

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/194



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1.Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J1-4121
Naslov projekta	Vloga cisteinskih katapsinov pri celičnem signaliziranju
Vodja projekta	7561 Boris Turk
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	7560
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	07.2011 - 06.2014
Nosilna raziskovalna organizacija	106 Institut "Jožef Stefan"
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	2592 ACIES BIO, biotehnoške raziskave in razvoj, d.o.o. 2990 Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov, Ljubljana
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	1 NARAVOSLOVJE 1.05 Biokemija in molekularna biologija
Družbeno-ekonomski cilj	13.01 Naravoslovne vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	1 Naravoslovne vede 1.07 Druge naravoslovne vede

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

2.Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Razumevanje osnovnih molekularnih mehanizmov, ki jih uporabljajo proteaze, je postalo ena od pomembnih raziskovalnih prioritet pri razumevanju osnovnih bioloških procesov vključno z bolezenskimi. Poleg tega omogoča modulacija nekaterih od the procesov tudi

eventuelno terapevtsko intervencijo. V okviru tega projekta smo se usmerili na lizosomske cisteinske katepsine in razumevanje signalnih poti v katere so vpleteni, s poudarkom na raku. V okviru projekta smo razvijali orodja, ki nam omogočajo spremljanje aktivnosti katepsinov v živih celicah in pri neinvazivnem spremljanju aktivnosti in vivo. Pri tem smo bili zelo uspešni in smo razvili več selektivnih sond za različne katepsine med katerimi je bila najuspešnejša selektivna lipidirana sonda za katepsin S, ki je bila zelo selektivna in učinkovita tako v celičnih modelih kot tudi in vivo v mišjem modelu raka. Poleg tega smo se usmerili tudi na raziskavo kemokinov kot substratov katepsinov in pomen teh cepitev za vnetne procese, vključno s tistimi pri raku, ki je pogosto povezanjem z vnetjem. Z uporabo različnih pristopov, vključujoč masno spektroskopijo, smo pokazali, da katepsini različno cepijo ELR pozitivne in ELR negativne kemokine in posledično različno vplivajo na rekrutiranje vnetnih celic. V okviru projekta smo preučevali tudi mehanizem delovanja različnih lizosomotropičnih spojin, kot je npr. lizosomotropični detergent LLOMe, na podlagi katerega je osnovana tudi lizosomska pot apoptoze. Z enakim metodološkim pristopom smo nato uspeli pojasniti mehanizem delovanja siramezina, N-dodecilimidazola ter sfingozina, za katere so sprva poročali, da delujejo kot lizosomotropični detergenti. Pokazali smo, da nobena od testiranih spojin ne deluje kot lizosomotropični detergent, temveč le dvignejo pH kislih veziklov, smrt celice pa sprožijo preko destabilizacije mitohondrijev. Ti rezultati kažejo na nov, pomemben vpogled v delovanje tovrstnih spojin v celici ter njihovo uporabo v terapevtske namene. V sodelovanju s podjetjem Acies Bio pa smo evalvirali tudi biološko aktivnost novih analogov nenavadnega tetraciklinskega antibiotika, pridobljenih z biosinteznim inženirstvom. Pokazali smo, da lahko z biosinteznim inženirstvom pridobimo analoge z izboljšano inhibitorno aktivnostjo na rakaste celice človeškega glioblastoma-astrocitoma. Pridobljeni rezultati bodo v pomoč pri nadaljnjem razvoju spojin in derivatizaciji z metodami polsintheze.

ANG

Understanding basic molecular mechanisms used by proteases to drive physiological processes have gained increasing importance in understanding fundamental biological processes, including in pathologies. In addition, interfering with some of these pathways provides means for successful therapeutic interventions. In this project we have focused on lysosomal cysteine cathepsins and their signalling pathways, in particular those linked with cancer. As part of the project, we were developing tools that enabled us to monitor cathepsin activities in living cells and also noninvasively in vivo. We were extremely successful in developing several probes for different cathepsins, the most successful being a lipidated probe for cathepsin S, which was very selective and efficient both in cells and in vivo in a mouse cancer model. In addition, we have focused on the potential role of chemokines as cathepsin substrates that may drive inflammatory processes, including those in cancer, which is often associated with inflammation. Using different approaches, including mass spectrometry, we have demonstrated that cathepsins differentially cleave ELR and non-ELR chemokines, thereby differentially affecting inflammatory cell recruitment. Our group contributed significantly to the understanding of the lysosomal apoptotic pathway, which is based on the mechanism of lysosomotropic detergent LLOMe. Using the same methodological approach, we analysed the mechanism of siramesine, N-dodecylimidazole and sphingosine, which were all previously reported to be lysosomotropic detergents. We have shown that none of those acts as a lysosomotropic detergent. However, although all the

compounds increased pH of the acidic vesicles, cells die as a consequence of destabilization of mitochondria. These results show a new, important insight into the mechanism of such compounds and their usage for cancer therapy. In collaboration with the company Acies Bio we also evaluated biological activity of novel analogues of an unusual tetracycline antibiotic, obtained by biosynthetic engineering. We demonstrated that biosynthetic engineering can provide analogues with improved inhibitory activity against cancer cells of human glioblastoma-astrocytoma. These results will support further compound development and derivatization by semi-synthetic methods.

3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

Apoptoza je oblika programirane celične smrti, ki ima pomembno vlogo igra pri vzdrževanju tkivne homeostaze večceličnih organizmov, v imunskem sistemu in pri razvoju zarodkov. Napake in nepravilnosti pri njenem uravnavanju lahko vodijo do različnih bolezni kot so nevrodegenerativne in avtoimunske bolezni ter rak. Pomembno vlogo tako pri apoptozi kot pri razvoju in napredovanju raka pa imajo lizosomski Katepsini. Medtem ko so pri raku pomembni zunajcelični Katepsini, ki tumor dosežejo preko infiltrirajočih imunskih celic, ki v primerjavi z drugimi celicami izražajo več Katepsinov, so pri apoptozi pomembni znotrajcelični Katepsini. Ti imajo poglavitno vlogo tudi pri avtofagiji, ključnem procesu za dotok metabolnih substratov in preživetju rakavih celic. Terapevtski potencial lizosomskih Katepsinov tako temelji predvsem na njihovi nepogrešljivosti pri omenjenih procesih, vendar molekularni mehanizmi in vloga lizosomskih Katepsinov niso razjasnjeni. Veliko zanimanja je tudi za identifikacijo fizioloških substratov Katepsinov.

V sodelovanju z Univerzo v Britanski Kolumbiji smo preučevali vlogo cisteinskih Katepsinov pri procesiranju kemotaktičnih citokinov, t. i. kemokinov. Kemokini uravnavajo migracijo celic in usmerjajo različne imunske celice do vnetnih mest. Uravnavanje delovanja kemokinov poteka na nivoju posttranslacijskih proteolitskih cepitev, vendar o vlogi cisteinskih Katepsinov pri procesiranju kemokinov ni veliko znanega, Ugotovili smo, da cisteinski Katepsini B, K, L in S pri nevtralnem pH večinoma inaktivirajo ali celo razgradijo kemokine CXCL9, 10, 11 in 12, medtem ko kemokine CXCL1, 2, 3, 5 in 8 cepijo specifično na N koncu pred ELR motivom ter tako tvorijo agonistične oblike, kar smo potrdili na celičnih testih aktivacije kemokinskih receptorjev in mobilizacije kalcija. S to študijo smo pokazali, da so cisteinski Katepsini med drugim pomembni tudi pri uravnavanju aktivnosti kemokinov tako med vnetjem kot tudi med različnimi patofiziološkimi pogoji (članek poslan v tisk v 2014; minor revision v reviji J Biol Chem).

Pomembno orodje za sledenje aktivnosti proteaz v celicah in in vivo so sonde za spremljanje aktivnosti (activity-based probes). Takšne sonde so posebej primerne za diagnostične namene, saj omogočajo ne samo sledenje aktivnosti proteaz, ampak tudi validacijo učinkovitosti različnih zdravilnih učinkovin na bazi inhibitorjev. Skupaj s sodelavci iz

tujine (EMBL, Sanofi, Univerza v Zurichu) smo razvili več takšnih sond, med katerimi se je najbolj izkazala lipidirana sonda za spremljanje aktivnosti katepsina S. Da je sonda selektivna za katepsin S smo pokazali na celičnih testih v prisotnosti inhibitorja katepsinov, medtem ko smo na in vivo modelu raka dojke pokazali, da je sonda primerna tudi za neinvazivno diagnostično snemanje (Hu et al., 2014).

Eden od ciljev projekta je bil pojasniti tudi mehanizem delovanja t. i. lizosomotropičnih reagentov (spojin, ki se kopičijo v lizosomih in drugih kisljih veziklih kot so pozni endosomi in hibridni organeli; Repnik et al., 2014) in s tem njihov potencial za uporabo pri zdravljenju raka. Lizosomotropični reagenti lahko po kopičenju v kisljih veziklih razvijejo membranolitične oziroma detergentom podobne lastnosti, kar sproži t. i. permeabilizacijo lizosomske membrane (*angl.* lysosomal membrane permeabilization – LMP) in s tem izliv vsebine kisljih veziklov v citosol. Lizosomotropične reagente, ki povzročijo LMP, imenujemo lizosomotropični detergenti.

Naša skupina je v preteklosti odločilno prispevala k poznavanju mehanizma delovanja lizosomotropnega detergenta, dipeptidnega estra LLOMe, in prav te študije so omogočile tudi določitev lizosomske poti apoptoze (Cirman et al., 2004; Droga-Mazovec et al., 2008; Repnik et al., v pripravi). Lizosomotropični detergenti imajo velik potencial pri zdravljenju raka, saj smrt rakavih celic sprožijo na dva načina. Katepsini, ki se sprostijo iz lizosomov in poznih endosomov, sprožijo lizosomsko pot apoptoze preko cepitve proapoptotske molekule Bid ter razgradnje antiapoptotskih Bcl-2 in IAP proteinov (Cirman et al., 2004; Droga-Mazovec et al., 2008). Poleg tega pa destabilizacija lizosomov in poznih endosomov onemogoči zadnjo stopnjo procesa avtofagije in s tem dotok metabolnih substratov do tumorja ter odstranitev poškodovanih mitohondrijev, ki so ključni za normalno delovanje tumorskih celic, ter proapoptotskih proteinov (Groth-Pedersen et al., 2007; Repnik et al., 2012). Število spojin s potencialnimi lastnostmi lizosomotropičnega detergenta še vedno narašča, vendar so mehanizmi njihovega delovanja velikokrat slabo pojasnjeni, pogosto pa je uporabljen tudi napačen metodološki pristop. Leta 2013 smo pokazali, da siramezin, za katerega so poročali, da deluje kot lizosomotropični detergent (Ostenfeld et al., 2005; Ostenfeld et al., 2008), dejansko ni detergent, vendar sproži celično smrt preko destabilizacije mitohondrijev, neodvisno od LMP in katepsinov, kljub povišanju pH kisljih veziklov (Hafner Česen et al., 2013). Na področju lizosomotropičnih reagentov je še veliko nejasnosti, zato smo pripravili tudi protokol določanja LMP, ki bo pri odpravi podobnih nesporazumov o tovrstnih spojinah nedvomno v veliko pomoč (Repnik et al., 2015, v tisku).

Z enakim metodološkim pristopom smo preučili tudi mehanizem delovanja N-dodecilimidazola (NDI) in sfingozina, za katera so poročali, da delujeta kot lizosomotropična detergenta, vendar njun mehanizem delovanja še ni bil natančno pojasnjen. Poskuse smo izvedli na dveh celičnih modelih; HaCaT (človeški imortalizirani keratinociti) in U-87

MG (človeški glioblastom-astroцитom). Pokazali smo, da se na NDI izbrani celični liniji primerljivo odzivata ter, da so koncentracije NDI, ki sprožijo smrt celic, med 20 in 30 $\mu\text{g/ml}$. Inhibitor kaspaz Z-VAD-FMK je v primeru celic HaCaT učinkovito zmanjšal smrtnost, medtem ko pri celicah U-87 MG ni imel učinka. Lipofilni antioksidant α -tokoferol pa je učinkovito zmanjšal smrtnost v primeru celic U-87 MG. Inhibitor cisteinskih katepsinov E-64d v primeru tretiranja z NDI ni imel učinka pri nobeni od testiranih celičnih linij. Na drugi strani pa so bile celice U-87 MG manj občutljive na sfingozin kot celice HaCaT. V primeru celic U87-MG so smrt sprožile koncentracije sfingozina med 60 in 90 μM , medtem ko so v primeru celic HaCaT smrt sprožile koncentracije med 30 in 60 μM . Predtretiranje z α -tokoferolom je v primeru obeh linij imelo pozitiven učinek na preživetje, poleg tega pa sta le v primeru celic U-87 MG pozitiven učinek pokazala tudi Z-VAD-FMK in E-64d. Nadalje smo pokazali, da sta tako NDI kot sfingozin povzročila takojšen dvig lizosomskega pH, brez LMP (do 1 h), saj je bila aktivnost katepsinov v citosolu zanemarljiva glede na celokupno aktivnost katepsinov. Na podlagi teh rezultatov in primerjave s pozitivno kontrolo (LLOMe) smo zaključili, da spojini verjetno ne delujeta kot lizosomotropična detergenta. Nadalje smo želeli preveriti, kakšen vpliv imata spojini na mitohondrije. Ugotovili smo pokazali, da NDI in sfingozin, za razliko od LLOMe, povzročita takojšnje porušenje mitohondrijskega membranskega potenciala (MMP) pri obeh testiranih celičnih linijah. Poškodbe mitohondrijev smo potrdili tudi s pomočjo transmisijskega elektronskega mikroskopa (TEM), saj smo opazili povečanje in porušenje strukture mitohondrijskih krist. Poleg tega smo pokazali, da tako NDI in sfingozin kot tudi LLOMe sprožijo nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), vendar sklepamo, da so drugotnega pomena in ne primarni vzrok smrti. Nastanejo verjetno kot posledica poškodbe membrane mitohondrija ter prekinitve dihalne verige. Na podlagi podrobnih kinetičnih študij ter analiz rezultatov smo prišli do zaključka, da glavna tarča NDI in sfingozina niso lizosomi, temveč mitohondriji, katerih poškodba vodi v neizogibno smrt celice.

V sodelovanju s podjetjem Acies Bio smo validirali tetraciklinski antibiotik kelokardin (CAB1600) ter njegov analog (CAB1601), ki so ju pripravili z uporabo biosintetskega inženiringa in metabolnih inženirskih pristopov. Zanimivi so predvsem učinki analoga kelokardina, saj so že preliminarni rezultati pokazali toksičen vpliv na rakavo celično linijo in s tem velik potencial za zdravljenje raka. V naši skupini smo želeli analizirati citotoksičnost obeh spojin ter natančno analizirati njun mehanizem delovanja na celičnem modelu. Pri delu smo uporabljali trajno celično linijo človeškega glioblastoma-astrocitoma U-87 MG ter nerakavo, trajno celično linijo človeških imortaliziranih keratinocitov HaCaT. Vendar smo po meritvah absorpcijskih in emisijskih spektrov obeh spojin ugotovili, da imata preučevani spojini absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 460 nm, kar onemogoča uporabo testov s fluorokromi, ki za vzbujanje potrebujejo enako valovno dolžino. Žal

večina testov za analizo mehanizma delovanja spojin, vključno z meritvami preživetja celic ter integritete organelov, temelji na osnovi pretočne citometrije, ki pa je v našem primeru nismo mogli uporabiti, saj oddelčni pretočni citometer vsebuje le laser za vzbujanje z valovno dolžino 488 nm. Tako je bil za preučevanje citotoksičnosti primeren le metabolni test MTT (meritev aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze), saj se pri tem testu meri absorbanca pri valovnih dolžinah 570 in 690 nm. Pomembno pa se je zavedati tudi omejitev metabolnih testov, saj s pomočjo tovrstnih testov ne moremo razlikovati med citotoksičnostjo in citostatičnostjo, prav tako so ti testi odvisni od števila celic.

Rezultati testa MTT so pokazali, da kelokardin do koncentracije 25 µg/ml ne zmanjša aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze, saj je ta večinoma enaka aktivnosti kontrole. Nasprotno pa analog kelokardina zmanjša dehidrogenazno aktivnost celic že pri koncentraciji 5 µg/ml, pri 20 µg/ml pa ni mogoče zaznati nobene aktivnosti več. Pokazali smo, da se celični liniji HaCaT in U-87 MG enako odzivata na testirani spojin, kar pomeni, da analog kelokardina ne deluje selektivno le na rakave celice, kar zmanjša njegov potencial za uporabo pri zdravljenju raka. Da pa bi z gotovostjo govorili o selektivnosti delovanja spojine, bi bilo potrebno poskuse izvesti še na primarni celični liniji. Nadalje nas je zanimalo, če inhibitor cisteinskih katepsinov E-64d, inhibitor kaspaz Z-VAD-FMK, inhibitorja nekroptoze nekrostatin-1 in -5, ter lipofilni antioksidant α-tokoferol in hidrofilni antioksidant N-acetilcistein preprečijo oziroma zmanjšajo vpliv analoga kelokardina. Rezultati testa MTT so pokazali, da noben od testiranih inhibitorjev oziroma antioksidantov ni imel signifikantnega vpliva na delovanje analoga. Testirane celice HaCaT smo analizirali tudi pod svetlobnim mikroskopom in ugotovili, da so celice pri koncentraciji analoga 20 µg/ml sicer zaokrožene, vendar še vedno pritrjene, torej še niso mrtve, medtem ko je test MTT pokazal signifikantno zmanjšanje aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze. Ti rezultati kažejo, da tudi v našem primeru ni korelacije med rezultati testa MTT in dejanskim preživetjem celic. V nasprotju z analogom kelokardina pa kelokardin ni kazal znakov toksičnosti pri testiranih koncentracijah (do 25 µg/ml). Z metodo štetja celic pa smo ugotovili, da koncentracije kelokardina med 15 in 25 µg/ml signifikantno zmanjšajo proliferacijo celic po 24 in 48 h. Kljub omenjenim težavam menimo, da smo prišli do pomembnih dognanj in zaključkov o kelokardinu in njegovem analogu, ki bodo nedvomno koristili pri sintezi novih tovrstnih spojin z še učinkovitejšim ter selektivnejšim delovanjem.

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

Menim, da je bil projekt v glavnem realiziran.

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

Kakšnih večjih sprememb ni bilo.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	27111975	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Siramezin sproži celično smrt preko destabilizacije mitohondrijev in ne lizosomov
		ANG	Siramesine triggers cell death through destabilisation of mitochondria, but not lysosomes
	Opis	SLO	V starejših objavah so pokazali, da lahko siramezin sproži smrt rakavih celic in ima zato velik potencial pri zdravljenju, vendar njegov mehanizem delovanja v celici do sedaj še ni bil pojasnjen. V naši študiji smo pokazali, da je smrt celic HaCaT, sproženo s siramezinom ($\geq 20 \mu\text{M}$), spremljala značilna apoptotska morfologija, vključno z aktivacijo kaspaz, porušenjem mitohondrijskega membranskega potenciala (MMP) ter iztokom citokroma c v citosol. Za razliko od celic HaCaT pa pri celicah U-87 MG apoptotskih značilnosti nismo zaznali, pokazali pa smo, da pride do porušenja MMP. Pri vseh testiranih koncentracijah siramezina ($5 - 40 \mu\text{M}$) je prišlo do dviga pH lizosomov brez permeabilizacije membrane lizosomov (LMP) in iztoka lizosomskih hidrolaz v citosol. Lipofilni antioksidant α -tokoferol je za razliko od hidrofilnega antioksidanta N-acetilcisteina učinkovito preprečil celično smrt in porušenje MMP, ni pa imel vpliva na pH lizosomov. Nižje koncentracije siramezina od $15 \mu\text{M}$ so smrt celic sprožile kasneje, po dveh dneh ali več, kar je verjetno posledica metabolnega in energetskega neravnovesja zaradi napak v endocitotski poti, znotrajceličnem razmeščanju veziklov in ne posledica določenega molekularnega dogodka. V študiji smo pokazali, da ima siramezin več različnih tarč v celici in da verjetno ne deluje le preko sigma-2 receptorjev.
		ANG	A sigma-2 receptor agonist siramesine has been shown to trigger cell death of cancer cells and to exhibit a potent anticancer activity in vivo. However, its mechanism of action is still poorly understood. We show that siramesine can induce rapid cell death in a number of cell lines at concentrations above $20 \mu\text{M}$. In HaCaT cells, cell death was accompanied by caspase activation, rapid loss of mitochondrial membrane potential (MMP), cytochrome c release, cardiolipin peroxidation and typical apoptotic morphology, whereas in U-87MG cells most apoptotic hallmarks were not notable, although MMP was rapidly lost. In contrast to the rapid loss of MMP above $20 \mu\text{M}$ siramesine, a rapid increase in lysosomal pH was observed at all concentrations tested ($5-40 \mu\text{M}$); however, it was not accompanied by lysosomal membrane permeabilisation (LMP) and the release of lysosomal enzymes into the cytosol. The lipophilic antioxidant α -tocopherol, but not the hydrophilic antioxidant N-acetyl-cysteine, considerably reduced cell death and destabilisation of mitochondrial membranes, but did not prevent the increase in lysosomal pH. At concentrations below $15 \mu\text{M}$, siramesine triggered cell death after 2 days or later, which seems to be associated with a general metabolic and energy imbalance due to defects in the endocytic pathway, intracellular trafficking and energy production, and not by a specific molecular event. Overall, we show that cell death in siramesine-treated cells is induced by destabilisation of mitochondria and is independent of LMP and the release of cathepsins into the cytosol.
	Objavljeno v		Nature Publishing Group; Cell death & disease; 2013; Vol. 4; str. e818-1-e818-13; Impact Factor: 5.177; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 4.89; WoS: DR; Avtorji / Authors: Hafner Česen Maruša, Repnik Urška, Turk Vito, Turk Boris
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

2.	COBISS ID		26621479	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Endolizosomski sistem v celični smrti in pri preživetju celic	
		ANG	The endolysosomal system in cell death and survival	
	Opis	SLO	V preglednem članku smo povzeli pomen in vlogo endocitotske poti v celici. Endocitotska pot je pomembna za vnos snovi iz celičnega mikrookolja ter razgradnjo snovi s pomočjo različnih hidrolaz. Hidrolaze, še posebej cisteinske proteaze pa lahko sprožijo tudi apoptozo, v kolikor pride do njihovega iztoka v citosol. Poznamo tudi precej dolg seznam spojin za katere so poročali, da povzročijo permeabilizacijo lizosomske membrane in s tem sprožijo notranjo pot apoptoze. Take spojine imajo velik terapevtski potencial pri zdravljenju raka. Poleg endocitotske poti pa material namenjen za razgradnjo pride tudi preko avtofagije. Z razgradnjo poškodovanih organelov in drugih molekul celica reciklira material za sintezo novih molekul in tako avtofagija s sistemom endocitotske poti učinkovito kljubuje različnim apoptotskim dražljajem.	
		ANG	The endocytic pathway is a system specialized for the uptake of compounds from the cell microenvironment for their degradation. It contains an arsenal of hydrolases, including proteases, which are normally enclosed in membrane-bound organelles, but if released to the cytosol can initiate apoptosis signaling pathways. Endogenous and exogenous compounds have been identified that can mediate destabilization of lysosomal membranes, and it was shown that lysosomal proteases are not only able to initiate apoptotic signaling but can also amplify the apoptotic pathways initiated in other cellular compartments. The endocytic pathway also receives cargo destined for degradation via the autophagic pathway. By recycling energy and biosynthetic substrates, and by degrading damaged organelles and molecules, the endocytic system assists the autophagic system in resisting apoptotic stimuli. Steps leading to lysosomal membrane permeabilization and subsequent triggering of cell death as well as the therapeutic potential of intervention in lysosomal membrane permeabilization are discussed.	
	Objavljeno v		Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor perspectives in biology; 2013; Vol. 5, no. 1; str. a008755-1-a008755-14; Impact Factor: 8.226; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 4.89; A'': 1; A': 1; WoS: DR; Avtorji / Authors: Repnik Urška, Hafner Česen Maruša, Turk Boris	
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID		27806759	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Permeabilizacija lizosomskih membran in celična smrt	
		ANG	Lysosomal membrane permeabilization in cell death	
	Opis	SLO	Podan je pregled znanja na področju LMP in njenih posledic za celično smrt. Poleg tega je podan kritičen pogled na sedanje koncepte in uporabljene metodološke pristope.	
		ANG	In this article an overview of the current knowledge about LMP and its consequences for cell death is given. In addition, a critical view on the current concepts and methodologies used is presented.	
	Objavljeno v		Elsevier; Mitochondrion; 2014; Vol. 19, prt. A; str. 49-57; Impact Factor: 3.524; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.723; WoS: DR, KM; Avtorji / Authors: Repnik Urška, Hafner Česen Maruša, Turk Boris	
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek	
4.	COBISS ID		27739175	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	In vivo vizualizacija mišjih tumorjev z lipidiranim substratom katepsina S	

		ANG	In vivo imaging of mouse tumors by a lipidated cathepsin S substrate
	Opis	SLO	Za lipidirane FRET sonde za proteaze je bilo pokazano, da se lahko internalizirajo v tarčne celice in omogočijo detekcijo proteaz. V tem delu smo razvili nepeptidno FRET sondo za katepsin S, proteazo, ki jo izločajo makrofagi v tumorskem mikrokolju. Pokazali smo, da katepsin S uspešno in selektivno cepi sondo tako v celičnem modelu kot in vivo v mišjem modelu raka, pri čemer se je signal sonde akumuliral pretežno v tumorskem tkivu in ne v organih kot npr. jetra in pljuča. Ta sonda tako predstavlja obetaven prototip za detekcijo tumorjev pri ljudeh v prihodnosti.
		ANG	Lipidated protease FRET probes were previously shown to get internalized by target cells releasing the protease of interest. Here we introduce a lipidated, nonpeptidic FRET probe for cathepsin S, a protease secreted by macrophages in the tumor environment. We show that in cultured cells as well as in a grafted tumor mouse model, the probe is successfully cleaved and in the mouse is accumulated in the tumor tissue with little signal in organs such as liver and lung. The probe is therefore a promising prototype tool for detecting tumors in humans in the future.
	Objavljeno v		Wiley-VCH; Angewandte Chemie; 2014; Vol. 53, issue 29; str. 7669-7673; Impact Factor: 11.336; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.395; A'': 1; A': 1; WoS: DY; Avtorji / Authors: Hu Hai-Yu, Vats Divya, Vizovišek Matej, Kramer Lovro, Germanier Catherine, Ulrich Wendt K., Rudin Markus, Turk Boris, Plettenburg Oliver, Schultz Carsten
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
5.	COBISS ID		26071079 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Povišano izražanje stefina B v jedru T98G astrocitomskih celic upočasni aktivacijo kaspaz
		ANG	Increased expression of stefin B in the nucleus of T98G astrocytoma cells delays caspase activation
	Opis	SLO	Stefin B (cistatin B) je endogeni inhibitor cisteinskih proteaz, ki se nahaja v jedru ali citosolu. Mutacije, povezane z izgubo funkcije gena za stefin B, so bile najdene pri pacientih z Unverricht-Lundborgovo boleznijo (EPM1). Že prej smo pokazali, da so timociti izolirani iz miši z izbitim genom za stefin B, bolj občutljivi na indukcijo apoptoze z inhibitorjem protein kinaze C (PKC) staurosporinom (STS) kot kontrolne celice iz miši divjega tipa. Poleg tega smo pokazali, da je povečana ekspresija stefina B v jedrih T98G astrocitomskih celic upočasnila potek celičnega cikla skozi S fazo. V tej študiji pa smo preverili, ali je za pospešeno apoptozo v celicah iz miši z izbitim genom za stefin B odgovoren citosolni ali jedrni stefin B. Tako smo pokazali, da je samo povečana ekspresija stefina B v jedru ne pa tudi v citosolu, povezana z zakasnjeno aktivacijo kaspaz-3 in -7. Predinkubacija celic s splošnim inhibitorjem kaspaz z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluorometilketonom je popolnoma preprečila aktivacijo kaspaz, medtem ko predinkubacija celic z inhibitorjem katepsinov in kalpainov (2S,3S)-trans-epoxysuccinyl-leucylamido-3-methyl-butane etil estrom pa ni preprečila aktivacije kaspaz. Tako sklepamo, da je za zakasnjeno aktivacijo kaspaz v T98G astrocitomskih celic odgovoren stefin B v jedru, da pa je proces neodvisen od inhibicije katepsinov.
			Stefin B (cystatin B) is an endogenous inhibitor of cysteine proteinases localized in the nucleus and the cytosol. Loss-of-function mutations in the stefin B gene (CSTB) gene were reported in patients with Unverricht-Lundborg disease (EPM1). Our previous results showed that thymocytes isolated from stefin B-deficient mice are more sensitive to apoptosis induced by the protein kinase C (PKC) inhibitor staurosporin (STS) than the wild-type control cells. We have also shown that the increased expression

		of stefin B in the nucleus of T98G astrocytoma cells delayed cell cycle progression through the S phase. In the present study we examined if the nuclear or cytosolic functions of stefin B are responsible for the accelerated induction of apoptosis observed in the cells from stefin B-deficient mice. We have shown that the overexpression of stefin B in the nucleus, but not in the cytosol of astrocytoma T98G cells, delayed caspase-3 and -7 activation. Pretreatment of cells with the pan-caspase inhibitor z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone completely inhibited caspase activation, while treatment with the inhibitor of calpains- and papain-like cathepsins (2S,3S)-trans-epoxysuccinyl-leucylamido-3-methyl-butane ethyl ester did not prevent caspase activation. We concluded that the delay of caspase activation in T98G cells overexpressing stefin B in the nucleus is independent of cathepsin inhibition.
	Objavljeno v	Frontiers Research Foundation; Frontiers in molecular neuroscience; 2012; Vol. 5; str. 093-1-093-6; Avtorji / Authors: Sun Tao, Turk Vito, Turk Boris, Kopitar-Jerala Nataša
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

	Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID	27208999	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Lizosomotropne spojine: od mitohondrijev odvisne ali neodvisne poti do celične smrti?
		ANG	Lysosomotropic compounds
	Opis	SLO	V tem predavanju so bili predstavljeni najnovejši rezultati na področju lizosomotropnih spojin, kot npr. LeuLeuOMe, siramezina in N-dodecil imidazola. Z izjemo LeuLeuOMe, ki je edini pravi lizosomotropni detergent, ostale spojine sprožijo celično smrt verjetno preko destabilizacije mitohondrijev.
		ANG	In this lecture the latest results obtained with several lysosomotropic compounds, including LeuLeuOMe, siramesine and N-dodecyl imidazole, were presented. With the exception of LeuLeuOMe, which is the only true lysosomotropic detergent, all other compounds seem to trigger cell death through mitochondria.
	Šifra	B.04	Vabljen predavatelj
	Objavljeno v	Karolinska Institutet; General information, scientific program, book of abstracts; 2013; Avtorji / Authors: Turk Boris	
	Tipologija	1.10 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (vabljen predavatelj)	
2.	COBISS ID		Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO	Članstvo v Academia Europea (London)
		ANG	Membership in Academia Europea (London)
	Opis	SLO	Prof. Boris Turk je bil leta 2013 izvoljen za člana ene najuglednejših tujih akademij, kar je nedvomno veliko priznanje tako za raziskovalca kot za Slovenijo.
		ANG	Prof. Boris Turk was in 2013 elected for a member of one of the most renowned international academies, which is clearly a major recognition for both the researcher and Slovenia
	Šifra	E.02	Mednarodne nagrade

3.	Objavljeno v		spletna stran Academia Europea	
	Tipologija		3.25 Druga izvedena dela	
	COBISS ID		3840104	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Navodila za uporabo in interpretacijo metod za spremljanje avtofagije	
		ANG	Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy	
	Opis	SLO	V tem članku, ki kot soavtorje vključuje vse pomembne raziskovalce na področju avtofagije v svetu, sta podana podroben in kritičen pregled metod, ki se uporabljajo na področju avtofagije, in navodila za interpretacijo rezultatov. Zato je za nas zelo pomembno, da nas je srenja uvrstila med pomembne raziskovalne skupine na področju.	
		ANG	In this article, which includes as the coauthors all the important people working in the field of autophagy, a detailed critical overview of the methods used in autophagy is given, together with the guidelines to results interpretation. It is therefore very important for us that the society considers us as important research group.	
	Šifra		F.31 Razvoj standardov	
	Objavljeno v		Landes Bioscience; Autophagy; 2012; Vol. 8, Iss. 4; str. 445-544; Impact Factor: 12.042; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 4.723; A'': 1; A': 1; WoS: DR; Avtorji / Authors: Klionsky Daniel J., Gregorc Aleš, Turk Boris	
	Tipologija		1.02 Pregledni znanstveni članek	
4.	COBISS ID		271051520	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO	Vloga siramezina pri sprožitvi celične smrti in primerjava z drugimi lizosomotropičnimi reagenti	
		ANG	The effect of siramesine on cell death pathway and comparison to other lysosomotropic reagents	
	Opis	SLO	V okviru svoje doktorske disertacije je Maruša Hafner Česen proučevala mehanizem delovanja različnih lizosomotropnih spojin, pri čemer je bil glavni poudarek na siramesinu. Čeprav je ugotovila, da vse proučevane spojine sprožijo celično smrt, je odkrila, da samo LeuLeuOMe deluje kot lizosomotropni detergent.	
		ANG	In her doctoral dissertation Maruša Hafner Česen focused on understanding of the mechanism of action of several lysosomotropic compounds with major focus on siramesine. Although all of the compounds were found to trigger cell death, only LeuLeuOMe was found to act as a lysosomotropic detergent.	
	Šifra		D.09 Mentorstvo doktorandom	
	Objavljeno v		Doktorska disertacija Maruše Hafner Česen; MPŠ 2013	
	Tipologija		2.08 Doktorska disertacija	

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine²

Člani projektne skupine smo imeli vabljen predavanja tako na mednarodnih konferencah kot na tujih univerzah. Vodili smo sekcije na mednarodnih srečanjih in sodelovali pri organizaciji več kongresov v okviru organizacijskih ali programskih odborov, vključno s kongresi European Cell Death Organisation (ECDO) v Rimu 2012, v Parizu 2013 in v Heraklionu 2014, ter pri organizaciji EMBO workshopa Mitochondria, Apoptosis, Cancer v Stockholmu 2013. Poleg tega pa so naša dela dosegla zelo veliko odmevnost, saj so bila dela vodje projektne skupine prof. B. Turka v obdobju 2011-2014 citirana več kot 2500-krat, kar kaže na znanstveno odličnost

raziskav programske skupine.

V tem obdobju smo tudi uspešno sodelovali v Centrih odličnosti CIPKeBiP (Dušan Turk), ki je bil tudi partner projekta, in Nanoznanosti in Nanotehnologije (Dragan Mihajlović) ter v okviru Kompetenčnega centra Brin.

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

9.1. Pomen za razvoj znanosti²

SLO

Ta projekt je bil vsekakor močno relevanten za področje biomedicine. Lizosomi in lizosomske proteaze so že bili validirani kot tarče pri zdravljenju raka, več spojin, ki ciljajo lizosome in/ali lizosomske proteaze pa je tudi že v predkliničnem ali kliničnem testiranju. To velja tako za LeuLeuOMe, ki je vstopil v fazo 1 kliničnih testiranj, kot tudi za siramesin in antioksidante. Verjamemo, da je projekt odprl nove perspektive na področjih, kjer je bila dejanska vloga lizosomov in katapsinov nepoznana, slabo poznana ali pa kontroverzna kot npr. pri apoptozi pri od kaspaz neodvisni celični smrti. Znanje pridobljeno v okviru bo tako ne samo pomembno prispevalo k našemu razumevanju kompleksnih bioloških procesov, ampak bo dolgoročno tudi ključno za biomedicinske raziskave pri razumevanju in razvoju novih strategij zdravljenja raka in ostalih hiperproliferativnih bolezni, ki temeljijo na modulaciji aktivnosti lizosomskih proteaz. Poleg tega je predlagani projekt nadgradil raziskave na področju celične biologije in molekularne medicine ter razširil tovrstna znanja na Odseku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo Instituta Jožef Stefan.

ANG

This project was certainly of high biomedical relevance. Lysosomes and lysosomal proteases have already been validated as relevant targets for cancer treatment, whereas several compounds targeting lysosomes and/or lysosomal proteases are already in preclinical or clinical testing. This is true not only for LeuLeuOMe, which entered Phase I clinical trials, but also for siramesine and various antioxidants. We believe that we have opened new avenues in the areas where the exact roles of lysosomes and cathepsins and their signaling pathways were unknown, largely unclear or controversial such as in the caspase independent cell death. The gained knowledge will thus not only significantly contribute to our understanding of the complex biological phenomena, but will in long run also be instrumental in biomedical research to understand and develop novel strategies to combat cancer and other hyperproliferative diseases based on modulation of the activities of lysosomal proteases. In addition, the project strengthened the research at the Department of Biochemistry and Molecular Biology at Jožef Stefan Institute in the field of cell biology and molecular medicine.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Rak je ena od glavnih bolezni razvitega sveta. Terapevtsko odstranjevanje tumorskih celic s stimulacijo apoptoze in inhibicijo avtofagije ter uporaba proteaznih inhibitorjev so trenutno med najbolj perspektivnimi področji pri zdravljenju raka. Tako bodo imeli dobljeni rezultati projekta velik pomen pri vrednotenju lizosomov in cisteinskih katapsinov kot možnih terapevtskih tarč pri zdravljenju raka. Ta projekt je ob nadaljevanju raziskav v reprezentativnih živalskih tumorskih modelih velikega pomena pri vrednotenju novih zdravil na predklinični ravni, kar je zagotovo zelo zanimivo za farmacevtsko industrijo v Sloveniji in v tujini. Zato lahko trdimo, da so bile raziskave sicer pretežno bazične narave, vendar imajo tudi uporabno komponento, zaradi česar jih lahko upravičeno uvrstimo med strateške bazične raziskave, saj so pri raziskavah sodelovali tudi sodelavci Acies d.o.o. Poleg tega je raziskovalno delo na projektu in v raziskovalni skupini nudilo izredne možnosti za študente, da so se seznanili z najnovejšimi tehnikami in področji, kot npr. proteomiko (na IJS je edini proteomski laboratorij v Sloveniji) in kemogenomiko (skupaj z Evropskimi in drugimi tujimi partnerji). Obe polji imata namreč zelo visoko mednarodno prioriteto, ker sta izrednega pomena za identifikacijo in validacijo tarč pri razvoju novih zdravil. Poleg tega pa so člani skupine dosegli široko mednarodno priznanje, kar je vse zelo pomembno za mednarodno promocijo Slovenije in s tem tudi za ohranitev narodne identitete.

ANG

Cancer is one of the most debilitating diseases of the developed world. Therapeutic removal of cancer cells by stimulating apoptosis and blocking autophagy, together with the use of protease inhibitors, are currently among the most perspective areas in cancer treatment. In addition, development of Thus, the results obtained will be highly relevant in evaluation of lysosomes and cysteine cathepsins as possible therapeutic and diagnostic targets in cancer. Continuation of the research in representative animal cancer models is therefore of high value for the evaluation of compounds at the preclinical level, which should be interesting for the pharmaceutical companies in Slovenia and abroad. Therefore we can say that although the research performed was largely basic research, it also has its applied component and can be classified as strategic basic research. This is strengthened by the fact that SME Acies d.o.o. was a partner in the project. Moreover, the work also offered great opportunity for students to be trained in the most advanced methods and areas, such as proteomics (at IJS in our Department we have the only proteomics lab in Slovenia), and chemogenomics together with European and other international partners. Both fields have namely high international priority as they are of extreme importance in target identification and validation during drug development. In addition, members of the project have received widespread international recognition, which is very important for the worldwide promotion of Slovenia and as such also for preservation of national identity of Slovenia.

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	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE

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

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

F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE

	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

Komentar

--

11.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	☐	☐	☐	☐	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☐	☐	☐	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☐	☐	☐	☐	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☐	☐	☐	☐	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☐	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	☐	☐	☐	☐	
G.02.07.	Večji delež izvoza	☐	☐	☐	☐	
G.02.08.	Povečanje dobička	☐	☐	☐	☐	
G.02.09.	Nova delovna mesta	☐	☐	☐	☐	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	☐	☐	☐	☐	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	☐	☐	☐	☐	
G.02.12.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	☐	☐	☐	☐	
G.03.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	☐	☐	☐	☐	

G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	☐	☐	☐	☐	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	☐	☐	☐	☐	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	☐	☐	☐	☐	
G.04.06.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
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	☐	☐	☐	☐	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	☐	☐	☐	☐	
G.09.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	

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 2014¹²**13.1. Izjemni znanstveni dosežek**

--

Objava raziskovalnega članka In vivo imaging of mouse tumors by a lipidated cathepsin S substrate v Angewandte Chemie; 2014; Vol. 53, issue 29; str. 7669-7673; Impact Factor: 11.336; Hu Hai-Yu*, Vats Divya*, Vizovišek Matej*, Kramer Lovro, Germanier Catherine, Ulrich Wendt K., Rudin Markus, Turk Boris**, Plettenburg Oliver**, Schultz Carsten**. Delo je bilo odraz zelo uspešne sodelave s sodelavci iz Sanofi Aventis in EMBL.

V tem delu smo razvili nepeptidno FRET sondo za katepsin S, proteazo, ki jo izločajo makrofagi v tumorskem mikrookolju. Pokazali smo, da katepsin S uspešno in selektivno cepi sondo tako v celičnem modelu kot in vivo v mišjem modelu raka, pri čemer se je signal sonde akumuliral pretežno v tumorskem tkivu in ne v organih kot npr. jetra in pljuča. Ta sonda tako predstavlja obetaven prototip za detekcijo tumorjev pri ljudeh v prihodnosti.

13.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

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:

Institut "Jožef Stefan"

Boris Turk

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana

13.3.2015

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/194

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

¹² Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2014 (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 priponko/-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/2015 v1.00a

FB-38-BF-00-3B-3F-D2-E1-15-4D-2B-4C-98-C5-1E-15-59-25-6E-78