

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2013/227



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J1-2307
Naslov projekta	Katepsin E: karakterizacija in biološka vloga
Vodja projekta	1085 Vito Turk
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	1 NARAVOSLOVJE 1.05 Biokemija in molekularna biologija
Družbeno-ekonomski cilj	13.01 Naravoslovne vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)

2. Raziskovalno področje po šifrantu FOS¹

Šifra	1.06
- Veda	1 Naravoslovne vede
- Področje	1.06 Biologija

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta²

SLO

Intracelularna proteinska razgradnja je kompleksen proces, v katerem sodeluje več razredov proteaz, med katerimi tudi sta dve glavni intracelularni proteazi, aspartatna katepsina D in E, ki spadata v družino pepsina. Čeprav katepsina D in E imata nekatere podobne biokemijske in strukturne lastnosti, pa se razlikujeta v celični lokalizaciji, kar kaže na to, da se oba encima razlikujeta v specifičnih funkcijah. Katepsin D je lizosomalni encim, medtem ko je katepsin E

lokaliziran v endosomih in predvsem izražen v celicah imunskega sistema. Nedavno je bila odkrita v celicah adenokarcinoma encimsko ne aktivna spojitevna varianta 2 katepsina E z neznano biološko funkcijo. Čeprav je bilo za oba encima ugotovljeno, da sodelujeta v normalnih in patoloških procesih, vključno pri raku (katepsin E pri raku želodca) in drugih boleznih, pa so molekularni mehanizmi delovanja teh encimov še ne dovolj raziskani.

Izrazili smo in izolirali človeški katepsin D, E in spojitevno varianto 2 katepsina E v različnih sistemih. Proteini iz bakterijskega ter insektnega sistema so bili uporabljeni za biokemijske karakterizacije in primerjavo med divjim tipom katepsina E ter spojitevno varianto 2. Med tem ko je bil katepsin E encimsko aktiven in uporabljen za preliminarno proteomsko analizo, pa je bila spojitevna varianta 2 neaktivna. Vendar pa je spojitevna varianta interagirala s pentapeptidom pepstatinom, kar kaže na to, da je morda njena biološka vloga še neznan. Nadalje smo za katepsin E in njegovo spojitevno varianto 2 ugotovili, da sta kolokalizirani v človeških celicah. Oba proteina sta bila identificirana v HeLa celicah s pomočjo specifičnih protiteles. Tudi smo ugotovili, da katepsin D cepi protein Bid *in vitro* v nasprotju s katepsinom E. Na drugi strani, v celičnem modelu, oba encima nimata pomembne vloge.

Čeprav sta oba encima, katepsin D in E, znana po svoji podobni specifičnosti, pa smo ugotovili razlike v specifičnosti pri cepitvi proteinskih inhibitorjev cisteinskih proteaz - cistatinov, lizocimu in neuropeptidih. Preliminarna proteomska analiza je potrdila nekatere razlike med vsemi tremi preiskovanimi proteini. Ne nazadnje pa moramo omeniti pomembno dejstvo, da katepsin E aktivira cisteinsko proteazo prokatepsin X v nasprotju s katepsinom D.

Za zaključek, hiter razvoj novih tehnologij, kot so proteomika in druge moderne metode so ključnega pomena za identifikacijo fizioloških substratov. To omogoča premik od tradicionalnega koncepta proteaz kot encimov za razgradnjo proteinov k spoznanju, da so proteaze tudi pomembne signalne molekule. Zato so te študije ključnega pomena za nadaljnje boljše razumevanje kompleksnosti bioloških procesov v živih organizmih.

ANG

Intracellular protein degradation is a complex process in which participates several classes of proteases, among others two major intracellular proteases, aspartic cathepsins D and E, both assigned to pepsin family. Although cathepsin D and E share some biochemical properties and structural features, they differ in their cellular localization, strongly suggesting that both enzymes have different and more specific functions. Cathepsin D is a lysosomal enzyme whereas cathepsin E is present in endosomes and predominantly expressed in cells of immune system. Recently, a splice variant of cathepsin E with unknown function was found in adenocarcinoma cells. Although both enzymes were found to be involved in normal and pathological processes including cancer (cathepsin E in gastric cancer) and other diseases, the molecular mechanisms are not well understood.

We expressed and purified human cathepsin D, E and splice variant 2 of cathepsin E in several systems. Proteins from bacterial and insect systems were used for biochemical characterization and comparison between normal cathepsin E and its splice variant 2. While cathepsin E was active and used for preliminary proteomics, the splice variant 2 was inactive. However, the splice variant was capable to bind the pentapeptide pepstatin indicating some possible and unknown biological role. Cathepsin E and its splice variant 2 were found to be colocalized when expressed in human cells. Both proteins were identified in HeLa cells using specific antibodies. We show that cathepsin D cleaves *in vitro* protein Bid in contrast to cathepsin E. On the other side, in a cellular model, none of these enzymes play a significant role.

Although both enzymes, cathepsins D and E, are known as enzymes with similar specificities, we found differences in the specific cleavages of protein inhibitors of cysteine proteases – cystatins, lysozyme, and neuropeptides. Preliminary proteomic analysis confirmed some differences between all three investigated proteins. In addition, it was found that cysteine protease procathepsin X is activated by cathepsin E and not by cathepsin D.

In conclusion, rapid development of new technologies such as proteomics and other modern methods are crucial for identification of physiological substrates, thus shifting from the concept of proteases as protein-degrading enzymes to proteases as key signaling molecules. These studies are crucial for further understanding of the complexity of the biological processes in living organisms.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu³

Katepsin E (3.4.23.34) je intracelularna, nelizozomska aspartatna proteaza, ki spada v klan AA

družine pepsina, podobno kot lizosomalni katepsin D (3.4.23.5). V nasprotju z zelo raziskanim katepsinom D pa so lastnosti katepsina E precej manj raziskane. Odkrita spojitevna varianta katepsina E pa do sedaj še ni bila dobljena v obliki proteina. Čeprav je bil katepsin E izoliran iz različnih tkiv ter izražen kot rekombinantni protein v različnih ekspresijskih sistemih, pa so količine proteinov bili premajhne za bolj obsežne študije. Zato je bil tudi temu problemu precej posvečen projekt.

Izdelana je bila metoda za izolacijo katepsina E v večjih količinah kot tudi spojitevna varianta tega encima. Za primerjavo rezultatov je bil izoliran tudi katepsin D. Katepsin D, E ter varianto 2 katepsina E smo izrazili v bakteriji *E. coli* v obliki s propeptidom in v zreli obliki. Prav tako je bila v bakteriji izražena aktivna in neaktivna oblika fuzijskih proteinov katepsina D in E z GST. Netopni proteine smo podvrgli postopku pravilnega proteinskega zvitja. Katepsin E in varianta 2 katepsina E sta bili izraženi tudi z bakulovirusnim ekspresijskim sistemom v insektnih celicah v topni obliki, ki je rezultiral v višjem izkoristku kot prej opisani sistemi (V. Puizdar *in sod.* v pripravi za tisk). Razgradnjo substratov s katepsinom E smo izvedli pri različnih pH: lizosom (pH 5), endosom (pH 6) in izvencelične pogoje (pH 7,2). Katepsin E je bil najbolj aktiven pri pH 5, nekaj aktivnosti pa je kazal tudi v nevtralnem pH. Pomen aktivnosti v nevtralnem okolju se izraža v sposobnosti delovanja katepsina E izvencelično, vendar se literaturni podatki razlikujejo. Rekombinantna spojitevna varianta 2 katepsina E, je služila za nekatere nadaljnje raziskave. Po ugotovitvi, da je spojitevna varianta encimsko neaktivna, smo v sodelovanju s prof. Andrejem Šalijem (UCSF, ZDA), pripravili dva strukturna modela tega proteina. Na osnovi modela smo ugotovili, da se večji del spremenjene sekvence aminokislin zvija na enak način kot osnovna varianta proteina. Ker spojitveni varianti manjka ena asparaginska kislina, je leta neaktivna. Pripravili smo dva mutanta s tem, da smo zamenjali prolin oz. glutaminsko kislino z asparaginsko kislino, tako da je imela spojitevna varianta dve asparaginski kislini. Kljub temu nismo dobili encimske aktivnosti na testirane proteinske substrate. Iz strukturnega modela ter z uporabo spektroskopskih metod smo sklepali, s kromatografskimi metodami in mikroskopijo na atomsko silo pa ugotovili, da protein tvori oligomere. Strukturni model spojitvene variante 2 katepsina E je bil uporabljen tudi za naslovno stran revije, v kateri je članek tudi objavljen (Biol. Chem., vol 393, str. 177186, 2012).

Fiziološko vlogo katepsina E smo raziskovali z določanjem specifičnosti na različne substrate. Tako smo raziskovali delovanje katepsina E na ekstracelularni matriks in na regulatorne peptide. Katepsin E hidrolizira laminin in kolagen IV, ne cepi pa kolagen I. Pomembno razliko hidrolize proteinskega substrata katepsina E v primerjavi s katepsinom D smo pokazali na primeru cepitve lizocima. Medtem ko katepsin D cepi kot endopeptidaza, katepsin E razgrajuje substrat direktno do kratkih peptidov in popolne razgradnje substrata, kar kaže na možnost, da ima katepsin E poleg endopeptidazne aktivnosti tudi eksopeptidazno aktivnost. Nadaljnje študije v smeri ugotavljanja razlik v specifičnosti ter nagnjenosti do cepitev različnih molekul obeh katepsinov bodo potrebne. Pri študiju neuropeptidov kot substratov katepsina E naj omenimo razgradnjo nevrotenzina v nevtralnem pH ob aminokislini Pro na mestu 4. S podobno specifičnostjo (vez Pro-Lys) in še večjo hitrostjo razgradnje cepi katepsin E substanco P, kar je v skladu z že objavljenimi rezultati. Ugotovili smo, da katepsin E in varianta 2 *in vitro* ne cepita inhibitorjev cisteinskih proteinaz cistatinov n.pr. stefina A, stefina B in cistatina C. Ti inhibitorji pa so odlični substrati katepsina D. Dodatno smo ugotovili, da omenjane cepitve inhibitorjev z katepsinom D potekajo tudi v celicah. Vsi ti rezultati kažejo na različnost v specifičnosti obeh aspartatnih proteinaz, katepsina D in E. Eksperimenti inaktivacije inhibitorjev cisteinskih proteinaz s katepsinom D v celični liniji HEK so pokazali, da katepsin D po sproščanju iz lizosomov s pomočjo Leu-Leu-OMe lahko cepi inhibitorje cisteinskih proteinaz in tako sodeluje pri njihovi regulaciji v patoloških procesih (pregledni članek BBA Proteins and Proteomics 2012).

Za študije interakcije katepsina E s potencialnimi ligandi smo uporabili rekombinantni katepsin E v fuziji z glutation S-transferazo. Po interakciji s celičnim lizatoma FRTL-5 celic, smo po elektroforezi iz izrezanih proteinskih lisah s pomočjo metod proteomike identificirali 26 proteinov, ki bi lahko specifično interagirali s katepsinom E. Med njimi so metabolni encimi (reduktaze, dehidrogenaze), ribosomski proteini, pa tudi nekateri signalni in jedrni proteini (prohibitin 2, splicing factor, heterogenous ribonuclear protein A2/B1). Katepsin E varianta 2 smo vezali na agarozni nosilec in po analizi proteinov ugotovili, da je ta varianta katepsina E močno interagirala z albuminom, lamininom in vimentinom. Albumin in laminin sta substrata katepsina E, varianta 2 pa ju očitno ne cepi. Ker je vseeno prišlo do interakcije, predvidevamo da spojitevna varianta 2 katepsina E ohrani biološko afiniteto do ligandov. Podpora tej trditvi je tudi dokaz vezave pepstatina A, inhibitorja aspartatnih proteinaz, na spojitevno varianto 2, kar smo objavili v

članku. Za natančnejšo karakterizacijo ligandov in interakcije s katepsinom E bodo potrebne nadaljne raziskave. Podobno smo naredili tudi študije interakcije katepsina D s potencialnimi ligandi po isti metodologiji in ugotovili vrsto proteinov med njimi vimentin, beta-2-microglobulin, legumain, calmodulin in stefin B. Cepitev stefina B smo dokazali tudi *in vitro*.

Nadalje smo pripravili zajčja protitelesa proti katepsinu E in njegovi spojivni varianti na osnovi sintetičnih peptidov, ki predstavljajo površinske epitope obeh proteinov. Izbrali smo potencialna mesta z visoko imunogenostjo, tako, da bi protitelesa čim boljše prepoznala antigen. Izbira je bila omejena na C-terminalni del obeh proteinov, kar nam omogoča ločevanje med obema oblikama. Izkazalo se je, da smo bili pri načrtovanju uspešni, saj smo dobili serum z visokim titrom in visoko specifičnostjo. Posamezna protitelesa so prepoznala le tarčni protein. Z uporabo teh protiteles smo dokazali prisotnost proteinske oblike spojivne variante katepsina E v rakasti celični liniji HeLa. Do sedaj je bila znana prisotnost mRNA v dveh celičnih linijah želodčnega tumorja, izražanje proteina pa je do sedaj neznan. Ta rezultat ponuja nove možnosti pri raziskavah želodčnih tumorjev. Z metodo RT-PCR na nivoju mRNA smo dobili za katepsin E lep signal, tudi za celotno količino katepsin E in variante 2, žal pa nismo dobili specifičnega signala za varianto 2 katepsina E. Pri tem smo bili omejeni na en oligonukleotid, kar pa ni dalo zadovoljivega rezultata.

Za določevanje lokalizacije katepsina E smo pripravili celice, v katerih smo izrazili katepsin E kot fuzijski protein z varianto zelenega fluorescenčne proteina, ki je zmožen spremeniti barvo po določenem času. Na ta način smo pokazali, da je porazdelitev encima po celici odvisna od časa. Rast celic smo sinhronizirali z pentapeptidnim inhibitorjem pepstatinom. Ugotovili smo, da v stalni prisotnosti inhibitorja aspartatnih proteinaz, pepstatin A, dosežemo, da preidejo celice v stanje senescence. Celice se ne delijo več, ampak živijo do svoje smrti. Način vstopa celic v senescenco z uporabo pepstatina A še ni bil opisan, zato menimo, da bo uporaba te metode široko uporabna.

Raziskave določanja lokalizacije aspartatnih katepsinov potekajo na celičnih linijah mišjih makrofagov (RAW 264.7) in podganjih tirocitov (FRTL5). Pokazali smo, da je izločanje posledica lokalizacije v endosomskih sekretornih veziklih. Nadalje smo ugotovili, da je usmerjanje katepsina E v endosome in plazemsko membrano povezano s kompleksno, oz. hibridno glikozilacijo, ki pa jo inducira encim N-acetil glukozamin transferaza I (MGAT1). Tako smo ugotovili, da se encim nahaja v endosomih. Po aktivaciji NK celic, sproženi z interleukinom 2, se dvigne nivo MGAT1, katepsin E pa se prične izločati iz celic. Katepsin D se za razliko od katepsina E ne izloče iz celic, saj je vezan na receptor sortilin, ki ga zadrži v lizosomih. V primeru visoko manozne N-glikozilacije katepsina E je encim vezan na manozo 6-fosfat receptor, interakcija z receptorjem pa se prepreči v primeru kompleksne N-glikozilacije. Tako se zaradi prenosa endosomov do plazemske membrane encim sprosti v okolico. Uspešno smo pripravili konstrukte za utišanje izražanja gena za N-acetilglukozamin transferazo I, kar je vodilo do spremembe lokalizacije katepsina E. Delo na področju karakterizacije N-acetilglukozamin transferaze I predstavlja razširitev projekta, kar je posledica novih ugotovitev.

Na osnovi dela s celičnimi linijami smo ugotovili, da je vsaj ena od obeh aspartatnih proteinaz kolokalizirana z cisteinskimi proteazami v endosomu. Zato smo podrobneje raziskali eventuale medsebojen vpliv teh encimov. Dodatek inhibitorja aspartatnih proteinaz, pepstatina A, v gojišče sesalskih celic je preprečil aktivacijo cisteinske proteaze katepsina X. Poleg utišanja izražanja gena za katepsin E smo pripravili utišanje izražanja gena katepsina D v sesalskih celicah s pomočjo shRNA. Tako smo lahko z uporabo te metode ločili med vplivom katepsina E in katepsina D ter sklepali, da obstaja verjetnost aktivacije prokatepsina X s katepsinom E. Nato smo ugotovili, da aktivacija katepsina X ne poteka le v celicah, ampak tudi *in vitro*, kar dokazuje, da katepsin E deluje direktno na prokatepsin X. *In vitro* aktivacijo smo opazovali z merjenjem časovne odvisnosti sproščanja fluorogenega produkta, ki nastaja pri hidrolizi substrata Z-Phe-Arg-AMC z aktivnim katepsinom X. Tvorbo kompleksa prokatepsin X – katepsin E pa smo detektirali z merjenjem znižanja fluorescence (fluorescence quenching) aromatskih aminokislin triptofana in tirozina. Pri tem smo uporabili že pred tem pripravljen neaktivni mutant katepsina E, z mutacijo aktivnega mesta D96A. Tvorba kompleksa je bila vidna v kislem, ne pa v nevtralnem pH. Pripravili smo tudi imunohistološke preparate, s katerimi smo opazovali prisotnost katepsinov E, X in L v sluznici želodca in v epitelijskih celicah ščitnice. Eksperimentalno delo je zaključeno in članek je tik pred pošiljanjem v objavo. Raziskave opisane v tem odstavku niso bile planirane v originalno predloženem in odobrenem triletnem projektu, predstavljajo pa pomemben doprinos razumevanju fiziološke vloge proteaz v procesu proteolize.

V okviru raziskav o vlogi katepsinov E in D v apoptozi smo ugotovili, da je katepsin D v *in vitro* pogojih cepil protein Bid, ki je znana tarča lizosomskih katepsinov, medtem ko katepsin E tega proteina ni cepil. Pri nadaljnjem testiranju vloge obeh katepsinov pri celični smrti smo apoptozo v več celičnih linijah inducirali z lizosomotropnim detergentom LeuLeuOMe, za katerega je znano, da najprej sproži permeabilizacijo lizosomov. Vendar tako sprožene apoptoze nismo uspeli preprečiti z dodatkom inhibitorja aspartatnih proteaz pepstatina A, kar kaže na to, da katepsina E in D ne sodelujeta pri tem modelu celične smrti. Podobne rezultate smo dobili tudi s sfingozinom, tako da lahko sklepamo, da katepsina D in E dejansko nimata dejavnejše vloge v različnih modelih celične smrti, zato s študijami nismo nadaljevali.

Predložena raziskava predstavlja pomemben doprinos k nadaljnjemu razumevanju lastnosti katepsina E in njegove spojivne variante ter daje dobro osnovo za nadaljno delo. Na tem projektu je bilo vzpostavljeno zelo uspešno sodelovanje s skupino prof. Andreja Šalija iz UCSF, San Francisco, ZDA, ki se tudi nadaljuje.

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

Iz zaključnega poročila je razvidno, tudi na osnovi 3. letnih faznih poročil, da so bili vsebinski cilji projekta doseženi. Do sprememb je prišlo bodisi zaradi samega poteka raziskovalnega dela ali novih dognanj v literaturi, kar je opisano v točki 6.

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

Kot je bilo že predhodno omenjeno (točka 5) je delo potekalo skladno z zastavljenim planom. Naj pa omenimo, da so bile manjše spremembe posledica rezultatov, ki so se pokazali v teku dela. Kot smo prijavili projekt (točka 5) smo želeli raziskati povezavo spojivne variante katepsina E z rastjo tumorja, vendar nismo bili v stanju izvesti eksperimentov, ker je dogovorjeno sodelovanje na tem delu izpadlo zaradi upokojitve prof. K. Yamamota iz Kyushu University. Po drugi strani, pa je bilo vzpostavljeno sodelovanje na tem projektu s skupino prof. Andreja Šalija iz UCSF v San Franciscu. Opravljene pa so bile dodatno druge raziskave, ki so vodile med drugim do odkritja, da katepsin E aktivira cisteinsko proteazo katepsin X (T. Zajc in sod., članek v zaključni pripravi za tisk). Prav tako so bile razširjene raziskave študije specifičnosti katepsinov D in E. V času delovanja tega projekta sta bili iz te tematike zaključene diplomsko delo Marte Pregl "Priprava fuzijskih proteinov katepsinov D in E s proteinom GST" (COBISS.SIID: 33965061) ter eksperimentalni del dveh doktorskih disertaciji in sicer mag. Vide Puizdar (09091) in Tajane Zajc (34211). Obe kandidatki sta raziskovali v okviru tega projekta in zaključili eksperimentalno delo. Mag. V. Puizdar (več kot enoletna odsotnost zaradi hude bolezni) bo zaključila z zagovorom odobrenega doktorata z naslovom "Priprava rekombinantne spojivne oblike človeškega katepsina E in biokemijska karakterizacija" do konca junija 2013 na MPŠ. Po drugi strani ima T. Zajc prav tako odobreno doktorsko delo z naslovom "Vpliv katepsina D in katepsina E na regulacijo aktivnosti cisteinskih proteinaz". V času doktorata je bila večkrat odsotna zaradi zdravstvenih problemov, od avgusta 2012 pa je v bolniškem staležu zaradi težjega obolenja – predviden zagovor na Biomedicini UL morda do konca tega leta. Posledično zamujamo z objavo vsaj dveh člankov. Skupino je predčasno zapustila zaradi podoktorskega izpopolnjevanja dr. Urška Repnik (21560). Ne glede na vse navedeno, pa je projekt v celoti uspešno izveden.

7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	25585959	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Biokemijska karakterizacija in model strukture variante 2 katepsina E v primerjavi z divjim tipom proteina
		ANG	Biochemical characterization and structural modeling of human cathepsin E variant 2 in comparison to the wild-type protein
			Spojivna varianta 2 katepsina E je bila odkrita v celicah želodčnega raka.

	Opis	SLO	V raziskavah smo z uporabo poliklonskih protiteles in biotiniliranega inhibitorja pepstatina A prikazali, da se ta varianta encima nahaja v proteinski obliki v celicah HeLa. Fluorescenčna mikroskopija HEK293T celic, v katerih smo izrazili fuzijska proteina katepsin E ali njegovo varianto 2 z zelenim fluorescenčnim proteinom, je pokazala, da sta proteina kolokalizirana. Obe varianti katepsina E s propeptidom in brez njega smo izrazili v E.coli. Proteini so se izrazili v netopni obliki, z uporabljenimi postopki so se pravilno zvali. Ugotovili smo, da je varianta 1 encimsko aktivna, med tem ko je varianta 2 neaktivna. Strukturni model spojitvene variante katepsina E je bil narejen na osnovi določene strukture intermediata katepsin E (koda proteinske banke podatkov PDB 1TZS). Z njegovo pomočjo smo lahko razložili konformacijske lastnosti in izgubo aktivnosti.	
		ANG	Cathepsin E splice variant 2 appears in a number of gastric carcinoma. Here, we report detecting this variant in HeLa cells using polyclonal antibodies and biotinylated inhibitor pepstatin A. Overexpression of GFP fusion proteins of cathepsin E and its splice variant within HEK293T cells showed that both proteins are colocalized. Both proteins were expressed with and without the propeptide in E.coli. After refolding it was found that fulllength cathepsin E variant1 is activated at acid pH, while the splice variant remains inactive. A comparative structure model of splice variant 2 was computed based on its alignment to the known structure of cathepsin E intermediate (Protein Data Bank code 1TZS), and used to rationalize its conformational properties and loss of activity.	
	Objavljeno v	Walter de Gruyter; Biological chemistry; 2012; Vol. 393; str. 177-186; Impact Factor: 2.965;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.739; WoS: CQ; Avtorji / Authors: Puizdar Vida, Zajc Tajana, Žerovnik Eva, Renko Miha, Pieper Ursula, Eswar Narayanan, Šali Andrej, Dolenc Iztok, Turk Vito		
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek		
2.	COBISS ID	25347623		Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Cisteinski katepsini: od strukture, funkcije in regulacije do novih meja	
		ANG	Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers	
	Opis	SLO	Članek je posvečen odkritju lizosoma (in Nobelovcu Christianu de Duveu) pri čemer je imela pomembno vlogo tudi aspartna proteaza katepsin D. Nadaljni razvoj je vodil do odkritja vrste cisteinskih proteinaz, katepsina E ter drugih proteinaz. Članek predvsem zajema raziskave cisteinskih katepsinov, omenjena pa je tudi vloga aspartnih proteaz, predvsem katepsina D pri razgradnji cistatinov, kar je pomembno pri regulaciji aktivnosti cisteinskih katepsinov.	
		ANG	Thi paper is dedicated to Nobel laureate Christian de Duve (who visited our laboratory 1978, three years after the discovery of the lysosome). In this discovery, the important role played also aspartic protease cathepsin D. This discovery was crucial for the enormous progress in the field of proteolysis and various proteases including cysteine cathepsins, cathepsin E and others. In this paper, is indicated the role of aspartic protease cathepsin D at the process of cystatins	
	Objavljeno v	Elsevier; Biochimica et biophysica acta; 2012; Vol. 1824, no. 1; str. 68-88; Impact Factor: 3.635;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.24; WoS: CQ, DA; Avtorji / Authors: Turk Vito, Stoka Veronika, Vasiljeva Olga, Renko Miha, Sun Tao, Turk Boris, Turk Dušan		
	Tipologija	1.02 Pregledni znanstveni članek		
3.	COBISS ID	22640935		Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Lizosomi kot »suicidalni mešički« pri celični smrti: mit ali resnica?	

		ANG	Lysosomes as 'suicide bags' in cell death: myth or reality?
	Opis	SLO	Koncept endozomalno/lizosomalnega sistema obsega vrsto bioloških funkcij. Poleg cisteinskih katepsinov sodelujeta pri apoptozi tudi katepsina D in E.
		ANG	Endosomal/lysosomal system has numerous biological functions. In addition to cysteine cathepsins participate in apoptosis cathepsins D and E, as well.
	Objavljeno v		American Society of Biological Chemists.; The Journal of biological chemistry; 2009; Vol. 284, no. 33; str. 21783-21787; Impact Factor: 5.328; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.643; A': 1; WoS: CQ; Avtorji / Authors: Turk Boris, Turk Vito
	Tipologija		1.02 Pregledni znanstveni članek
4.	COBISS ID		25737767 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Signaliziranje proteaz
		ANG	Protease signalling: the cutting edge.
	Opis	SLO	Kontrola aktivnosti proteoliznih encimov je eden od ključnih fizioloških procesov. Neravnovesje v aktivnosti teh encimov je kritičnega pomena pri številnih patoloških procesih. Nedavne raziskave so pokazale z razvojem modernih novih tehnologij kot je npr. proteomika, da so proteaze tudi signalne molekule. Tako se je koncept delovanja proteaz kot ključnih encimov pri razgradnji beljakovin razširil tudi na proteaze kot signalne molekule. Med mnogimi encimi sodelujejo v teh procesih tudi lizosomalni katepsin D in verjetno katepsin E.
		ANG	Control of protease activity play a crucial role in a variety of physiological processes. Imbalances in their activities is critical in a number of pathologies. Recent studies showed, that the development of the modern technologies, such as proteomics contributed to the discovery of proteases as signalling molecules and not only as enzymes responsible for protein degradation. Among other proteases, play important role in these processes lysosomal cathepsin D and most probably cathepsin E.
	Objavljeno v		IRL Press; EMBO journal; 2012; Vol. 31, no. 7; str. 1630-1643; Impact Factor: 9.205; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.739; A': 1; WoS: CQ, DR; Avtorji / Authors: Turk Boris, Turk Dušan, Turk Vito
5.	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
	Tipologija		1.02 Pregledni znanstveni članek

		lysosomal degradation linked with the increased oxidative stress underlie degenerative changes in the aging neurons. Lizosomi ter lizosomalni katepsini pri celični smrti.
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; WoS: CQ, DA; Avtorji / Authors: Repnik Urška, Stoka Veronika, Turk Vito, Turk Boris
Tipologija	1.02	Pregledni znanstveni članek

8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine²

	Družbeno-ekonomski dosežek	
1.	COBISS ID	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO ANG
	Opis	SLO ANG
	Šifra	B.06 Drugo
	Objavljeno v	Seventh General Meeting of the International Proteolysis Society, October 16-20, 2011, San Diego, California, USA. San Diego: International Proteolysis Society, 2011, str. 31.
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
2.	COBISS ID	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO ANG
	Opis	SLO ANG
	Šifra	B.06 Drugo
	Objavljeno v	http://www.kowi.de/Portaldata/2/Resources/fp7/erc/FP7-ERC-AdG-2012-Panel-Members.pdf
	Tipologija	3.25 Druga izvedena dela
3.	COBISS ID	Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO ANG
	Opis	SLO ANG
	Šifra	B.06 Drugo

	Objavljeno v		http://www.iubmb-febs-2012.org/IUBMBFEBS2012/programa.asp?tipcom=5&item=2106
	Tipologija		3.25 Druga izvedena dela
4.	COBISS ID		25348135 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics Posebna redna številka posvečena Nobelemu nagrajencu Christianu de Duveu.
		ANG	Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics Special issue: Proteolysis 50 years after the discovery of lysosome in honor of Nobel laureate Christian de Duve.
	Opis	SLO	Celotna številka revije vsebuje 24 vabljenih avtorjev ki so prikazali stanje raziskav na področje proteolize danes in eventuelnim razvojem v prihodnje. Avtorji spadajo med najbolj ugledne v svojih področjih.
		ANG	The issue contains 24 invited authors. In their papers, they describe current status in the field of proteolysis with possible development in the future. The authors are among the best in their fields.
	Šifra		C.01 Uredništvo tujega/mednarodnega zbornika/knjige
	Objavljeno v		Elsevier; Biochimica et biophysica acta; 2012; Vol. 1824, no. 1; str. 1-2; Impact Factor: 3.635; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.24; WoS: CQ, DA; Avtorji / Authors: Turk Vito
	Tipologija		1.20 Predgovor, spremna beseda
5.	COBISS ID		Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO	FEBS 3+ Meeting: From molecules to life and back (Opatija, Hrvatska, Junij 13-16, 2012)
		ANG	FEBS 3+ Meeting: From molecules to life and back (Opatija, Croatia June 13-16, 2012)
	Opis	SLO	Član Mednarodnega znanstvenega odbora srečanja in kopredsednik otvoritvenemu plenarnemu predavanju Nobelove nagradenke za kemijo 2009, dr. Ada Yonath "Life expectancy - Wishes, predictions and reality". V. Turk predstavil predavateljico.
		ANG	Member of the international scientific committee and co-chairman at the Opening plenary lecture Dr. Ada Yonath, Nobel prize for Chemistry 2009: "Life expectancy - Wishes, predictions and reality". V. Turk introduction.
	Šifra		B.01 Organizator znanstvenega srečanja
	Objavljeno v		http://febs3plus.imi.hr/programme.html
	Tipologija		1.20 Predgovor, spremna beseda

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

Vodja projekta Vito Turk je v času vodenja projekta sodeloval tudi na drugih projektih in programu, vključno s sodelovanjem na projektih 7.OP, ki jih financira Evropska Skupnost. Prav tako je sodeloval na več kongresih in simpozij kot vabljen predavatelj, predsednik sekciji. Posebej naj izpostavimo članstvo na panelni komisiji za ocenjevanje ERC Advanced Grant Projektov (2008-2013). Vodja projekta ima hindeks: 60 in preko 13,500 citatov, citati/članek je 34.7, ter je najbolj citirani slovenski raziskovalec. V času trajanja projekta 2009-2012 ima povprečje citatov ~ 760/leto

Vodja projekta je tudi predsednik MPŠ, kjer vse vpisani študente seznanja z načinom pisanja člankov in projektov ter pripravo predavanj. Pri predmetu proteoliza pa se podiplomci seznanjajo z vlogo tega procesa v normalnih in patoloških stanjih. Vodja projekta je tudi mentor številnim MR ter aktiven tudi v različnih strokovnih organih Instituta Jožef Stefan ter predsednik ZS ARRS. Poleg tega je član dveh uredniških odborov uglednih mednarodnih revij ter recenzent člankov v številnih mednarodnih revijah. Ne nazadnje, je bil pred kratkim izvoljen za rednega

člana SAZU.

Tudi drugi člani projektne skupine so aktivni raziskovalci (Iztok Dolenc - h je 21 preko 1,000 citatov ter Urška Repnik - trenutno na podoktorskem izpopolnjevanju v tujini). Ostali sodelavci so bili A. Špes ter D. Suban, ki sta v letu 2012 zaključila z doktoratom in zapustila skupino.

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

10.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

Glavni namen projekta je bil da se nadalje pojasni biokemijske lastnosti aspartatnih proteaz katepsinov D in E z namenom boljšega razumevanja njihove vloge v normalnih in patoloških stanjih. Čeprav je lizosomalni katepsin D že dobro raziskan, je le malo znanega o njegovih fizioloških substratih ter biološki vlogi. Po drugi strani pa je nelizosomalni katepsin E precej manj okarakteriziran in so se šele v zadnjih letih pričele bolj intenzivne raziskave tega encima zaradi njegove vloge pri rakastih obolenjih v gastrointestinalnem traktu. Odkritje spojivene variante katepsina E v adenokarcinomu kaže na pomembnost tega encima pri raku in morda še drugih boleznih. Kljub objavljenim pripravam rekombinantnega katepsina E pa so bili njegovi izkoristki relativno majhni. Z ekspresijo v bakulovirusnem sistemu so bile dobljene večje količine katepsina E, ki omogočajo razširjene raziskave. Prav tako je bila prvič izražena v obliki proteina spojivena varianta 2 katepsina E. Preiskovana je bila specifičnost delovanja katepsina D in E na različne substrate. Bilo je ugotovljeno da se oba encima v svoji specifičnosti do različnih substratov razlikujeta (lisozim, cistatini, neuropeptidi). Preliminarne študije s pomočjo metod proteomike tudi kažejo, da obstajajo določene razlike. Spojitvena varianta 2 katepsina E sicer ne kaže encimske aktivnosti vendar pa reagira s pentapeptidom pepstatinom, kar kaže na določeno možnost njene biološke vloge, tudi pri raku. Pomembna je ugotovitev, da sta katepsin E ter cisteinska proteaza katepsin X kolokalizirana v endozomu. Na osnovi tega odkritja so naše študije vodile v smeri možne interakcije med obema encimoma. Ugotovili smo, da katepsin E aktivira prokatepsin X v aktiven encim. Študije katepsinov D in E na različnih celičnih linijah induciranih z lizosomotropnim detergentom LeuLeuOMe pa kažejo da ta encima nimata pomembnejše vloge pri apoptozi.

Dobljeni rezultati omogočajo nadaljnje raziskave o vlogi zlasti katepsina E in njegove spojivene variante pri rakastih obolenjih. Raziskave so bazične, pomembne za razvoj biokemije, biologije in medicine ter interdisciplinarnega značaja, omogočajo pa prenos znanja od bazičnih spoznanj v kliniko (translacijske raziskave – translational research).

ANG

The main purpose of this project was to further clarify the biochemical properties of aspartic proteases cathepsins D and E in order to better understand their role under normal and pathological conditions. Although lysosomal cathepsin D was well characterized, only little is known about its physiological substrates and biological role. On the other hand, the non-lysosomal cathepsin E is less characterized protein and only in recent years began more intensive studies of this enzyme, due to its role in cancers of the gastrointestinal tract. The discovery of the splice variant of cathepsin E in adenocarcinoma also points out to the importance of this enzyme in cancer and perhaps other diseases. Despite published reports about the expression of recombinant cathepsin E, the yields were very low. On the other side, we were able to obtain the enzyme in larger quantities in the baculovirus expression system, which enables us to pursue this research further. The splice variant of cathepsin E was firstly expressed as a protein. We investigated the specificity of cathepsin D and E on different substrates and it was found that they differ in their specificity towards different substrates (lysozyme, cystatins, neuropeptides). Preliminary studies using proteomics also show that there are certain differences in their specificity. Cathepsin E splice variant does not show enzyme activity but reacts with the pentapeptide pepstatin, suggesting some possible biological role, perhaps in cancer. An important finding is that cathepsin E and cysteine protease cathepsin X colocalize in the endosomes. Our studies led to the discovery that activated cathepsin E activates procathepsin X to the active enzyme. Studies of cathepsins D and E in various cell lines induced by the lysosomotropic detergent LeuLeuOMe suggest that these enzymes do not have a significant role in apoptosis.

These results allow further investigation, particularly the role of cathepsin E and its splice variant in cancer. These studies have basic character (biochemistry, biology, medicine) and are

of interdisciplinary nature, allowing in the near future the transfer of basic knowledge into clinics (translational research).

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Proteaze so trenutno ena od glavnih tarč pri načrtovanju novih zdravil. Številni eksperimenti in klinična raziskovanja predlagajo uporabo proteaznih inhibitorjev pri zdravljenju raka. Tako so rezultati tega projekta tudi pomembni pri vrednotenju aspartatnih katepsinov kot možnih terapevtskih tarč pri zdravljenju raka. Poleg tega ta projekt omogoča identifikacijo novih diagnostičnih markerjev, kar ima lahko veliko komercialno vrednost. Te raziskave ter nadaljnje študije z uporabo reprezentativnih živalskih tumorskih modelov bodo velikega pomena pri vrednotenju novih zdravil na predklinični ravni, kar je zagotovo zelo zanimivo za farmacevtsko industrijo, tudi v Sloveniji ter nastajanje možnih spin-off podjetji. Zato je potrebno te raziskave nadaljevati, kar je tudi dolgoročni namen raziskav. To je zlasti razvidno iz intenziviranja raziskav na tem encimu v mednarodnem prostoru. Hkrati pa razvoj novih znanj omogoča dvig ravni slovenske znanosti ter sodelovanje s tujimi raziskovalnimi skupinami.

Raziskave so bazičnega značaja, imajo pa tudi uporabno komponento, zaradi česar jih lahko upravičeno uvrstimo med strateške bazične raziskave. Vodja skupine je intenzivno sodeloval s slovensko industrijo v preteklem obdobju (Lek, Krka), kar se odraža v velikem številu realiziranih pogodb. V zadnjih nekaj letih (sodelovanje z domačo farmacevtsko industrijo v skupnih projektih je praktično zamrlo) se je več raziskovalcev zaposlilo v slovenski industriji (npr. Novartis Lek pri proizvodnji rekombinantnih proteinov) ter drugih raziskovalnih institutih in univerzah.

Raziskovalno delo na projektu in v raziskovalni skupini nudi izredne možnosti za študente, da se seznani z najnovejšimi tehnikami na področjih, kot npr. proteomika (moderen laboratorij postavljen na IJS pred letom dni) 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. Posamezni člani skupine so mednarodno priznani raziskovalci (vodja projekta je član EMBO ter več tujih akademij in redni član SAZU), kar je tudi pomembno za mednarodno promocijo Slovenije in s tem tudi ohranitev narodne identitete. Raziskovalci na tem projektu so vključeni v Center odličnosti CIPKeBiP, ki ga koordinira naša institucija.

ANG

Proteases are currently one of the major targets in the search for new therapeutics. Numerous experimental and clinical research studies suggested the use of protease inhibitors in cancer treatment. Thus, the results of the proposed project will have a major importance in the evaluation of aspartic cathepsins as possible therapeutic targets in cancer and other diseases. In addition, the project could enable the identification of new diagnostic markers and drug targets for cancer treatment, which is of potential commercial interest. Proposed research and further use of representative animal cancer models are therefore extremely valuable tools and of high value for the evaluation of compounds on the preclinical level, which should be interesting for the pharmaceutical companies including those in Slovenia and the possibility to establish spin-off companies. For this reason it is important to pursue this research further and this is one of the longterm goals of the project. This is also clear from the intense research being carried-out on this enzymes at the international level. Moreover, the development of new knowledge favors the increase of the level of Slovenian research and cooperation with other research groups worldwide.

Although the proposed research is of basic nature, has also applied components and can be classified as strategic basic research. The project leader extensively collaborated in the past with Slovenian industry (Lek, Krka) which resulted in a substantial amount of contract based research. In the last years, many researchers were employed in the Slovene industry (i.e. Novartis Lek in the production of recombinant proteins) and other research institutes and universities.

These studies offers great opportunity for students to be trained in the most advanced methods and areas, including proteomics, established more than year ago within the group at IJS and chemogenomics in cooperation with European and other foreign partners. This field has namely high international priority as it is of major importance in target identification and validation during drug development. Some team members have received wide international recognition

(EMBO member and member of several foreign academies and member of SAZU) which is very important for the promotion of Slovenia and preservation of national identity of Slovenia. The researchers of this group are part of Centre of Excellence (CoE) CIPKeBiP, coordinated by our institute.

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 upravljaljskih rešitev	

	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26 Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljaljskih 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

3D model spojivne variante katepsina E, ki je bila izražena kot protein in ima verjetno pomembno vlogo pri adenokarcinomu ter drugih vrstah raka. Slika je bila objavljena na naslovnici revije Biological Chemistry vol. 393 št. 3, v kateri smo objavili tudi znanstveni članek o karakterizaciji tega proteina.

14.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Vodja projekta je bil povabljen kot gostujoči Editor posebne številke Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics ob 50. obletnici odkritja lizosoma in postavitve lizosomalnega koncepta razgradnje beljakovin. Za to odkritje je prof. Christian de Duve prejel Nobelovo nagrado 1975. leta. Hkrati pa je ta številka posvečena tudi njegovi 95. letnici. Ob izidu te posebne izdaje je Christian de Duve izrazil hvaležnost za tako pozornost.

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 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"

Vito Turk

ŽIG

Kraj in datum: V Ljubljani, 14.3.2013

Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2013/227

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](#)

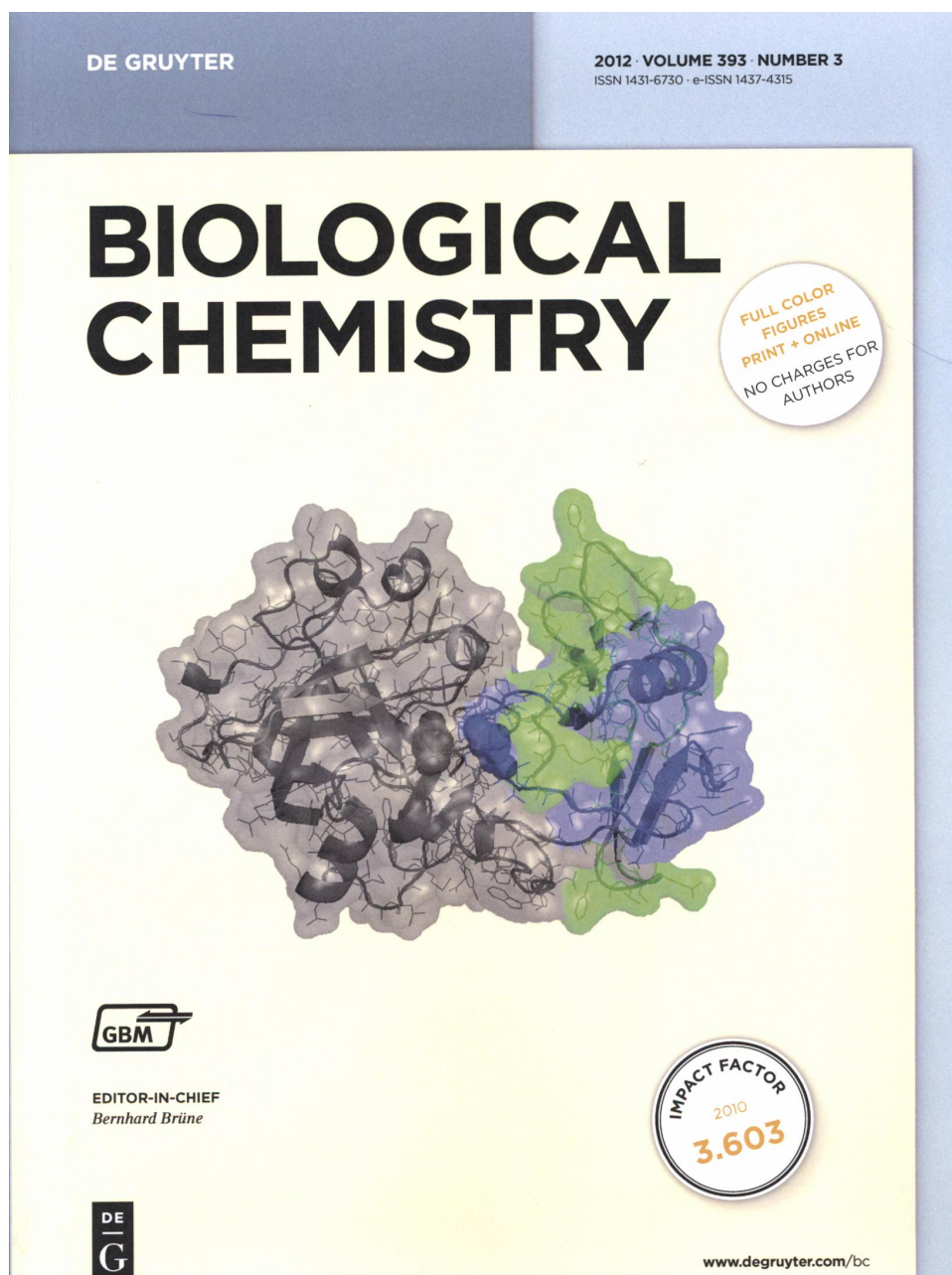
¹¹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

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](#)

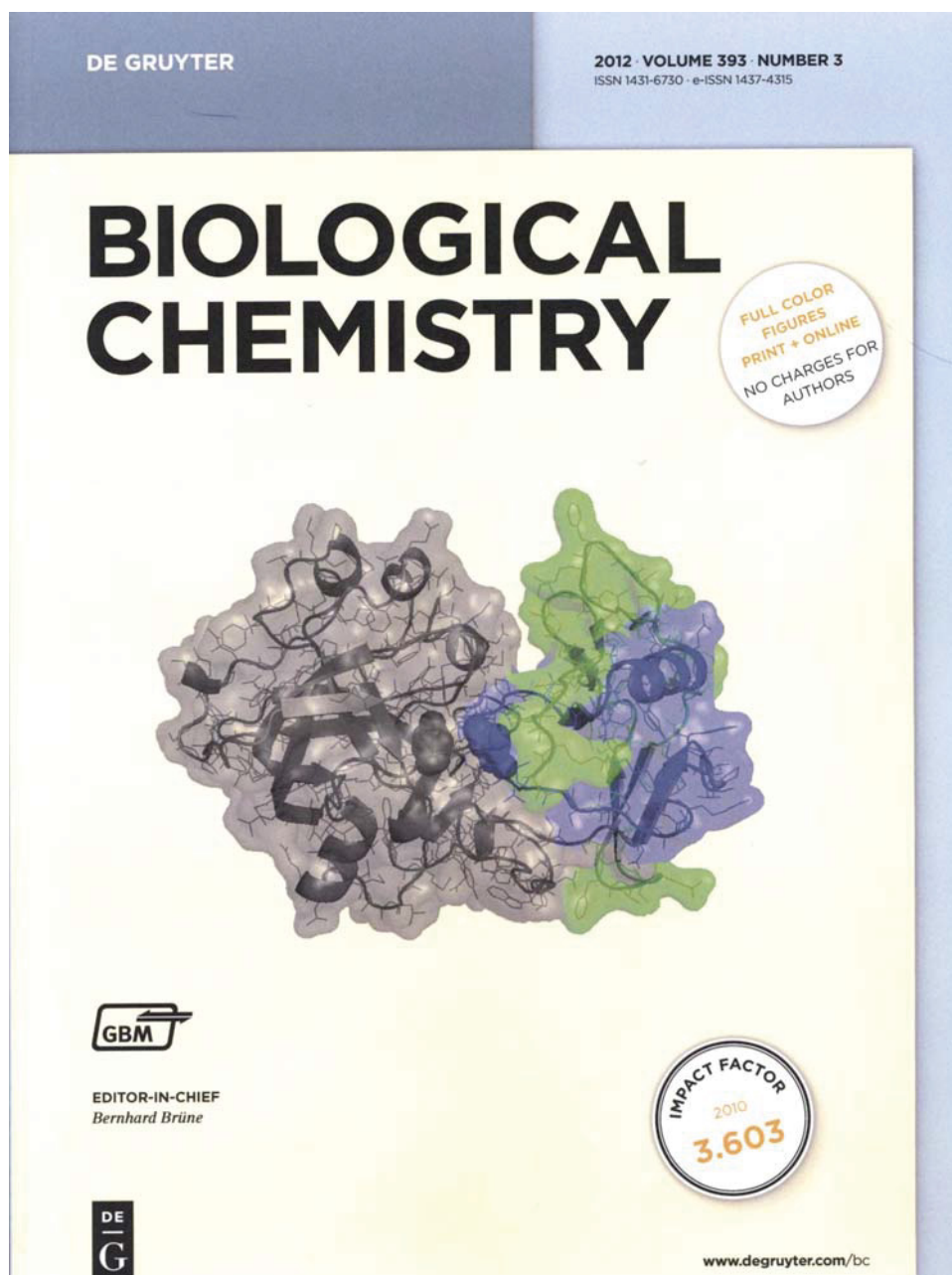
¹³ Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2012 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, 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
37-25-89-3A-A3-33-81-3F-A1-6E-45-6F-E8-FA-46-43-56-AC-51-9F

Slika modela strukture alternativno spojitvene variante katepsina E, ki je bila izražena kot protein in ima verjetno pomembno vlogo pri adenokarcinomu ter drugih vrstah raka. Slika je bila objavljena na naslovnici revije Biological Chemistry, v kateri smo objavili tudi znanstveni članek o karakterizaciji tega proteina.



Slika modela strukture alternativno spojitvene variante katepsina E, ki je bila izražena kot protein in ima verjetno pomembno vlogo pri adenokarcinomu ter drugih vrstah raka. Slika je bila objavljena na naslovnici revije Biological Chemistry, v kateri smo objavili tudi znanstveni članek o karakterizaciji tega proteina.





Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

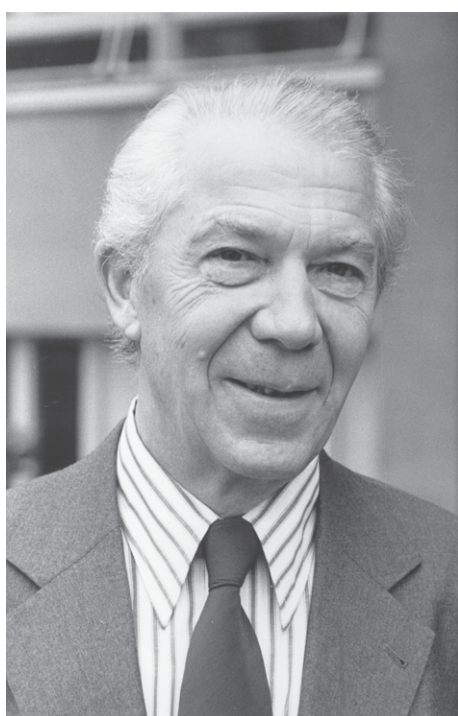
Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbapap



Preface

Special issue: Proteolysis 50 years after the discovery of lysosome in honor of Christian de Duve



Christian de Duve. Photograph courtesy of Marjan Smerke.

Lysosomes represent one of the major cytoplasmic organelles enclosed by a single membrane, present in almost all eukaryotic cells. These organelles, discovered by Christian de Duve (Nobel laureate 1974, born October 2, 1917) in the early 1950s, contained five acid hydrolases, among them the aspartic protease cathepsin D, acting on different substrates, strongly suggested an acid digestive function for these enzymes, as lysosomes were described in those days [1,2]. It is now well known that lysosomes contain over 50 different hydrolases, including proteases and peptidases. They are the major degradative compartment of the endosomal/lysosomal system and the terminal part of the endocytic pathway, where proteins, carbohydrates, lipids and nucleic acids are degraded into their basic constituents. Christian de Duve

also introduced the term "suicide bags" to describe the lysosomes and their function [3]. Such a description of the lysosomes requires them to be linked to the death of the cell, as is now well established [4].

The discovery of the lysosome represented a major breakthrough in the understanding of intracellular protein-degradation processes. Further studies led to the discovery of a second major pathway, the ubiquitin-proteasome system, responsible for non-lysosomal degradation [5]. It is now evident that the degradation and processing of intracellular proteins by the two pathways is involved in numerous biological processes under normal conditions as well as pathogenesis in human diseases.

These discoveries contributed to the rapid progress in research on proteases and led to the discovery of their protein and small-molecule inhibitors. The number of proteases is growing exponentially. Within the past fifteen years three additional catalytic types – the threonine and the glutamate peptidases and the asparagine peptide lyases – had to be added to the four well-known catalytic types of proteases – the serine, cysteine, aspartic and the metallo endo- and exopeptidases, [6]. In parallel, new protein inhibitors were discovered and small molecules were synthesized to target their cognate enzymes. These advances towards a better understanding of proteolysis and their control mechanisms within the cells and organisms were enabled by the bioinformatic analysis of human, mouse and other genomes and by the development of various high-throughput technologies, as well as other advanced methods, including imaging.

The topics discussed in this issue include the mechanisms underlying intracellular protein degradation; the structure-function relationship of various classes of proteases; the role of proteases in programmed cell death and in the immune response; proteases in cancer, neurodegeneration and other diseases; and proteases in snake venoms and parasitic organisms.

This special issue is dedicated to Christian de Duve in appreciation of all he has done throughout his career for the benefit of mankind. We all wish him continued success in the years ahead. I would like to add a personal note. We still remember his great and unforgettable lecture at our Institute,

during his visit in October 1978, about the discovery of lysosome and the role of science as an essential part of the culture of the nation.

It is my great pleasure to acknowledge all the authors for their excellent contributions to this special issue. My special thanks to Dr. Veronika Stoka for her invaluable help and efforts in making this issue a success. Finally, I would like to thank the reviewers and the staff at the Editorial Office (Mrs. Andy Deelen and Sandra Tokashiki) for their understanding, constant help and efficient handling of the manuscripts during the finalizing of this special issue.

References

- [1] C. de Duve, B.C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, F. Appelmans, Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue, *Biochem J* 60 (1955) 604–617.
- [2] C. de Duve, The lysosome turns fifty, *Nat Cell Biol* 7 (2005) 847–849.
- [3] C. de Duve, Lysosomes: a new group of cytoplasmic particles, in: T. Hayashi (Ed.), *Subcellular Particles*, The Ronald Press Co., New York, 1959, pp. 128–159.
- [4] B. Turk, V. Turk, Lysosomes as “suicide bags” in cell death: myth or reality? *J Biol Chem* 284 (2009) 21783–21787.
- [5] A. Ciechanover, Intracellular protein degradation: From a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin–proteasome system and onto human diseases and drug targeting, *Biochem Biophys Acta* 1824 (2012) 3–13.
- [6] N.D. Rawlings, A.J. Barrett, A. Bateman, Asparagine Peptide Lyases: A seventh catalytic type of proteolytic enzymes, *J Biol Chem* 286 (2011) 38321–38328.



Vito Turk is Professor of Biochemistry and President of the Jozef Stefan International Postgraduate School, Ljubljana, Slovenia. He received a Ph.D. in Chemistry at the Faculty of Chemistry at the University of Ljubljana in 1965. With a help of a Fulbright travel grant he joined Professor John A. Rupley at the University of Arizona, Tucson, USA, for a post-doctoral training during 1969–1970. During this time, he studied the kinetics of lysozyme. After his return to Slovenia, he became the Head of the Department of Biochemistry at the Jozef Stefan Institute. Throughout his career, his research activities covered the field of proteases and their protein inhibitors. With his co-workers he contributed to the discovery of stefins, human cystatin (now cystatin C), kininogens and thyropins as inhibitors of cysteine proteases. The structures of chicken cystatin and stefin B–papain complex determined jointly with R. Huber's group established the mechanism of interaction between papain-like enzymes and cystatins. He made an important breakthrough in understanding regulation of proteolysis under normal and pathological conditions. He is the author of numerous publications, an EMBO member and received several other awards. From 1990 to 1998 he was the FEBS Secretary General, and from 1997 to 2006 the Chairman of the IUBMB Committee on Symposia and Interest Groups and Member of the IUBMB Executive Committee.

Vito Turk
Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology
J. Stefan Institute
Jamova 39
SI-1000 Ljubljana
Slovenia
 Tel.: +386 1 477 3365; fax: +386 1 477 3984.
 E-mail address: vito.turk@ijs.si