



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	13-2258
Naslov projekta	Vloga cisteinskih katepsinov in kaspaz pri nevrodegeneraciji
Vodja projekta	14829 Veronika Stoka
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	4173
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	05.2009 - 04.2012
Nosilna raziskovalna organizacija	106 Institut "Jožef Stefan"
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)

2. Raziskovalno področje po šifrantu FOS¹

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

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta²

SLO

V normalnih možganih med staranjem in pri s starostjo povezanimi nevrodegenerativnimi obolenji so znane spremembe v lizosomski razgradnji, kar lahko vodi do agregacije proteinov. Neustrezno odstranjevanje proteinov lahko spremeni delovanje in funkcijo nevronov ali celo njihovo smrt. Med staranjem in pri mnogih nevrodegenerativnih

motnjah postane lizosomska membrana nestabilna in vsebina lizosomov, vključno s katepsini, se začne sproščati v citosol.

Raziskovalni projekt obravnava razumevanje lizosomalne poti apoptoze z večplastim vpogledom v proteinske mreže ter karakterizacijo dveh proteinov, katepsina F in ataksina-3, ki spadata med cisteinskih proteaze z papainu-podobnim zvijem polipeptidne verige ter sodelujeta v nevrodegeneraciji. Tudi je znano, da je katepsin F pri odraslih miših odgovoren za nevronalno ceroidno lipofuscinozo, medtem ko je ataksin-3 odgovoren za spinocerebelarno ataksijo tipa 3 (Machado-Joseph obolenje).

Na osnovi našega modela lizosomske poti apoptoze je bilo sprva vključenih 20 proteinov, nato pa smo zgradili biološko mrežo s 400 proteini (prva raven), ki je prikazala bolj celovit vpogled na ta kompleksen biološki sistem.

Od enajstih človeških cisteinskih katepsinov je katepsin F edini, ki ima N-terminalni podaljšek s cistatinu-podobno domeno. Raziskave so pokazale, da je N-terminalna skrajšana oblika tega encima, vključno z naravno skrajšano obliko (CatF|147-484), prisotna v agresomih, in je bila delno kolokalizirana z lizosomalnim markerjem LAMP-2 proteinom. Bioinformatična analiza pa je pokazala na prisotnost izvorno neurejenih regij ter regij z visoko nagnjenostjo k agregaciji človeškega katepsina F.

Nadalje so študije pokazale, da je ataksin-3 in njegove patološke variante z podaljšanimi poliglutaminskimi ponovitvami dober substrat za katepsine B, L in K. Po drugi strani kaspaze 3, 6 in 7 cepijo samo patološke variante. S N-terminalnim sekveniranjem je bilo ugotovljeno, da se ta cepitvena mesta razlikujejo od katepsinov. V SH-SY5Y celicah je bila potrjena kolokalizacija ataksina-3 z katepsinom L in s tem potrdili da je lahko ataksin-3 fiziološki substrat katepsina L. V istem celičnem modelu so bili detektirani tudi poliglutaminski agregati. Tako smo pridobili z uporabo različnih orodij strukturne bioinformatike nova spoznanja za razumevanje odnosa struktura-funkcija za človeški ataksin-3 ter njegove mutante.

Dobljeni rezultati doprinašajo k boljšemu razumevanju mehanizmov celične smrti in agregacije proteinov v nevronih, kar je velikega pomena za razvoj novih načinov zdravljenja in preprečevanja motenj.

ANG

During normal brain aging and in age-related neurodegenerative diseases are known changes in the lysosomal degradation which can lead to protein aggregation. Insufficient removal of defective proteins may lead to cell death, thus affecting the activity and function of neurons. During aging and many neurodegenerative diseases, the lysosomal membrane becomes fragile and the lysosomal content, including cathepsins, is released into the cytosol.

The research project deals with understanding the lysosomal pathway of apoptosis using a protein networks-based multilayered approach and the characterization of two proteins, cathepsin F and ataxin-3, which are cysteine proteases that share the papain-like fold and are involved in neurodegenerative diseases. It is known that in adult mice cathepsin F is responsible for neuronal ceroid lipofuscinosis, while ataxin-3 is responsible for spinocerebellar ataxia type-3 (Machado-Joseph disease).

Based on our model of a lysosomal pathway of apoptosis which initially included 20 proteins, we built-up a level 1 biological network with 400 proteins, which demonstrated a more comprehensive view into this complex biological system.

Of eleven human cysteine cathepsins, cathepsin F is the only one that has an extended N-terminal proregion, which contains a cystatin-like domain. Research has shown that the N-terminally truncated form of this enzyme (CATF | 147-484) accumulates in aggresomes and was partially colocalized with the lysosomal marker LAMP-2 protein. In addition, a bioinformatic analysis revealed the presence of natively disordered and aggregation-prone regions with a high fibrillation propensity within the human cathepsin F structure.

Furthermore, our studies have shown that ataxin-3 and its pathological variants with polyglutamine extended regions are good substrates for cathepsins B, L and K. On the other hand, caspase 3, 6 and 7 cleave only pathological variants. The cleavage sites from

the later differ from the cathepsin's cleavage sites as confirmed by N-terminal sequencing. In SH-SY5Y cells was confirmed the colocalization of ataxin-3 with cathepsin L, thus confirming that ataxin-3 is a physiological substrate of cathepsin L. In the same cellular model were also detected polyglutamine aggregates. Our understanding of the structure-function relationship of human ataxin-3 and its mutants was obtained using the different tools of structural bioinformatics lessons. Our understanding of structure-function relationship of human ataxin-3 and its mutants.

Overall, the obtained results contribute to a better understanding of the mechanisms of cell death and protein aggregation in neurons, which is of major importance for the development of new treatments and prevention of these diseases.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu³

Med normalnem staranjem in pri s starostjo povezanimi nevrodegenerativnimi obolenji, nastanejo spremembe v lizosomalni razgradnji. Tudi lizosomalna membrana postane nestabilna in pride do sproščanja lizosomalne vsebine vključno s katepsini, v citosol in posledično aktivacije apoptoze [1-4]. Neustrezno odstranjevanje proteinov lahko spremeni delovanje in funkcijo nevronov in/ali celo njihovo smrt. V procesu nevrodegeneracije pride tudi do agregacije proteinov.

V raziskovalnem projektu smo se osredotočili na razumevanje lizosomalne poti apoptoze z večplastnim vpogledom v proteinske mreže ter karakterizacijo dveh proteinov, ki kažeta papainu-podobno zvitje in sodelujeta pri nevrodegeneraciji. Uporabili smo katepsin F, za katerega je bilo ugotovljeno, da je pri odraslih miših odgovoren za nevronalno ceroidno lipofuscinozo ter ataksin-3, ki je odgovoren za spinocerebelarno ataksijo tipa 3 (Machado-Joseph obolenje).

• Biološka mreža za lizosomsko pot apoptoze

Na osnovi našega modela lizosomske poti apoptoze [1] smo zgradili biološko mrežo, ki odraža celovit vpogled na ta kompleksen biološki sistem. Na osnovi naših raziskav na različnih celičnih modelih [5] je bilo v mrežo sprva vključenih 20 proteinov, na koncu pa smo zgradili mrežo s 400 proteini. Topologijo mreže smo določili z različnimi topološkimi merili kot so povprečna stopnja (average degree), koeficient razvrščanja v skupine (clustering coefficient), značilna dolžina poti (characteristic path length) in premer (diameter). Trodimenzionalne strukture proteinskih kompleksov z visoko resolucijo ($< 4\text{\AA}$) so omogočile razvoj novega koncepta "strukturnih mrež proteinov" in s tem celoten ter večplasten pogled na kompleksne biološke sisteme [6]. Ta koncept je bil predstavljen v obliki predavanja na mednarodnem simpozij v Münchenu IKS 2009. Lizosomalna pot pa je bila predstavljena v obliki predavanja na mednarodnih kongresih FEPS 2009 ter ISCB Latin America 2010 (opis v točki 8.4).

• Študije povezane s katepsinom F

- *Lokalizacija ter kvantifikacija izražanja katepsina F v mišjih možganih*

S kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR) smo določili izražanje katepsina F med razvojem možganov: embrionalno (13d, 15d, 18d), 7 dni po rojstvu ter pri odraslih miših (5 tednov). Potrdili smo, da je katepsin F odsoten pri embrionalni stopnji v malih možganih, medtem ko pa se izraža pri embrionalnih stopnjah samo v telencefalonu/diencefalonu in rombencefalonu (hindbrain). V preostalem delu tkiva je bil katepsin F izražen pri vseh stopnjah razvoja, bodisi na konstantni ravni, oz. v srednjih možganih (midbrain), meduli in hrbtenjači. Opaženo je bilo povečano izražanje katepsina F 7 dni po rojstvu v korteksu, hipokampusu, talamusu, hipotalamusu, striatumu, ponsu in vohalni žarnici (olfactory bulb) za 2 do 3 krat.

Na proteinski ravni so bile ugotovljene z uporabo imunohistokemijskih metod na parafinskih rezinah visoke stopnje izražanja katepsina F v malih možganih, talamusu in korteksu. S kriorezinami pa smo potrdili izražanje katepsina F v jedru.

- Učinek prekomernega izražanja človeškega katepsina F ter njegove skrajšane oblike pri HEK- 293 celicah

Človeški katepsin F divjega tipa (katF) in njegove skrajšane oblike in sicer brez signalnega peptida (katF-465), brez cistatinske domene (katF-359) ter naravna skrajšana oblika (katF-338) so bile uspešno izražene v HEK-293 celicah. Prekomerno izražanje katF nima vpliva na preživetje celic, medtem ko so vse skrajšane oblike inducirale apoptozo, kar se razvidno iz 2-kratne povišane aktivnosti kaspaz. KatF se nahaja na veziklih, med tem ko se njegove skrajšane oblike nahajajo v citosolu v agresomih. Z uporabo različnih bioinformacijskih orodij smo pripravili 3D model proteina ter napovedali, da se neurejene regije nahajajo v fleksibilnih delih molekul in povezujejo globularne proteinske domene. To delo je zaključeno in publikacija "N-terminally truncated cathepsin F accumulates in aggresome-like inclusions and induces caspase activation" je bila poslana k tisk (Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.) in je v postopku revizije z upoštevanjem pripomb recenzentov).

• **Študije povezane z podaljšanjem homopolimeričnih aminokislinskih preostankov ter mehanizem tvorbe amiloidnih fibril**

Ataksin-3 vsebuje med drugim papainu-podobno 180 aminokislinsko domeno na N-terminalnem koncu molekule Josefin. Za ta protein in nekatere druge proteine je značilno, da vsebujejo številne ponovitve poliglutaminskih (poliQ) ali polialaninskih (poliA) aminokislinskih preostankov. Pri tem so bile pripravljene različne mutante obeh proteinov in sicer, poliQ ponovitve od 19 do 130 glutaminov pri ataksinu-3 in poliA ponovitev od 10 do 26 alaninov v primeru poliadenilate-povezan protein 2 (PABPN1) z namenom razumevanja lastnosti v patološkem stanju. S standardnimi postopki kloniranja smo ustvarili knjižnico ataksina-3 in sicer divjega tipa (Atx3- Q19), njegovih mutantov z različno dolgimi poliglutaminskimi regijami (Atx3-Q56 do Atx3- Q130) ter C-končnih mutantov ataksina-3 brez Josefinske domene (TFAtx3-Q19 do TFAtx3- Q122) v vektorjih za transfekcijo v sesalskimi celičnih linij (Atx3-Q19/pEGFP-N2, Atx3-Q56/pEGFP-N2, Atx3-Q59/pEGFP-N2, Atx3-Q82/pEGFP-N2) ter za izražanje rekombinantnih proteinov *E.coli* (Atx3-Q22/GST in Atx3-Q80/GST, TFAtx3-Q19/SUMO in TFAtx3-Q71/SUMO). Naše raziskave so vodile do naslednjih ugotovitev:

- Po izražanju in izolaciji Atx3-Q22/GST, Atx3-Q80/GST in Ub52/GST smo izvedli test aktivnosti obeh proteinov s substratom Ub-52, ter dokazali, da je Atx3 aktiven in v nativni konformaciji tudi s pripetim fuzijskim partnerjem GST.

- *In vitro* študije so pokazale da sta Atx3-Q22 ter Atx3- Q80 substrata za cisteinske katepsine. Z N-terminalnim sekveniranjem so bila določena aminokislinska zaporedja cepitvenih produktov ataksina-3 po cepitvah s katepsinom B (Ser76, Leu150), s katepsinom K (Ser66, Leu191) ter katepsinom L (Pro65, Leu148, Leu191, Glu239, Gln254).

- Cisteinski katepsini in kaspaze-3, -6 se razlikujejo pri cepitvi divjega tipa ataksina-3 (wtATX3) in ataksin-3 Q84 mutante. Kaspaza-6 in -7, kot tudi katepsina L in S cepita ATX3- Q84. Prav tako sta oba katepsina cepila wtATX3, medtem ko obe kaspazi nista imeli nobenega učinka na ta protein kot substrat.

- Nevronom podobne celice so bili pripravljene z 13-dnevno diferenciacijo z retinoično kislino po stabilni transfekciji celic SH-SY5Y, transfeciranih z Atx3-Q19 ter mutantom ataksina-3. Izražanje je bilo potrjeno z imunodetekcijo s protitelesi proti GFP. Nevronom podobne celice smo potrdili z imunodetekcijo s protitelesi proti nevronskega markerju-III-tubulin in uporabljene pri nadaljnjih raziskavah.

- Študije z uporabo SH-SY5Y celic so pokazale, da se ataksin-3 z majhnim številom ponovitev poliQ nahaja pretežno v citosolu, medtem ko se je ataksin-3 z 130 poliQ ponovitvami (ATX3- Q130) nahajal pretežno tudi v citosolu, manjši del pa v jedru. PABPN1 z 10 poliA ponovitvami (PABPN1-A10) je lokaliziran v jedru, kot tudi PABPN1 z 26 poliA ponovitvami (PABPN1- A26).

- Z imunodetekcijo s protitelesi proti fuzijskemu proteinu GFP smo potrdili uspešno

izražanje konstruktov ataksina-3 oz. Atx3-Q19 (68 kDa), Atx3-Q59 (87 kDa), Atx3-Q82 (90 kDa) in Atx3-Q130 (96 kDa).

- Transfekcija SH-SY5Y celic z ataksinom-3 in PABPN1 z različnimi dolžinami poliQ ter poliA ponovitvami ni pokazala bistvenega učinka po 24, 48 ali 72 urah z merjenjem kaspazne aktivnosti in z metodo pretočne citometrije (aneksinom V in propidium iodidom). Ti rezultati kažejo na to, da količina agregatov ni bila dovolj visoka, da pride do poškodbe celic in njihove smrti, ali pa da mutirani proteini do 72 ur niso bili toksični za celice. Posledično so bile celice tretirane tudi z uporabo nekaterih substanc pri nizkih koncentracijah, ki povzročajo stres, kot so staurosporin, vodikov peroksid, inhibitorji avtofagije in proteazom. Tudi v tem primeru niso bili opaženi posebni efekti, kar je razvidno iz primerjave ATX3-Q82 (patološka mutanta) in ATX3-Q19 (divji tip).

- Z pomočjo reagenta Mitotracker Red (Invitrogen) smo pokazali, da podaljšani poli-Q vplivajo na membrane mitohondrijev. Največji vpliv je imel C-terminalni fragment mutante TFAtx3-Q71, kar je skladno z nagnjenostjo k agregaciji.

- V SH-SY5Y celicah smo tudi potrdili kolokalizacija Atx3 in katepsinov. Opazili smo pretežno citoplazemsko pojavljanje Atx3 v razpršeni ali agregirani obliki. Atx3-Q80 je kolokalizirana z PDI-jem v endoplazmatskem retikulumu in ne v lizosomih (marker Lamp-2). Pri prehodno transfeciranih celicah je bil Atx3 delno kolokaliziran s katepsinom K, ne pa s katepsinom B. Pri stabilno transfeciranih in diferenciranih celicah SH-SY5Y nismo zaznali kolokalizacije Atx3 s katepsinom K, pač pa potrdili kolokalizacijo Atx3-Q80 s katepsinom L.

- V SH-SY5Y celicah smo tudi detektirali poliglutaminske agregate. Po 48 urami transfekciji smo potrdili, da TFAtx3Q80/GFP tvori v SDS netopne agregate, detektirane po imunodetekciji kot pikčast vzorec.

- Z uporabo različnih orodij strukturne bioinformatike smo pridobili nova spoznanja za razumevanje odnosa struktura-funkcija za človeški ataksin-3 ter njegove mutante do 130 poliQ ponovitvami. Poleg že prej omenjene papainu podobne domene (Josefin domene z 180 aminokislinami) vsebuje ataksin-3 še tri UIM ponovitve. Naši trodimenzionalni modeli so pokazali, da poliQ ponovitve predstavljajo fleksibilen podaljšani alfa-heliks v tem proteinu. Delo je zaključeno in magistrsko delo je zagovarjala kandidatka Nina Vidergar (opisano pod točko 8.1). Pri tej študiji sodelujemo tudi s prof. Shoichi Ishiuro z Univerze Tokio (Skupno delo v pripravi za tisk).

Prav tako, pa smo s to japonsko skupino proučevali nastanek amiloidnih fibril proteinov z različno dolgimi polialaninskimi regijami, s čimer smo želeli ugotoviti molekularne mehanizme, ki so značilni za nevrodegenerativne bolezni [7,8]. Z analizo oligomerizacije rumenega fluorescenčnega proteina (YFP) in GST kot fuzijskih proteinov z več kot 20 alaninskimi podaljškami smo ugotovili nestabilnost oligomeriziranih proteinov ter odpornost na razgradnjo z tripsinom. To predstavlja primeren model za študij bolezni povezanih s tvorbo polialaninov [7]. Polialaninski deli, ki vsebujejo več kot 23 ponovitev, pri interakciji z mitohondriji povzročijo sproščanje citokroma c v citosol in aktivacijo kaspaze-3 na način, ki je neodvisen od por MPTP. S tem novim mehanizmom citotoksičnosti polialaninskih delov bi morda lahko pojasnili patogenezo vseh polialaninskih-povezanih bolezni [8].

V času tega projekta smo objavili več publikacij (izbrane so opisane pod točko 7). Prav tako smo poročali o rezultatih naših raziskav na domačih in mednarodnih kongresih ter univerzah (izbrane so opisane pod točko 8). V tem obdobju je bilo opravljeno magistrsko delo (opisano pod točko 8.1) ter doktorsko delo kandidatke Martine Klarić z naslovom "Različno obnašanje katepsinov B in F pri apoptozi v nevronskih in glialnih celicah". Eksperimentalno delo je zaključeno, zagovor pa bo opravljen predvidoma letos. Doktorsko delo MR Barbare Jerič teče tretjo leto po začrtani poti (Kandidatka je prva avtorica publikacije ki je bila poslana v objavo in delo je opisano pod točko 5 - Študije povezane s katepsinom F).

- [1] Turk B., Stoka V. (2007) FEBS Lett. 581:2761-7.
- [2] Stoka V., Chen S.F., Turk V., Bredesen D.E. (2005) FEBS Lett. 579:6147-50.
- [3] Stoka V., Turk V., Bredesen D.E. (2006) FEBS Lett. 580:3739-45.
- [4] Stoka V., Turk V., Bredesen D.E. (2007) Neuromolecular Med. 9:255-63.
- [5] Droga-Mazovec G., Bojic L., Petelin A., Ivanova S., Romih R., Repnik U., Salvesen G.S., Stoka V., Turk V., Turk B. (2008) J. Biol. Chem. 283: 19140-50.
- [6] Stoka V., Turk V. (2010) Biol. Chem. 391:443-54.
- [7] Nojima J., Oma Y., Futai E., Sasagawa N., Kuroda R., Turk B., Ishiura S. (2009) J. Neurosci. Res. 87:2290-6.
- [8] Toriumi K., Oma Y., Mimoto A., Futai E., Sasagawa N., Turk B., Ishiura S. (2009) Genes Cells 14: 751-7.

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

Projekt je realiziran v celoti pri čemer so upoštevane nekatere spremembe opisane pod točko 6. Eksperimentalno delo je zaključeno, izbrane publikacije so opisane pod točko 7, ena publikacija z naslovom "N-terminally truncated cathepsin F accumulates in aggresome-like inclusions and induces caspase activation" je bila poslana za objavo v ugledno revijo Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res. (IF: 5.5), del rezultatov pa je še v pripravi za objavo (dve publikaciji – vsebina je opisana pod točko 5).

Med tekom teka projekta je bilo izvedeno:

- 1) magistrsko delo Nine Vidregar z naslovom "Razgradnja ataksina-3 in njegovih mutantov s cisteinskimi kathepsini in vloga fragmentov ataksina-3 pri Spinocerebelar ataksiji tipa 3", ki ga je uspešno zagovarjala 16.5.2012.
- 2) doktorsko delo MR Martine Klarić z naslovom "Različno obnašanje kathepsinov B in F pri apoptozi v nevronskih in glialnih celicah" (eksperimentalno delo je zaključeno, zagovor pa bo opravljen predvidoma letos).
- 3) doktorsko delo MR Barbare Jerič teče tretje leto po začetni poti (kandidatka je prva avtorica publikacije, ki je bila poslana v objavo in delo je opisano pod točko 5 - Študije povezane s kathepsinom F).

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

Predpostavljeni cilji so bili v glavnem doseženi. Vendar je v teku trajanja projekta prišlo do nekaterih sprememb, bodisi zaradi dobljenih eksperimentalnih rezultatov ali novih literaturnih podatkov. Pred iztekom projekta je izšla do sedaj najbolj pregledna objava z zvezi z nevronalno ceroidno lipofusinozo (NCL). Delo obravnava 360 mutacij osmih genov ter njihove klinične lastnosti [1]. Od tam je razvidno, da človeški kathepsin F ne ustreza genu CLN4, ki je odgovoren za nastanek Kufsovega obolenja, kot je bilo prvotno predpostavljeno na podlagi mišjega modela z izbitim genom CTSF-/- [2]. Zato smo naše delo preusmerili na biokemijsko karakterizacijo človeškega kathepsina F, njegovo vlogo v celičnih modelih, ter pri nevronalnemu razvoju na mišjem modelu, kot je opisano pod točko 5.

V času dela na projektu se je pokazalo, da je eksperimentalna validacija možnih substratov cisteinskih kathepsinov, kot je bila opisana v prijavi vlogi projekta pri delovnem sklopu 1.2 ter 2.9, dokaj zahtevna. Vsekakor pa naj omenimo, da nam je uspelo dobiti novo potencialno tarčo z uporabo bioinformatičnega pristopa (opisana v prijavi vlogi projekta pod delovnim sklopu 1.1) in sicer človeški ataksin-3, ki smo ga dokaj podrobno okarakterizirali (opisano pod točko 5).

Pri nevrodegeneraciji je nastanek amiloidnih fibril ključnega pomena. Zato smo le-te

razširili na ataksin-3 ter druge proteine s podaljšanimi homopolimernimi aminokislinskimi preostanki. Vzpostavljeno je bilo sodelovanje z mednarodno ugledno skupino prof. Shoichi Ishiure iz Univerze v Tokiju, katerega laboratoriji je postal Center odličnosti (opisano pod točko 5), s katerim smo imeli tudi skupni projekt HSFP (z naše strani Boris Turk).

Ne nazadnje pa je potrebno omeniti, da so bile težave znotraj sestave skupini zaradi predčasnega odhoda (31.8.2009) MR Martine Klarić (26451) ki je bila dodatno dalj časa odsotna zaradi bolezni, kot tudi dr. Mihe Andrejašiča (22282), ki zaključil delovno razmerje na IJS z 31.12.2009 ter dr. Urška Repnik (21560), ki je prekinila sodelovanje na projektu zaradi odhoda v tujino na podoktorski izpopolnjevanje. Kljub tem težavam, pa so bile obveznosti v zvezi z izvajanjem projekta izpolnjene z vključitvijo Nine Vidergar (29883 – zaključila študij z magisterjem 2012) ter MR Barbare Jerič (33349).

[1] Kousi M, Lehesjoki AE, Mole SE. (2012) Update of the mutation spectrum and clinical correlations of over 360 mutations in eight genes that underlie the neuronal ceroid lipofuscinoses. Hum. Mutat. 33:42-63.

[2] Tang C.H., Lee J.W., Galvez M.G., Robillard L., Mole S.E., Chapman H.A. (2006) Murine cathepsin F deficiency causes neuronallipofuscinosis and late-onset neurological disease. Mol. Cell Biol. 26:2309-16.

7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine

	Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID		25347879	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Lizosomi ter lizosomalni katepsini pri celični smrti	
		ANG	Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death	
	Opis	SLO	V tem delu smo podrobno opisali dvojno vlogo lizosomov ter lizosomalnih katepsinov pri dveh glavnih poteh celične smrti in sicer apoptozi ter avtofagiji. Destabilizacija lizosomske membrane s lizosomotropičnimi dražljaji je obetavna strategija ki ne bi samo preprečila avtofagijo, temveč tudi vzpodbudila apoptozo na začetku lizosomalne poti. Po drugi strani, okvarjena avtofagija in lizosomalna razgradnja povezana s povečanim oksidativnim stresom predstavlja osnovo degenerativnim spremembam pri staranju nevronov.	
		ANG	In this work we present a detailed analysis of the dual role of lysosomes and lysosomal cathepsins in the two main pathways of cell death, namely, apoptosis and autophagy. Destabilization of the lysosomal membranes by lysosomotropic detergents seems to be a promising strategy as it would not only disable autophagy, but also promote apoptosis through the initiation of the lysosomal pathway. On the other side, the impaired autophagy and lysosomal degradation linked with the increased oxidative stress underlie degenerative changes in the aging neurons.	
	Objavljeno v		Elsevier; Biochimica et biophysica acta; 2012; Vol. 1824, no. 1; str. 22-33; Impact Factor: 3.635;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.24; Avtorji / Authors: Repnik Urška, Stoka Veronika, Turk Vito, Turk Boris	
Tipologija		1.02 Pregledni znanstveni članek		
2.	COBISS ID		24680231	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Mehanizmi nastanka amiloidnih fibril: poudarek na zamenjavi domen	
		ANG	Mechanisms of amyloid fibril formation: focus on domain-swapping	
			Konformacijske bolezni sestavljajo skupino heteroloških motenj, v katerih gre sestavni del gostiteljskega proteina skozi konformacijske spremembe, ki	

	Opis	SLO	vodijo do agregacije in odlaganja. Da bi razumeli molekularne mehanizme nastanka amiloidnih fibril, so bile izvedene nekatere in vitro ter in vivo studije, vključujoč modelni ter patološko relevantne proteine. V tem delu smo predstavili podroben opis mehanizmov nastanka amiloidnih fibril razdeljenih v treh skupinah in sicer: (a) osnova in nukleacija, (b) linearna, koloidom podobno sestava sferičnih oligomerov in (c) zamenjava domen.	
		ANG	Conformational diseases constitute a group of heterologous disorders in which a constituent host protein undergoes changes in conformation, leading to aggregation and deposition. In order to understand the molecular mechanisms of amyloid-fibril formation, several in vitro and in vivo studies, thus including model and pathologically relevant proteins, have been performed. In this work we presented a detailed analysis of the mechanism by which proteins undergo ordered aggregation into amyloid fibrils classified in three groups, namely (a) templating and nucleation; (b) linear, colloid-like assembly of spherical oligomers; and (c) domain-swapping.	
	Objavljeno v		Blackwell; FEBS journal; 2011; Vol. 278, no. 13; str. 2263-2282; Impact Factor: 3.790; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.739; Avtorji / Authors: Žerovnik Eva, Stoka Veronika, Mirtič Andreja, Gunčar Gregor, Grdadolnik Jože, Staniforth Rosemary A., Turk Dušan, Turk Vito	
	Tipologija		1.02 Pregledni znanstveni članek	
3.	COBISS ID		24607527	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Okvarjena avtofagija: povezava med nevrodegenerativna obolenja ter progresivne mioklonske epilepsije	
		ANG	Impaired autophagy: a link between neurodegenerative diseases and progressive myoclonus epilepsies	
	Opis	SLO	Na osnovi opazovanj, da progresivna mioklonska epilepsija (PMEs) in nevrodegenerativna obolenja delijo skupne značilnosti nevrodegeneracije, smo predlagali v tem delu, da obe bolezni kažeta skupne osnovne temeljne molekularne značilnosti. Dejstvo je, da je avtofagija preobremenjena ali oslABLJENA v nevrodegenerativnih pogojih vključno pri Lafora obolenju (EPM2). Čeprav so z vezi s tem potrebne dodatne raziskave, predlagamo, da bi obstoječe terapije pri PME obolenju zboljšali s podobnimi zdravili, kot se uporabljajo za nevrodegenerativna obolenja.	
		ANG	Based on the observation that progressive myoclonus epilepsies (PMEs) and neurodegenerative diseases share common features of neurodegeneration, in this work we proposed that both pathologies share common underlying molecular characteristics. It is well documented that autophagy is overloaded or impaired in neurodegenerative conditions, including Lafora disease (EPM2). Although additional research in this area will be necessary, we proposed that existing therapies for PME could be enhanced using similar drugs as those used for the treatment of neurodegenerative diseases.	
	Objavljeno v		Elsevier Science; Trends in molecular medicine; 2011; Vol. 17, no. 6; str. 293-299; Impact Factor: 10.355; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.978; A': 1; Avtorji / Authors: Polajnar Mira, Žerovnik Eva	
4.	COBISS ID		22717479	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Cisteinski katepsini niso kritični za TNF-alfa-inducirano celično smrt v celičnih linijah T98G in U937	
		ANG	Cysteine cathepsins are not critical for TNF-[alpha]-induced cell death in T98G and U937 cells	

	Opis	SLO	V tem delu smo proučevali apoptozo, izzvano z dejavnikom tumorske nekroze (TNF)-alfa pri dveh tumorskih celičnih linijah, U937 in T98G. Ugotovili smo, da med apoptozo pride do destabilizacije lizosomov in sproščanja cisteinskih kathepsinov v citosol. Vendar inhibicija cisteinskih kathepsinov z inhibitorjem vseh cisteinskih kathepsinov E64d ali inhibitorjem kathepsina B CA-074Me, ni vplivala na potek apoptoze pri nobeni celični liniji. Zato smo zaključili, da apoptoza, izzvana s TNF-alfa, ni kritično odvisna od cisteinskih kathepsinov v teh dveh celičnih modelih.
		ANG	In this work, we investigated the cell death termed apoptosis, in two tumor-cell lines, U937 and T98G, thus induced by the tumor necrosis factor (TNF)-alpha. The cell death involved lysosomal destabilization and the release of cathepsins into the cytosol. However, the blockage of cysteine cathepsins with a broad-spectrum inhibitor, E64d, or a more specific cathepsin B inhibitor, CA-074Me, had no effect on the progression of apoptosis in neither cell line, thus suggesting that TNF-alpha apoptosis is not critically dependent on cysteine cathepsins in these cellular models.
	Objavljeno v	Elsevier; Biochimica et biophysica acta; 2009; Vol. 1794, no. 9; str. 1372-1377; Impact Factor: 2.480; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.643; Avtorji / Authors: Klarić Martina, Tao Sun, Stoka Veronika, Turk Boris, Turk Vito	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
5.	COBISS ID	22793767	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Polialaninske deli izzovejo neposredno sproščanje citokroma c iz mitohondrijev, neodvisno od por za spremenjeno permeabilnost, kar vodi v apoptozo
		ANG	Polyalanine tracts directly induce the release of cytochrome c, independently of the mitochondrial permeability transition pore, leading to apoptosis
	Opis	SLO	V tem delu smo pokazali, da polialaninski deli, ki vsebujejo več kot 23 ponovitev, pri interakcij z mitohondriji povzročijo sproščanje citokroma c v citosol in aktivacijo kaspaze-3 na način, ki je neodvisen od por MPTP. Ti rezultati kažejo, da oligomerizirani polialaninski deli lahko povzročijo destabilizacijo mitohondrijske membrane in posledično sproščanje citokroma c in apoptozo. S tem novim mehanizmom citotoksičnosti polialaninskih delov bi morda lahko pojasnili patogenezo vseh polialaninskih bolezni.
		ANG	In this study, we showed that polyalanine tracts containing more than 23 repeats physically associate with mitochondria by a mechanism that induces cytochrome c release and caspase-3 activation, independently of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP). These results suggest that oligomerized polyalanine tracts might induce the rupture of the mitochondrial membrane, the subsequent release of cytochrome c, and apoptosis. This novel mechanism for polyalanine tract cytotoxicity might be common to the pathogenesis of all polyalanine diseases.
	Objavljeno v	Blackwell Science; Genes to cells; 2009; Vol. 14, no. 6; str. 751-757; Impact Factor: 2.952; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.574; Avtorji / Authors: Toriumi Kazuya, Oma Yoko, Mimoto Ai, Futai Eugene, Sasagawa Noboru, Turk Boris, Ishiura Shoichi	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	

8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁷

	Družbeno-ekonomski dosežek		

1.	COBISS ID	25904423	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Razgradnja ataksina-3 in njegovih mutantov s cisteinskimi katepsini in vloga fragmentov ataksina-3 pri spinocerebelarni ataksiji tipa 3
		<i>ANG</i>	Degradation of ataxin-3 and its mutants with cysteine cathepsins and possible role of ataxin-3 fragments in Spinocerebellar ataxia type 3
	Opis	<i>SLO</i>	V skupino dednih nevrodegenerativnih obolenj s homopolimernimi aminokislinskimi zaporedji (angl. HPAA - Homopolymeric amino acid tract) spada tudi Spinocerebelarna ataksija tipa 3, znana kot Machado-Josephova bolezen. Nastopi v kasnejšem življenjskem obdobju s simptomi tremorja, izgube ravnotežja, invalidnosti in prezgodnje smrti. Pri spinocerebelarni ataksiji tipa 3 (SCA3) je protein ataksin-3 (Atx3) z normalno regijo, ki običajno vsebuje od 14-37 glutaminskih preostankov mutiran v obliko s 54-84 glutaminskimi preostanki. Značilnost bolezni SCA3 so agregati v jedru nevronske celice, ki naj bi vodili do celične smrti nevronov in s tem do nevrodegeneracije, prizadete pa so le nekatere možganske regije. Za C-terminalne fragmente mutiranih oblik Atx3, najdene v lizatih možganskega tkiva pacientov velja, da so še bolj toksični in imajo še večjo nagnjenost do tvorbe agregatov, kar kažejo tako celični kot živalski modeli. Proteaze, ki naj bi bile udeležene pri nastanku toksičnega fragmenta so zaenkrat še neznane. Delo Nine Vidregar predstavlja mehanizem razgradnje proteina ataksina-3 (Atx3) ter njegovih mutant s cisteinskimi katepsini ter možno vlogo C-terminalnih fragmentov mutiranih oblik ataksina-3 k večji nagnjenosti do tvorbe agregatov ter sprožilcev celične smrti. S standardnimi protokoli kloniranja je kandidatka ustvarila različne mutante proteina Atx3 in njihove skrajšane fragmente z različno dolgimi poliglutaminskimi podaljški v različnih vektorjih. Na celičnih modelih nevroblastomskih celic SH-SY5Y je v primerjavi z divjim tipom ugotavljala, kako mutirani proteini in njihovi fragmenti z agregacijo vplivajo na celice. Konstrukte divjega tipa Atx3, njegovega mutanta in C-končnih fragmentov je jih izrazila in izolirala iz bakterije E. coli (DE3)pLysS in uporabila za eksperimente cepitev. S konstrukti Atx3 in njegovih C-terminalnih fragmentov je transfecirala celično linijo SH-SY5Y. Cepitve Atx3 s katepsini B, L in K so pokazale, da katepsini cepijo Atx3. Rezultati N-terminalnega sekvenciranja razgradnih produktov so kazali, da bi bil katepsin L lahko proteaza, ki je odgovorna za nastanek C končnega toksičnega fragmenta. Z imunofluorescenčno mikroskopijo je pri stabilno transficiranih in diferenciranih celicah SH-SY5Y pokazala kolokalizacijo Atx3 s katepsinom L. Ker je SCA3 bolezen poznega tipa, lahko s staranjem povezani fenomeni kot so aktivacija kaspaz, cisteinskih proteaz, kalpaina in zmanjšana aktivnost šaperonov, pripomorejo k nastopu bolezni. Identifikacija cepitvenih mest v rekombinantnem človeškem Atx3 bi lahko doprinesla k razumevanju mehanizmov udeležene proteolize in njene povezanosti s patofiziologijo.
			An expansion of homopolymeric amino acid (HPAA) tract is found in a group of at least ten inherited neurodegenerative diseases. The most common is Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) also known as Machado-Joseph disease. SCA3 is the predominant late adult onset disease that presents with symptoms including tremor, impaired balance and premature death. The disease protein ataxin-3 (Atx3) is mutated and its normal repeat length of 14-37 polyglutamine residues increases to a number of 54-84 glutamine residues. The characteristic feature of SCA3 is the formation of intranuclear aggregates causing neuronal cell death and degeneration where only a specific subset of neurons is affected. The C-terminal fragments of Atx3 protein found in the patient's brain lysates were shown to be more toxic and with greater tendency for aggregation, which was confirmed in cellular and animal models. Proteases involved in the

		processing and propagation of Atx3 toxic fragment remain to be identified. Nina Vidergar's work aimed to understand the mechanism of degradation of ataxin-3 (Atx3) and its mutants with cysteine cathepsins and the potential role of the C-terminal truncated forms of ataxin-3 with higher tendency to aggregate formation and trigger of cell death. Using standard molecular cloning protocols we generated different Atx3 mutants and its C-terminal fragments with various poly-Q repeat lengths. Cellular models of neuroblastoma SH-SY5Y cells expressing mutated Atx3 and its fragments were more prone to aggregation comparing to the wild type. The constructs of Atx3, its mutant and C-terminal fragments were expressed and isolated from host bacteria E. coli (DE3)pLysS for biochemical in vitro studies and further cleavage experiments. The experiments of Atx3 cleavages with cathepsins B, L and K showed that cathepsins process Atx3. With N-terminal-sequencing we have identified cathepsin L as likely protease responsible for the generation of the toxic fragment. The colocalization of Atx3 and cathepsin L was confirmed by immunofluorescent microscopy. SCA3 is a late-onset disease and age-related phenomena such as caspase-, cysteine protease- and calpain activation including the decreased chaperone activity could contribute to the disease initiation. Therefore, the identification of cleavage sites in recombinant human Atx3 may contribute to the understanding of mechanism of proteolysis and its potential link to pathophysiology.	
	Šifra	D.09	Mentorstvo doktorandom
	Objavljeno v	[N. Vidergar]; 2012; XIV, 103 str.; Avtorji / Authors: Vidergar Nina	
	Tipologija	2.09 Magistrsko delo	
2.	COBISS ID	263241984	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	XIIIth Simpozij o proteazah, inhibitorji in biološki nadzor
		ANG	XIIIth International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control
	Opis	SLO	Mednarodni tradicionalni srečanje raziskovalcev na področju proteolize v normalnih in patoloških stanj (Portorož, Slovenija, 22-26 Septembra, 2012).
		ANG	Traditional international scientific meeting in the field of proteolysis under normal and pathological conditions (Portorož, Slovenia, September 22-26, 2012).
	Šifra	B.01	Organizator znanstvenega srečanja
	Objavljeno v	Jožef Stefan Institute; 2012; 127 str.; Avtorji / Authors: Stoka Veronika, Turk Boris	
	Tipologija	2.25 Druge monografije in druga zaključena dela	
3.	COBISS ID	23599911	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Molekularne in strukturne mehanizme pri nevrodegeneracij
		ANG	Molecular and structural mechanisms in neurodegeneration
	Opis	SLO	V tem predavanju je vodja projekta, V. Stoka, prvič predstavila nov vidik nevrodegeneracije iz stališča funkcijskih ter strukturnih proteinskih mrež.
		ANG	In this lecture, the project leader, V. Stoka, reported for the first time, a new concept of neurodegeneration as functional and structural protein networks.
	Šifra	B.05	Gostujoči profesor na inštitutu/univerzi
	Objavljeno v	Ateneo de INECO; 2010; Avtorji / Authors: Stoka Veronika	
	Tipologija	3.14 Predavanje na tuji univerzi	

4.	COBISS ID	23599655	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Lizosomska pot apoptoze: kompleksna bioloska mreza	
		<i>ANG</i> The lysosomal apoptosis signaling pathway is a complex biological network	
	Opis	<i>SLO</i> V tem predavanju je vodja projekta, V. Stoka, ki je odkrila lizosomsko pot apoptoze leta 2001, je sedaj prvič predstavila poglobljen vpogled to poti iz vidika "topoloskih mrež".	
		<i>ANG</i> In this lecture, the project leader, V. Stoka, who firstly proposed the lysosomal pathway of apoptosis in 2001, presented a more comprehensive view of the pathway described as a "topological network".	
	Šifra	B.04	Vabljen predavanje
	Objavljeno v	International Society for Computational Biology; ISCB Latin America 2010; 2010; Avtorji / Authors: Stoka Veronika, Turk Boris, Turk Vito	
	Tipologija	1.12	Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
5.	COBISS ID	24648743	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Strukturna in funkcijska mreža kot orodje za razvoj učinkovitejših pristopov v osebni terapiji	
		<i>ANG</i> Structural and functional network as a tool to develop more effective approaches in personalized medicine	
	Opis	<i>SLO</i> Proteinske-proteinske interakcije opredeljujejo molekularne mreže v organizmu ter njihove deregulacije povezane z boleznimi. Ta koncept smo prikazali s strukturno ter funkcijsko mrežo na primeru kalikrein-kinin in renin-angiotenzin sistem, ki predstavljata dva tesno regulirana proteolitična sistema, ki sodelujeta v različnih fizioloških ter patoloških procesih kot so npr. nevrodegenerativne bolezni, homeostaza srca in ledvic, rast in razvoj ter vnetje.	
		<i>ANG</i> Protein-protein interactions define the molecular networks within an organism, whereas a disruption on the later may lead to disease. In this work, we presented a structural and functional network to exemplified this concept on the kallikrein-kinin (KKS) and renin-angiotensin (RAS) systems. They represent two highly regulated proteolytic systems which participate in several physiological and pathological processes i.e. neurodegeneration, cardiovascular and renal homeostasis, growth and development and inflammation.	
	Šifra	B.04	Vabljen predavanje
	Objavljeno v	Združenje za medicinsko genetiko, Slovensko zdravniško društvo; Osebna genomika med medicinsko uporabo in komercializacijo; 2011; Str. 37-39; Avtorji / Authors: Stoka Veronika, Turk Vito	
	Tipologija	1.08	Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

Nosilka tega projekta ter člani projektne skupine so tudi avtorji oz. soavtorji številnih publikacij v mednarodno uglednih revijah, ki so tekale predvsem v okviru programske skupine "Proteoliza in njena regulacija" (P1—0140, vodja prof. ddr. Boris Turk). Sodelavci na tem projektu so aktivno sodelovali s predavanji na mednarodnih in domačih konferencah, predstavili več posterjev in so bili udeleženi pri organizaciji Mednarodne konference o proteazah v Portorožu (leta 2010, 2012). Nekateri člani sodelujejo pri pedagoškem delu kot nosilci oz. sonosilci predmetov na dodiplomski in podiplomski stopnji (B. Turk, E. Žerovnik, V. Stoka) ter kot mentorji pri doktorskih disertacijah ter diplomskih delih. Člani projektni skupini B. Turk, E. Žerovnik ter V. Stoka opravljajo recenzije znanstvenih publikacij ter so aktivni člani nekaterih odborov v domačih in mednarodnih znanstvenih organizacijah. Poleg tega je B. Turk je Editor uredniškega odbora Biological chemistry (2008-) in E. Žerovnik, članica uredniškega odbora

Amyloids (2005-). Visoko kvalitetno raziskovalno delo članov projektne skupine je razvidno iz ISI Web of knowledge na dan 8.3.2013: V. Stoka (h-indeks 22 in 2.017 citatov), B. Turk (h-indeks 36 in ~5.600 citatov) ter E. Žerovnik (h-indeks 19 in ~1.700 citatov). B. Turk je prejel leta 2011 Zoisovo nagrado za vrhunske dosežke v znanosti in je član dveh Centrov Odličnosti in sicer CIPKEBIP ter NIN. Je prav tako koordinator dveh Evropskih projektov v 7.OP.

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

10.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

Raziskave cisteinskih kathepsinov so postale zanimive zaradi njihove vloge pri mnogih obolenjih vključno z nevrodegeneracijo. Relevance tega projekta je visoka, ker predstavlja boljše razumevanje mehanizmov programirane celične smrti in tvorbe proteinskih agregatov kot ene od možnih strategij pri iskanju načinov preventive ter terapevtskih pristopov. Študije lahko vodijo do pomembnih odkritij kot so diagnostični markerji ali tarče za nove terapevtike. S tem projektom smo nadgradili dosedanje raziskave skupine na področju cisteinskih kathepsinov, ki že tečejo na Odseku na biokemijo in molekularno in strukturno biologijo na Institut Jožef Stefan.

Pomemben doprinos k znanosti predstavljajo že objavljene publikacije v mednarodno uglednih revijah, pa tudi publikacije v pripravi. Poleg objav smo poročali o naših rezultatih tudi na znanstvenih srečanjih v obliki predavanj ali posterjev, ter predavanji na univerzah in inštitutih, doma in v tujini. Za ta projekt je pomembno mednarodno sodelovanje z ugledno raziskovalno skupino prof. Shoichi Ishiure Univerze v Tokiju. Raziskovalci te skupine tudi sodelujemo v 7. Okvirnem Programu EU (7.OP) in drugih mednarodnih projektih kot je npr. izjemno ugleden Human Science Frontiers Program (HSFP) v sodelovanju z prej omenjeno japonsko skupino.

ANG

The research on cysteine cathepsins regained importance due to their role in several diseases, including neurodegeneration. The relevance of this proposal is of high importance, thus enabling a better understanding of the mechanisms of programmed cell death and protein aggregation. The later being among the current strategies leading to novel approaches in prevention and therapy.

The proposed project will strengthen the current research on cysteine cathepsins at the Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology at the Jožef Stefan Institute. An important contribution to science is and will be achieved through publications in internationally recognized journals. In addition, the research team had an active participation of in scientific meetings (lectures, posters) and lectures at universities and research institutes in Slovenia and abroad.

In order to achieve the goals of this proposal, it is also important an active scientific cooperation, with the laboratory lead by Prof. Shoichi Ishiura from University of Tokyo. Researchers participating in this project are currently partners in European projects (FP7) and participated in other international projects such as the prestigious Human Science Frontiers Program (HSFP) in cooperation with the previously mentioned Japanese laboratory.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Raziskave na tem projektu so pomembne, saj imajo proteaze pomembno ne le v fizioloških procesih, pač pa tudi pri obolenjih ter tvorijo osnovo za "translacijske" (translational) raziskave. Predloženi projekt spada med temeljne raziskave strateškega pomena. Ob tem se vzgajajo mladi raziskovalci v obliki magistrskih in doktorskih del. Svoje znanje prenašajo v novo okolje, kot so farmacevtska industrija, raziskovalni laboratoriji, univerze in tujina. Te raziskave so pomembne za boljšo integracijo Slovenske znanosti v Evropski Raziskovalni Prostor (ERA) ter druga mednarodna sodelovanja ter tako doprinašajo k mednarodnemu ugledu slovenske znanosti ter nacionalni identiteti. Raziskave na tem projektu so sestavni del aktivnosti v Centru Odličnosti za Integrirane Pristope v Kemiji in Biologiji Proteinov (CIPKEBiP). Raziskovalci aktivno sodelujejo na znanstvenih simpozijih in kongresih. Prav tako so tudi udeleženi pri organizaciji domačih in mednarodnih znanstvenih srečanj.

Raziskave tega projekta so bile tudi sestavni del mednarodnega projekta Human Science Frontiers Program (HSFP), katerega nosilec za našo stran je bil B. Turk.

ANG

The proposed research is of high importance due to the crucial role of proteases not only under physiological conditions but also under pathological, thus providing the basis to carry out "translational" research. This proposal is a basic research project of strategic importance. These studies are carried out by young researchers. After completing their PhD, their knowledge can be transferred to the new environment such as pharmaceutical companies and other research laboratories and universities and abroad. This proposal is important for the successful integration of Slovenian research in the European Research Area (ERA) and other international collaborations. Members of the team already successfully contributed in this direction to the recognition of their research activities in the international environment. This project is part of the research activities within the Centre of Excellence (CoE) for Integrated Approaches in Chemistry and Biology of Proteins (CIPKeBiP). The team members actively participate in the organization of domestic and international scientific meetings. The research activities of the team were supported by international projects such as the Human Science Frontiers Program (HSFP) led by B. Turk from the Slovenian side.

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

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	☐ 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

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

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
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

--

13.Pomen raziskovanja za sofinancerje¹²

	Sofinancer		
1.	Naziv		
	Naslov		
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%

Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja			Šifra
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
Komentar			
Ocena			

14. Izjemni dosežek v letu 2012¹³

14.1. Izjemni znanstveni dosežek

Protein Bid je eden od substratov pri procesu programirane celične smrti oz. apoptoze. 3D struktura mišjega proteina Bid (1ddb:A) in eksperimentalno določenih cepitvenih mest je prikazana na Sliki 1. Primerjava cepitvenih mest posameznih proteaz v poravnanih sekvenc mišjega ter človeškega proteina Bid so prikazane na Sliki 2.

14.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Pri dednem nevrodegenerativnem obolenju spinocerebelarne ataksije tipa 3 (SCA3), poznane kot Machado-Josephova bolezen (MJD), je protein ataksin-3 (Atx3) z normalno regijo, ki običajno vsebuje od 14-37 glutaminskih preostankov, mutiran pa v obliko s 54-84 glutaminskimi preostanki. Atx3 spada v klan CA (družina C86), in ima pri N-terminalnem koncu Josephinsko domeno, ki vsebuje deubikvitinazno aktivnost. Ohranja katalitično triado (Cis14, His119, Asn134), ki je odgovorna za encimsko aktivnost kot pri papainu, cisteinski proteazi družine C1A. Trodimenzionalna poravnava Josephinske domena ataksina-3 (magenta) z papainom (modro) je prikazana v Sliki 1. Kolokalizacija patološke oblike ataksina-3 z 80 poliglutaminskimi ostanki (Atx3-Q80) s katepsinom L, kot je prikazano v Sliki 2 kar kaže na možnost nastanka C terminalnega toksičnega fragmenta po delovanju katepsina L.

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"

Veronika Stoka

ŽIG

Kraj in datum: Ljubljana 13.3.2013

Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2013/194

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

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

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

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

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

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

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

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

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

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

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

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

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

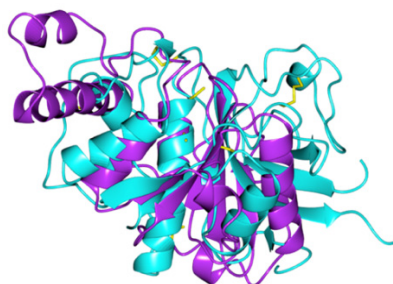
¹² Rubrike izpolnite / prepisite skladno z obrazcem "izjava sofinancerja" <http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>, ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

¹³ Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2012 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot 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/2013 v1.00

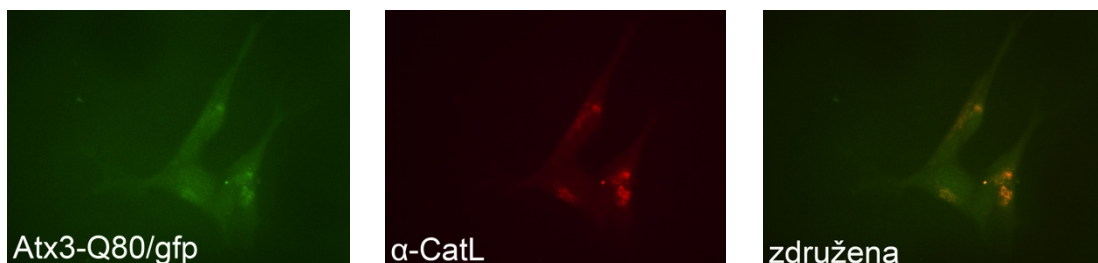
A8-34-0F-DB-AB-A2-A5-0F-73-6C-67-F0-5E-B8-47-D3-D9-E0-DD-5C

Pri dednem nevrodegenerativnem obolenju spinocerebelarne ataksije tipa 3 (SCA3), poznane kot Machado-Josephova bolezen (MJD), je protein ataksin-3 (Atx3) z normalno regijo, ki običajno vsebuje od 14-37 glutaminskih preostankov, mutiran pa v obliko s 54-84 glutaminskimi preostanki. Atx3 spada v klan CA (družina C86), in ima pri N-terminalnem koncu Josephinsko domeno, ki vsebuje deubikvitinazno aktivnost. Ohranja katalitično triado (Cis14, His119, Asn134), ki je odgovorna za encimsko aktivnost kot pri papainu, cisteinski proteazi družine C1A.



Slika 1: 3D poravnava Josephinske domene ataksina-3 (magenta) z papainom (modro).

Kolokalizacija patološke oblike ataksina-3 z 80 poliglutaminskimi ostanki (Atx3-Q80) s katepsinom L, kar kaže na možnost nastanka C-terminalnega toksičnega fragmenta po delovanju katepsina L.

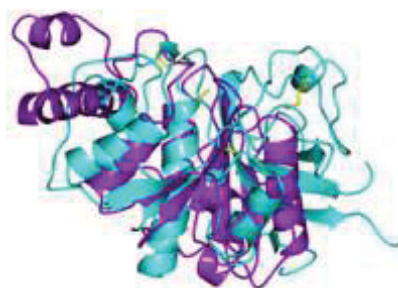


Slika 21: Imunofluorescenčno označevanje mutiranega Atx3 in katepsina L. Zeleno-fluorescirajoč mutiran Atx3 je vizualiziran s sistemom leč FITC. Uporabljena so mišja monoklonska protitelesa proti katepsinu L in anti-mišja protitelesa z rdečim fluoroforom (rdeča fluorescenca, A 546).

VIR:

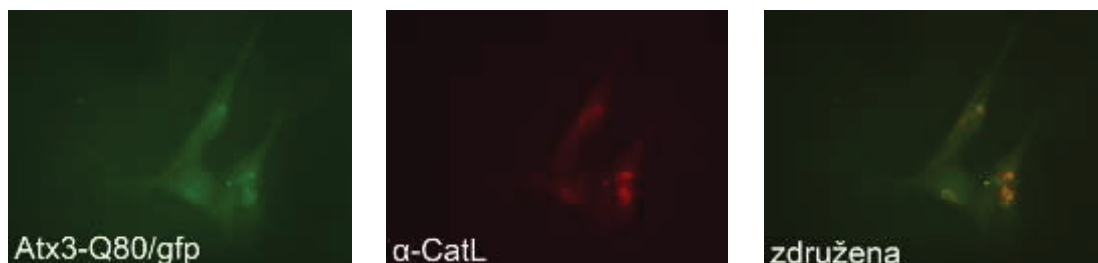
VIDERGAR, Nina. Razgradnja ataksina-3 in njegovih mutantov s cisteinskimi katepsini in vloga fragmentov ataksina-3 pri spinocerebelarni ataksiji tipa 3 : magistrsko delo = Degradation of ataxin-3 and its mutants by cysteine cathepsins : a possible role of ataxin-3 fragments in spinocerebellar ataxia type 3 : master thesis. Ljubljana: [N. Vidergar], 2012. XIV, 103 str., ilustr. [COBISS.SI-ID [25904423](#)]

Pri dednem nevrodegenerativnem obolenju spinocerebelarne ataksije tipa 3 (SCA3), poznane kot Machado-Josephova bolezen (MJD), je protein ataksin-3 (Atx3) z normalno regijo, ki običajno vsebuje od 14-37 glutaminskih preostankov, mutiran pa v obliko s 54-84 glutaminskimi preostanki. Atx3 spada v klan CA (družina C86), in ima pri N-terminalnem koncu Josephinsko domeno, ki vsebuje deubikvitinazno aktivnost. Ohranja katalitično triado (Cis14, His119, Asn134), ki je odgovorna za encimsko aktivnost kot pri papainu, cisteinski proteazi družine C1A.



Slika 1: 3D poravnava Josephinske domene ataksina-3 (magenta) z papainom (modro).

Kolokalizacija patološke oblike ataksina-3 z 80 poliglutaminskimi ostanki (Atx3-Q80) s katepsinom L, kar kaže na možnost nastanka C-terminalnega toksičnega fragmenta po delovanju katepsina L.



Slika 21: Imunofluorescenčno označevanje mutiranega Atx3 in katepsina L. Zeleno-fluorescirajoč mutiran Atx3 je vizualiziran s sistemom leč FITC. Uporabljena so mišja monoklonska protitelesa proti katepsinu L in anti-mišja protitelesa z rdečim fluoroforom (rdeča fluorescenca, A 546).

VIR:

VIDERGAR, Nina. Razgradnja ataksina-3 in njegovih mutantov s cisteinskimi katepsini in vloga fragmentov ataksina-3 pri spinocerebelarni ataksiji tipa 3 : magistrsko delo = Degradation of ataxin-3 and its mutants by cysteine cathepsins : a possible role of ataxin-3 fragments in spinocerebellar ataxia type 3 : master thesis. Ljubljana: [N. Vidergar], 2012. XIV, 103 str., ilustr. [COBISS.SI-ID [25904423](#)]

