uravnavanju sproščanja hormonov in živčnih prenašalcev. Rezultati so pokazali, da na uravnavanje fuzijske pore pomembno vplivajo Munc18-1 in proteini SNARE. Vsaj nekateri vpliva proteina Munc18-1 se nedvomno izrazijo prek kompleksa SNARE, oz. natančneje prek sintaksina1. Poleg vpliva na fuzijsko poro, smo uspeli dokazati tudi pomembno vlogo proteina Munc18-1 pri sidranju mešičkov prek vezi sintaksin1-SNAP25-sinaptobrevin2, ki je stabilnejša od vezi sintaksin1-sinaptobrevin2. Munc18-1 pa se veže tudi na kompleks sintaksin1-SNAP25-sinaptobrevin2, kar omogoči uravnavanje fuzijske pore.

V zadnjem letu smo izvedli dodatne poskuse, ki so potrdili, da je za fuzijo mešičkov s plazmalemo pomembna velikost mešičkov. Nadalje smo nadgradili rezultate prejšnjih let in pokazali, da imajo poleg proteinov pri fuziji mešičkov pomembno vlogo tudi lipidi, kot sta sfingozin in holesterol. Poskuse smo izvedli z metodo, ki smo jo izpopolnili v prvem letu projekta (elektrofiziološke meritve). Pri določanju vloge holesterola smo prvo pokazali, da deplecija holesterola z metilbetaciklodekstrinom rezultira v znižani pojavnosti eksocitoze. Z uporabo specifičnih inhibitorjev endocitoze (Dyngo 4a) smo pokazali, da je omenjeni vpliv na eksocitozo specifičen in ni posledica zmanjšane endocitoze. Vpliv sfingozina, ki deluje tako, da aktivira protein VAMP2 za združevanje kompleksa SNARE, na proces eksocitoze smo preverili elektrofiziološko, del poskusov pa je bil narejen tudi z visokoločljivostno mikroskopijo s strukturirano iluminacijo (SIM). Ti poskusi so prvi tovrstni poskusi. Ugotovili smo, da sfingozin in strukturni homolog fingolimod frekvenco prehodne in popolne fuzije mešičkov s plazmalemo. Pri tem so prešli mešički z večjim premerom v popolno fuzijo, manjši mešički pa so se zlivali s plazemsko membrano prehodno. Rezultati dobljeni z mikroskopijo SIM so pokazali, da je za od sfingozina odvisno eksocitozo, poleg ostalih dejavnikov, pomembna tudi velikost mešičkov.

Preverili smo tudi, če na lastnosti fuzije mešičkov s plazmalemo vpliva sekundarni obveščevalec cAMP. Z našimi poskusi smo pokazali, lahko s specifičnimi inhibitorji in aktivatorji sinteze cAMP in analogi cAMP vplivamo na sproščanje hormona prolaktina iz laktotrofov, ki ta hormon sintetizirajo. Z elektrofiziološkimi meritvami kapacitivnosti smo pokazali, da se vpliv cAMP na eksocitozo odraža tudi na ravni posameznega mešička, in sicer prek spremenjenih lastnosti fuzijske pore. cAMP stabilizira fuzijske pore in s tem prehodni tip fuzije in mešičkom prepreči popolno zlitje s plazemsko membrano.

Vsi rezultati poskusov so bili objavljeni v revijah z visokimi faktorji vpliva. Poleg tega smo objavili tudi pregledne članke, kjer smo naše izsledke umestili v kontekst že obstoječega znanja in natančno opisali metodo, ki smo jo pri projektu najpogosteje uporabili - visokoločljivostne meritve membranske

kapacitivnosti. Opis omenjene metode je bil objavljen v reviji Nature Protocols.

4. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

V sklopu raziskave smo si zastavili tri specifične cilje. V času trajanja projekta smo vse tri specifične cilje realizirali. Poleg realiziranih ciljev, so se tekom raziskave odpirala nova znanstvena vprašanja, kot npr. kakšna je vloga lipidov, sekundarnih prenašalcev (cAMP) ter velikosti mešičkov pri procesu eksocitoze. Tudi na ta dodatna vprašanja smo odgovorili. O uspešni realizaciji zastavljenih ciljev pričajo številni raziskovalni in pregledni članki v revijah z visokim faktorjem vpliva. Prav tako smo poskrbeli za diseminacijo rezultatov na mednarodnih konferencah (predavanja in posterji). Poseben poudarek smo dali tudi na izobraževanju mladih kadrov (mladi raziskovalci in diplomanti), ki smo jih uspešno pritegnili k raziskavam na raziskovalnem projektu. Ocenjujemo, da smo vse zastavljene cilje, tako znanstvene kot družbeno koristne, presegli.

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

Pri raziskovalnem projektu ni prišlo do bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta. Sestava projektne skupine je ostala nespremenjena.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

		Znanstveni dosežek	
1.	COBISS ID	30562009	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Dinamika fluktuacij površine membran v neuroendokrinih celicah, ki so posredovane s holesterolom
		<i>ANG</i>	Cholesterol-mediated membrane surface area dynamics in neuroendocrine cells
	Opis	<i>SLO</i>	Holesterol je ključni element bioloških membran, vendar njegov vpliv na eksocitozo še ni povsem pojasnjen. Poskusi z metilbetaciklodekstrinom (MCD), ki povzroci deplecijo holesterola v membranah smo pokazali, da deplecija holesterola rezultira v znižanani pojavnosti eksocitoze. Z uporabo specifičnih inhibitorjev endocitoze (Dyngo 4a) smo pokazali, da je omenjeni vpliv MCD na eksocitozo specifičen in ni posledica zmanjšane endocitoze.
		<i>ANG</i>	How cholesterol, a key membrane constituent, affects membrane surface area dynamics in secretory cells is unclear. Using methyl- β -cyclodextrin (MCD) to deplete cholesterol, we imaged melanotrophs from male Wistar rats in real-time and monitored membrane capacitance (C_m), fluctuations of which reflect exo- and endocytosis. Treatment with MCD reduced cellular cholesterol and caused a dose-dependent attenuation of the Ca^{2+} -evoked increase in C_m ($IC_{50} = 5.3$ mM) vs. untreated cells. Cytosol dialysis of MCD enhanced the attenuation of C_m increase ($IC_{50} = 3.3$ mM), suggesting cholesterol depletion at intracellular membrane sites was involved in attenuating exocytosis. Acute extracellular application of MCD resulted in an immediate C_m decline, which correlated well with the cellular surface area decrease, indicating the involvement of cholesterol in the regulation of membrane surface area dynamics. This decline in C_m was three-fold slower than MCD-mediated fluorescent cholesterol decay, implying that the exocytosis is the likely physiological means for plasma membrane cholesterol replenishment. MCD had no effect on the specific C_m

		and the blockade of endocytosis by Dyngo 4a, confirmed by inhibition of dextran uptake, also had no effect on the time-course of MCD-induced Cm decline. Thus acute exposure to MCD evokes a Cm decline linked to the removal of membrane cholesterol, which cannot be compensated for by exocytosis. We propose that the primary contribution of cholesterol to surface area dynamics is via its role in regulated exocytosis.
	Objavljeno v	Elsevier; Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids; 2013; Vol. 1831, iss. 7; str. 1228-1238; Impact Factor: 4.134; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.263; A': 1; WoS: CQ, DA, DR; Avtorji / Authors: Rituper Boštjan, Chowdhury Haque Helena, Jorgačevski Jernej, Coorssen Jens R., Kreft Marko, Zorec Robert
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	30620889 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> cAMP stabilizira fuzijske pore podganjih laktotrofov v kulturi
		<i>ANG</i> cAMP-mediated stabilization of fusion pores in cultured rat pituitary lactotrophs
	Opis	<i>SLO</i> Pomemben intermediat pri eksocitozi predstavlja fuzijska pora. Na eksocitozo, in tudi fuzijsko poro, pomembno vpliva dvig znotrajcelične koncentracije kalcija. Tudi ostali sekundarni obveščevalci, kot npr. cAMP vplivajo na eksocitozo, njihov vpliv na fuzijsko poro pa ni znan. Z našimi poskusi smo pokazali, lahko s specifičnimi inhibitorji in aktivatorji sinteze cAMP in analogi cAMP vplivamo na sproščanje hormona prolaktina iz laktotrofov, ki ta hormon sintetizirajo. Z visokoločljivostnimi meritvami membranske kapacitivnosti pa smo pokazali, da se vpliv cAMP na eksocitozo odraža tudi na ravni posameznega mešička, in sicer prek spremenjenih lastnosti fuzijske pore. cAMP stabilizira fuzijskepore in s tem prehodni tip fuzije in mešičkom prepreči popolno zlitjo s plazemsko membrano.
		<i>ANG</i> Regulated exocytosis mediates the release of hormones and transmitters. The last step of this process is represented by the merger between the vesicle and the plasma membranes, and the formation of a fusion pore. Once formed, the initially stable and narrow fusion pore may reversibly widen (transient exocytosis) or fully open (full-fusion exocytosis). Exocytosis is typically triggered by an elevation in cytosolic calcium activity. However, other second messengers, such as cAMP, have been reported to modulate secretion. The way in which cAMP influences the transitions between different fusion pore states remains unclear. Here, hormone release studies show that prolactin release from isolated rat lactotrophs stimulated by forskolin, an activator of adenylyl cyclases, and by membrane-permeable cAMP analog (dbcAMP), exhibit a biphasic concentration dependency. Although at lower concentrations (2-10 m forskolin and 2.5-5 mm dbcAMP) these agents stimulate prolactin release, an inhibition is measured at higher concentrations (50 m forskolin and 10-15 mm dbcAMP). By using high-resolution capacitance (Cm) measurements, we recorded discrete increases in Cm, which represent elementary exocytic events. An elevation of cAMP leaves the frequency of full-fusion events unchanged while increasing the frequency of transient events. These exhibited a wider fusion pore as measured by increased fusion pore conductance and a prolonged fusion pore dwell time. The probability of observing rhythmic reopening of transient fusion pores was elevated by dbcAMP. In conclusion, cAMP-mediated stabilization of wide fusion pores prevents vesicles from proceeding to the full-fusion stage of exocytosis, which hinders vesicle content discharge at high cAMP concentrations.
		The Society; The Journal of neuroscience; 2013; Vol. 33, iss. 18; str. 8068-8078; Impact Factor: 6.908; Srednja vrednost revije / Medium Category

	Objavljeno v	Impact Factor: 3.574; A'': 1;A': 1; WoS: RU; Avtorji / Authors: Costa Calejo Ana-Isabel, Jorgačevski Jernej, Kucka Marek, Kreft Marko, Gonçalves Paula P., Stojilković Stanko, Zorec Robert	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID	30722265	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Velikost mešičkov vpliva na elementarne lastnosti fuzije in na občutljivost mešičkov na sfingozin
		ANG	Vesicle size determines unitary exocytic properties and their sensitivity to sphingosine
	Opis	SLO	Poznamo popolno in prehodno eksocitozo, ki sta prevladujoči obliki eksocitoze v melanotrofi in laktotrofi. Sfingozin vpliva na eksocitozo tako, da aktivira protein VAMP2 za združevanje kompleksa SNARE. Ugotovili smo, da sfingozin in strukturni homolog fingolimod povišata raven eksocitoze tako, da povišata frekvenco prehodne in popolne fuzije. Pri tem so prešli mešički z večjim premerom v popolno fuzijo, manjši mešički pa so se zlivali s plazemsko membrano prehodno. Rezultati so pokazali, da je za od sfingozina odvisno eksocitozo, poleg ostalih dejavnikov, pomembna tudi velikost mešičkov.
		ANG	Neuroendocrine cells contain small and large vesicles, but the functional significance of vesicle diameter is unclear. We studied unitary exocytic events of prolactin-containing vesicles in lactotrophs by monitoring discrete steps in membrane capacitance. In the presence of sphingosine, which recruits VAMP2 for SNARE complex formation, the frequency of transient and full fusion events increased. Vesicles with larger diameters proceeded to full fusion, but smaller vesicles remained entrapped in transient exocytosis. The diameter of vesicle dense cores released by full fusion exocytosis into the extracellular space was larger than the diameter of the remaining intracellular vesicles beneath the plasma membrane. Labeling with prolactin- and VAMP2-antibodies revealed a correlation between the diameters of colocalized prolactin- and VAMP2-positive structures. It is proposed that sphingosine-mediated facilitation of regulated exocytosis is not only related to the number of SNARE complexes per vesicle but also depends on the vesicle size, which may determine the transition between transient and full fusion exocytosis.
	Objavljeno v	North-Holland; Molecular and cellular endocrinology; 2013; Vol. 376, iss. 1/2; str. 136-147; Impact Factor: 4.039; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.278; WoS: DR, IA; Avtorji / Authors: Flašker Ajda, Jorgačevski Jernej, Costa Calejo Ana-Isabel, Kreft Marko, Zorec Robert	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
4.	COBISS ID	28521433	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Vpliv proteina Munc 18-1 na fuzijo mešičkov in lastnosti fuzijske pore
		ANG	Munc 18-1 tuning of vesicle merger and fusion pore properties
	Opis	SLO	Fuzijska pora je lahko pomemben dejavnik za uravnavanje sproščanja hormonov in živčnih prenašalcev. Domneva se, da je fuzijska pora v začetni fazi ozka in stabilna, pozneje pa se razširi in omogoči popolno zlitje mešička s plazmalemo. Namen raziskave je bil preveriti vpliv proteinov SecI/Munc18 na lastnosti fuzijske pore z lektrofiziološko metodo spremljanja membranske kapacitivnosti v majhni krpici membrane. V izolirane podganje laktotrofe smo vnesli mutante Munc18-1, ki vplivajo na vezavo tega proteina s sintaksinom1 (R39C), proteinom Rab3A (E466K) in proteini Mint (P242S). V primerjavi s celicami, ki so izražale le nativni protein Munc18-1, je Munc18-1 E466K povečal frekvenco fuzijskih dogodkov in podaljšal povprečni odprti čas fuzijske pore. Munc18-1 P242S je podaljšal povprečni odprti čas fuzijske pore. Vse mutante so stabilizirale fuzijsko poro v začetni

		<p>fazi. Posledica vnosa mutant Munc18-1 je bilo tudi zlivanje večjih mešičkov, ki pa najverjetneje niso bile posledice sestavljene fuzije, kar smo potrdili z mikroskopijo STED. Mikroskopija na atomsko silo je pokazala, da vezava Munc18-1 na t.i. zaprto obliko sintaksina1 prepreči vezavo sintaksina1 na sinaptobrevin2 kar prepreči sidranje mešička. V kolikor je sintaksin1 že vezan na protein SNAP25, Munc18-1 ne prepreči vezave s sinaptobrevinom2. Ena od vlog Munc18-1 je torej zagotavljanje sidranja mešičkov prek vezi sintaksin1-SNAP25-sinaptobrevin2, ki je stabilnejša od vezi sintaksin1-sinaptobrevin2. Munc18-1 pa se veže tudi na kompleks sintaksin1-SNAP25-sinaptobrevin2, kar omogoči uravnavanje fuzijske pore.</p>
	ANG	<p>The release of hormones and neurotransmitters, mediated by regulated exocytosis, can be modified by regulation of the fusion pore. The fusion pore is considered stable and narrow initially, eventually leading to the complete merger of the vesicle and the plasma membranes. By using the high-resolution patch-clamp capacitance technique, we studied single vesicles and asked whether the Sec1/Munc18 proteins, interacting with the membrane fusion-mediating SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) proteins, affect fusion pore properties. Munc18-1 mutants were transfected into lactotrophs to affect the interaction of Munc18-1 with syntaxin1 (Synt1) (R39C), Rab3A (E466K), and Mints (P242S). Compared with wild-type, Munc18-1 E466K increased the frequency of the fusion event. The latter two mutants increased the fusion pore dwell-time. All the mutants stabilized narrow fusion pores and increased the amplitude of fusion events, likely via preferential fusion of larger vesicles, since overexpression of Munc18-1 R39C did not affect the average size of vesicles, as determined by stimulated emission depletion (STED) microscopy. Single-molecule atomic force microscopy experiments revealed that wild-type Munc18-1, but not Munc18-1 R39C, abrogates the interaction between synaptobrevin2 (Syb2) and Synt1 binary trans-complexes. However, neither form of Munc18-1 affected the interaction of Syb2 with the preformed binary cis-Synt1-SNAP25 complexes. This indicates that Munc18-1 performs a proofreading function by inhibiting tethering of Syb2-containing vesicles solely to Synt1 at the plasmalemma and favoring vesicular tethering to the preformed binary cis-complex of Synt1-SNAP25. The association of Munc18-1 with the ternary SNARE complex leads to tuning of fusion pores via multiple and converging mechanisms involving Munc18-1 interactions with Synt1A, Rab3A, and Mints.</p>
	Objavljeno v	The Society; The Journal of neuroscience; 2011; Vol. 31, issue 24; str. 9055-9066; Impact Factor: 7.115; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.602; A': 1; A'': 1; WoS: RU; Avtorji / Authors: Jorgačevski Jernej, Potokar Maja, Grilc Sonja, Kreft Marko, Zorec Robert
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
5.	COBISS ID	30613977
		Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Visoko ločljivostne meritve membranske kapacitivnosti za spremljanje eksocitoze in endocitoze
		ANG High-resolution membrane capacitance measurements for the study of exocytosis and endocytosis
	Opis	SLO Za študij eksocitoze in endocitoze so nujne neposredne meritve tega procesa. Eleganten način predstavlja spremljanje membranske kapacitivnosti, ki je sorazmerna s spremembami v površini plazemske membrane. Do sprememb v površini plazemske membrane pride v procesih ekso in endocitoze. V tem članku natančno opišemo protokol za meritve membranske kapacitivnosti. Ta protokol navadno uporabljamo za meritve na izoliranih hipofiznih celicah, se ga pa da enostavno prilagoditi katerikoli drugemu tipu celic. Časovno potratna je predvsem postavitvena sistema, izvajanje meritev pa je po tem, ko operater dobi nekaj izkušenj,

		hitra in relativno enostavna.
	ANG	In order to understand exocytosis and endocytosis, it is necessary to study these processes directly. An elegant way to do this is by measuring plasma membrane capacitance (Cm), a parameter proportional to cell surface area, the fluctuations of which are due to fusion and fission of secretory and other vesicles. Here we describe protocols that enable high-resolution Cm measurements in macroscopic and microscopic modes. Macroscopic mode, performed in whole-cell configuration, is used for measuring bulk Cm changes in the entire membrane area, and it enables the introduction of exocytosis stimulators or inhibitors into the cytosol through the patch pipette. Microscopic mode, performed in cell-attached configuration, enables measurements of Cm with attofarad resolution and allows characterization of fusion pore properties. Although we usually apply these protocols to primary pituitary cells and astrocytes, they can be adapted and used for other cell types. After initial hardware setup and culture preparation, several Cm measurements can be performed daily.
Objavljeno v		Nature Pub. Group; Nature protocols; 2013; Vol. 8, no. 6; str. 1169-1183; Impact Factor: 7.960; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.089; A': 1; WoS: CO; Avtorji / Authors: Rituper Boštjan, Guček Alenka, Jorgačevski Jernej, Flašker Ajda, Kreft Marko, Zorec Robert
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

	Družbeno-ekonomski dosežek	
1.	COBISS ID	784247
		Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Vpliv lipidov na fuzijsko poro v procesu eksocitoze pri podganjih laktotrofi
		ANG The role of lipids in fusion pore formation and exocytosis of rat lactotrophs
	Opis	SLO Poznamo dva tipa eksocitoze, popolno in prehodno, prva je prevladujoča oblika v melanotrofi, ki so zato primerni za merjenje celokupne eksocitoze. Sfingolipid sfingozin aktivira protein VAMP2 za združevanje kompleksa SNARE, ki je pomemben v membranski fuziji. Ugotovili smo, da sfingozin, kot tudi njegov strukturni homolog fngolimod povišata eksocitozo, če ju dodamo zunajcelično. Nadalje smo preverili eksocitozo v laktotrofi, kjer je prevladujoč tip prehodna eksocitoza. Eksocitozo smo spremljali tako, da smo merili diskretne spremembe membranske kapacitivnosti, ki je sorazmerna spremembam v površini plazmaleme. V prisotnosti sfingozina se je frekvenca prehodne in popolne fuzije povišala. Mešički z večjim premerom so prešli v popolno fuzijo, medtem ko so manjši mešički ostali ujeti v prehodni eksocitozi. Označevanje s fluorescentnimi protitelesi, ki prepoznajo prolaktin (PRL) je pokazalo, da je bil povprečni premer izločene a nerazgrajene vsebine mešičkov večji kot premer neizločenih mešičkov. S pomočjo protiteles, ki prepoznajo hormon PRL in VAMP2 smo ugotovili, da je intenziteta signala VAMP2 neodvisna od premera PRL mešičkov, hkrati pa je bila gostota VAMP2 signalov manjša v večjih mešičkih. Rezultati kažejo, da s sfingozinom posredovana uravnavana eksocitoza ni povezana samo s številom kompleksov SNARE na posameznem mešičku, ampak je odvisna tudi od velikosti mešičkov, ki lahko pomembno vplivajo na prehod iz prehodne v popolno eksocitozo.
		Two types of exocytosis are known, full fusion and transient fusion, first type is dominant form in melanotrophs, which are therefore appropriate cell type for measurements of bulk exocytosis. Sphingolipid sphingosine recruits protein VAMP2 for SNARE complex formation, which is important for membrane fusion. We discovered that sphingosine and its structure homologue fngolimod increased exocytosis, if added extracellularly. We

		<p>also studied exocytosis in lactotrophs, where transient fusion is dominant mode of exocytosis. We measure exocytosis by monitoring discrete steps in membrane capacitance, which is proportional to the changes in surface area of plasma membrane. In the presence of sphingosine the frequency of transient and full-fusion events increased. Vesicles with larger diameters proceeded to full fusion, while smaller vesicles remained entrapped in transient exocytosis. Labeling with fluorescent antibodies recognizing prolactin (PRL) showed that the average diameter of secreted, but undegradated vesicle content was larger than diameter of unsecreted vesicles. PRL- and VAMP2-antibodies revealed that the intensity of VAMP2 signal was independent of PRL vesicle diameter. However, the density of VAMP2 signals was reduced in larger vesicles. We propose that sphingosine-mediated facilitation of regulated exocytosis is not only related to the number of SNARE complexes per vesicle but also depends on the vesicle size, which may determine the transition between transient and full-fusion exocytosis.</p>
	Šifra	D.09 Mentorstvo doktorandom
	Objavljeno v	[A. Flašker]; 2013; XI, 66 f.; Avtorji / Authors: Flašker Ajda
	Tipologija	2.08 Doktorska disertacija
2.	COBISS ID	262313984 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<p><i>SLO</i> Vpliv monomernih GTPaz RAB na mobilnost mešičkov v podganjih astrocitih v kulturi</p> <p><i>ANG</i> Role of monomeric RAB GTPases in vesicle mobility in cultured rat astrocytes</p>
	Opis	<p><i>SLO</i> Monomerne GTPaze RAB uravnavajo mobilnost mešičkov in delujejo kot molekulska stikala. Vloga proteinov RAB pri transportu mešičkov v astrocitih, ki so najštevilčnejše celice glije v možganih, je slabo raziskana. Vpliv proteinov RAB smo raziskovali z vnosom plazmidne DNA, ki kodirajo divji tip, dominantno-negativne in dominantno-pozitivne mutacije, ki vplivajo na GTPazno aktivnost proteinov RAB4A in RAB5A. Preverili smo tudi prisotnost in vlogo proteinov GDI1 in GDI2. Naši rezultati so pokazali, da sta RAB4A in RAB5A prisotna na znotrajceličnih strukturah zgodnje in pozne endocitoze. Vnos dominantno-negativnih in dominantno-pozitivnih oblik proteinov RAB v astrocite povzroči navidezno povečanje mešičkov, kar je posebej očitno v primeru vnosa dominantno-pozitivnih oblik proteinov RAB5A. Mutante vplivajo na mobilnost mešičkov, in sicer tako, da mobilnost upočasnijo in zmanjšajo delež mobilnih mešičkov. Pokazali smo, da astrociti izražajo efektorska proteina GDI1 in GDI2. Zmanjšanje izražanja teh dveh proteinov pomembno vpliva na mobilnost mešičkov v podganjih astrocitih.</p> <p><i>ANG</i> Small monomeric GTPases function as molecular switches and are important for the regulation of the vesicular traffic. The role of RAB proteins in the vesicular traffic of vesicles in astrocytes, which are the most abundant glial cells in the mammalian CNS, is poorly understood. We have studied their role by transfecting astrocytes with the plasmids encoding RAB4A and RAB5A wild type, the dominant negative and the dominant positive forms. We proceeded by testing whether astrocytes express GDI1 or GDI2 proteins and their potential role in the vesicular mobility. Our results show that RAB4A and RAB5A are present on the sub-cellular structures of the early and late endocytic pathway. Astrocytes expressing the dominant-negative or the dominant positive forms of RAB4A/5A exhibit enlarged vesicles, which is most evident in cells expressing dominant positive forms. The mutants also affect vesicle mobility, which is significantly decreased. We have proven that astrocytes express GDI1 and GDI2. Inhibition of the expression of these two proteins decreases vesicle mobility.</p>

	Šifra	D.09 Mentorstvo doktorandom	
	Objavljeno v	V. Lacovich; 2012; 60 f.; Avtorji / Authors: Lacovich Valentina	
	Tipologija	2.08 Doktorska disertacija	
3.	COBISS ID	35338245	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Elektrofiziološke meritve diskretnih sprememb membranskih kapacitivnosti v astrocitih
		<i>ANG</i>	Electrophysiological measurements of discrete steps in membrane capacitance of astrocytes
	Opis	<i>SLO</i>	Astrociti s sproščanjem glijotransmitterjev vplivajo na prenosa signala med nevroni. Pomembno vlogo ima regulirana eksocitoza in eden izmed ključnih intermediatov - fuzijska pora. Z neposrednimi meritvami fluktuacij plazmaleme smo spremljali, kakšen je bil mehanizem eksocitoze; ali je bila fuzija prehodna ali popolna. Rezultati so pokazali, da v astrocitih v kulturi več kot 90 % dogodkov predstavlja prehodno fuzijo. V spontanah pogojih prevladujejo dogodki z amplitudami kapacitivnosti mešičkov $0,41 \pm 0,06$ fF (premer sekretornih mešičkov okoli 100 nm) in s fuzijskimi porami, ki so povprečno odprte 91 ± 6 ms. Stimulacija z adenzin trifosfatom (ATP) pomembno vpliva na fiziologijo astrocitov. Rezultati kažejo, da se po stimulaciji astrocitov z ATP (1 mM) poveča frekvenca prehodnih fuzijskih dogodkov, katerih amplituda je v povprečju $0,41 \pm 0,01$ fF. Poleg teh dogodkov smo opazili tudi skupino dogodkov, ki so imeli povprečje amplitud kapacitivnosti mešičkov $1,50 \pm 0,03$ fF in predstavljajo populacijo sekretornih mešičkov s premeri okoli 300 nm. Ti mešički imajo daljši povprečni čas odprtja fuzijske pore, v primerjavi z mešički, ki imajo manjši premer ($0,27 \pm 0,01$ s proti $0,16 \pm 0,01$ s). Fuzijska pora se po stimulaciji z ATP razširi, kar omogoča pospešeno sproščanje glijotransmitterjev.
		<i>ANG</i>	Astrocytes have an important role in modulating signal transmission in synapses between neurons, because they release gliotransmitters. Regulated exocytosis represents one of the mechanisms of the release of gliotransmitters and it consists of vesicle fusion with the plasma membrane. Fusion pore formation enables diffusion of gliotransmitters into extracellular space. Subsequently, the fusion pore closes or the vesicle merges with the plasma membrane. In the first case the surface area of the membrane increases transiently and in the second it increases for longer period of time. Direct measurements of plasma membrane fluctuations due to regulated exocytosis in astrocytes has not been performed yet. Surface area alternations can be monitored by applying the high resolution patch clamp technique. Cell-attached mode of membrane capacitance measurements enables monitoring of reversible and irreversible discrete steps in capacitance (parameter linearly dependant on the surface area) and subsequent evaluation of exocytosis types (transient or full fusion). Results showed that transient fusion dominates in astrocytes. It occurs in more than 90% of the cases. The average vesicle capacitance amplitudes are $0,41 \pm 0,06$ fF (vesicle diameter of 100 nm) and have the fusion pores opened in average for 91 ± 6 ms. Stimulation with adenosine triphosphate (ATP) influences the physiology of astrocytes. Results revealed that stimulation with ATP (1 mM) increases the frequency of transient events with average amplitudes of $0,41 \pm 0,01$ fF. Additionally, it induces secretion of a second population with average amplitudes of vesicle capacitance of $1,50 \pm 0,03$ fF, representing vesicles with diameters of around 300 nm and prolonged dwell-time ($0,16 \pm 0,01$ before stimulation vs. $0,27 \pm 0,01$ s after stimulation). After the stimulation with ATP the fusion pore expands, which enables stimulated release of gliotransmitters.
	Šifra	D.10 Pedagoško delo	
	Objavljeno v	[A. Guček]; 2011; VIII, 42 f.; Avtorji / Authors: Guček Alenka	
	Tipologija	2.11	

		Diplomsko delo	
4.	COBISS ID	29542617	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Nova metoda (platforma) za iskanje biološko aktivnih molekul, za ocenjevanje kakovosti celic za celične terapije in za nadzor kakovosti pridelave rekombinantnih proteinov na podlagi analize mobilnosti znotrajceličnih organelov v povezavi z bolezenskimi stanji	
	ANG	Screening methods based on the vesicle mobility	
Opis	SLO	Predloženi izum predstavlja platformo, ki vključuje in vitro celične sisteme, metode in standard za manipulacijo in/ali analizo znotrajcelične mobilnosti celičnih organelov, pomembne za razumevanje temeljnih celičnih procesov kot tudi za uporabo celic v medicinske in biotehnoške namene. Novost predloženega izuma je kombinacija pristopov, ki obsegajo: i) metodo spremljanja dinamike znotrajceličnih organelov za iskanje biološko aktivnih substanc (npr. sestavine serumov, cerebrospinalne tekočine ter druge biološko aktivne anorganske ali organske molekule in njihove mešanice), ii) metodo za določanje kakovosti celic za napredne celične terapije in iii) metodo za ocenjevanje in nadzor kakovosti pridelave rekombinantnih proteinov znotraj evkariontskih celic v povezavi z mobilnostjo znotrajceličnih organelov. Ta izum predstavlja tudi podlago za proučevanje učinkov različnih farmacevtskih učinkovin za zdravljenje/modulacijo nekaterih patoloških stanj, ki zadevajo medcelično komunikacijo ter s tem povezano mobilnost in dinamiko znotrajceličnih organelov.	
	ANG	The invention relates to a method of screening for a compound useful in the treatment of a disease selected from neurodegenerative diseases and neuro-inflammatory diseases, said method comprising providing a test cell; staining at least one organelle of said test cell; contacting said test cell with a test compound; and recording the path of said stained organelle in said test cell. Suitable compounds are identified from a comparison of the recorded path with a suitable reference.	
Šifra	F.06 Razvoj novega izdelka		
Objavljeno v	Urad RS za intelektualno lastnino; 2011; 14 str.; Avtorji / Authors: Zorec Robert, Stenovec Matjaž, Trkov Saša, Vardjan Nina, Potokar Maja, Kreft Marko, Gabrijel Mateja, Jorgačevski Jernej		
Tipologija	2.23 Patentna prijava		
5.	COBISS ID	2814543	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Visokoločljivostna fluorescenčna mikroskopija	
	ANG	Superresolution microscopy	
Opis	SLO	Visokoločljivostna mikroskopija je napredna tehnologija, kjer dosežemo ločljivost, ki je vsaj dvakrat boljša od ločljivosti običajne svetlobne mikroskopije. Organizacija srečanja, ki je spremljal uradni začetek mikroskopije STED v Sloveniji. Eden od ključnih instrumentov visokoločljivostnih mikroskopij predstavlja mikroskop STED, ki ga imamo sedaj tudi v Sloveniji. Mikroskop STED, ki je sestavljen iz najbolj naprednih optičnih, mehanskih in električnih komponent, predstavlja instrument, ki omogoča meritve na meji danosti. Mikroskop STED omogoča vizualizacijo živih celic z ločljivostjo med 35 in 40 nm, v idealnih pogojih pa okoli 30 nm. Znanstveno srečanje z delavnico visokoločljivostne mikroskopije je bilo namenjeno predstavitvi tovrstne mikroskopije.	
	ANG	Super resolution microscopy is the cutting edge technology with the resolution that is at list twice better than the resolution of conventional far field microscopy. One of the key instuments of super resolution microscopy is STED technology based instrument, which is now located also in Slovenia. It represents the most advanced technology in the field of optical microscopy, comprised of most advanced optics, mechanics and electronics.	

		It enables observation of living objects at resolution between 35 and 40 nm with the potential to visualize objects beyond these limits. The conference with a workshop of the demonstration of the super-resolution microscopy is dedicated to the introduction of this technological novelty.
Šifra	B.01	Organizator znanstvenega srečanja
Objavljeno v	Centre of Excellence for Integrated Approaches in Chemistry and Biology of Proteins; 2013; 44 str.; Avtorji / Authors: Zorec Robert, Kreft Marko, Tušar Livija, Turk Dušan	
Tipologija	2.25	Druge monografije in druga zaključena dela

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁷

--

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

9.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Hormoni in kemični prenašalci prenašajo informacije med organi oziroma tkivi v človeškem telesu. Sproščanje teh signalnih molekul iz mešičkov regulirajo proteini, ni pa znano v kakšnem vrstnem redu in kateri proteini med seboj reagirajo. Rezultati naše raziskave bodo pomembno doprinesli k boljšemu razumevanju regulacije lastnosti fuzijske pore (pojavnost in premer fuzijske pore) s proteinom Munc18-1. S tem se bo razširilo znanje na področju sproščanja signalnih molekul iz posameznih celic, ki je potrebno za razumevanje prenosa informacij v kemični sinapsi in sproščanja hormonov.

ANG

Hormones and neurotransmitters are chemical messengers that relay vital instructions through out our entire body. The release of these signalling molecules is regulated by proteins. However, we lack insight into the nature of the interactions between specific proteins, which would enable a better understanding of how specific proteins and other fusion pore associated molecules modulate the release. The results of this study importantly contribute to a better understanding of the fusion pore regulation. Specifically, we provide evidence if/how SNARE-associated protein Munc18-1 affects the kinetics and conductance of the fusion pore. The findings therefore provide new direct evidence toward a better understanding of the single cell release of signaling molecules, which is needed to better understand the mechanism of signal transduction of chemical synapse and of the release of hormones.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

1.) Razvoj vsake države je pogojen z razvojem industrije, ki je vezan na ugotovitve bazične znanosti. Rezultati naše raziskave so povečali obstoječe znanje na področju nevrozanosti, iz katerega črpa znanje predvsem farmacevtska industrija, ki je v Sloveniji ena najpomembnejših industrijskih panog. Učinki bazičnih raziskav se v industriji odražajo z zamikom.

2.) Vsebinska aktualnost projekta se je odrazila tudi s številnimi objavami rezultatov v znanstvenih revijah z visokim faktorjem vpliva in organizacijo mednarodnih srečanj, kar povečuje prepoznavnost tako Ljubljanske univerze, kot tudi Slovenije.

3.) S tem projektom, ki vsebuje pomembno temo raziskovanja, so raziskovalci projektne skupine pridobili tudi na izobraževalnem področju. Da bi lahko tudi v bodoče prispevali k raziskovanju te problematike, so se ustrezno izobrazili tudi mlajši raziskovalci. Raziskovalni projekt je poleg večje prepoznavnosti članov programske skupine v znanstvenih krogih, pripomogla tudi k lažjemu navezovanju stikov z mednarodno mrežo raziskovalcev, kar je pomembno za nadaljni razvoj, tako posameznikov kot skupine in tudi države.

ANG

1.) National development is tightly related to the industrial progress, which in turn depends on the findings of basic science. As one of the topical fields of research our research contributes to the basic knowledge of neuroscience. This is especially relevant for Slovenia, where pharmaceutical industry is well established. Translation of the basic research to industry is though a relatively slow process.

2.) Highly important theme of our research is mirrored also in several scientific publications with high impact factor and in the organization of international meetings. This has helped to gain visibility of individuals, and the scientific community in Slovenia as well.

3.) Education of personnel benefited by supporting our proposal. To contribute to the global effort, it is imperative to train young researchers to gain competitiveness in fundamental research. Research project has also facilitated the international collaborations.

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

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	

	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

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

Komentar

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

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
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="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 sofinancerje¹¹

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

	5.	
Komentar		
Ocena		

13. Izjemni dosežek v letu 2013¹²

13.1. Izjemni znanstveni dosežek

Objava opisa metode, ki smo jo pri projektu najpogosteje uporabili - visokoločljivostne meritve membranske kapacitivnosti v reviji Nature Protocols.

13.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Član projektne skupine dr. Jernej Jorgačevski je za svoje doktorsko delo prejel nagradno zlati znak Jožefa Stefana.

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:

CELICA, biomedicinski center, d.o.o.

Robert Zorec

ŽIG

Kraj in datum:

Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2014/56

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

² Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

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

⁴ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov

objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

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

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

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

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

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

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

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

¹¹ Rubrike izpolnite / prepisite skladno z obrazcem "izjava sofinancerja" <http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>, ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

¹² Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2013 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priložko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2014 v1.02
D5-83-46-13-CA-52-63-C8-C5-3C-9D-97-7D-59-AD-EE-48-9A-93-22