

Oznaka poročila: ARRS_ZV_RPROJ_ZP_2008/168

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	Z1-9502
Naslov projekta	Priprava podprtih lipidnih membran z encimi za razvoj biosenzorjev
Vodja projekta	20208 Zoran Arsov
Tip projekta	Zt Podoktorski projekt - temeljni
Obseg raziskovalnih ur	3.400
Cenovni razred	B
Trajanje projekta	01.2007 - 12.2008
Nosilna raziskovalna organizacija	106 Institut "Jožef Stefan"
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Družbeno-ekonomski cilj	11 Neusmerjene raziskave (temeljne)

2. Sofinancerji¹

1.	Naziv	
	Naslov	
2.	Naziv	
	Naslov	
3.	Naziv	
	Naslov	

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta²

Opis problema

Različne eksperimentalne in teoretične metode kažejo, da je struktura biološke membrane heterogena. Lipidne in proteinske molekule so razporejene v lateralne domene, katerih fizikalne in biokemijske lastnosti se razlikujejo. Domenska struktura membran ima velik fiziološki pomen, saj vpliva na delovanje proteinov, na interakcije z drugimi membranami ter na prenos signalov med celično zunanostjo in notranostjo.

Zaradi njihove kompleksnosti se lastnosti bioloških membran običajno preučujejo z uporabo modelnih lipidnih membran. Tudi modelne membrane so lahko pri določeni temperaturi in sestavi heterogene, saj pride do lateralne fazne separacije. Te lastnosti so povzete v faznih diagramih. Izvor in stabilizacija lipidnih faz in domen še vedno ni dobro raziskana in razumljena.

Lipidne membrane lahko uporabimo tudi za pripravo podprtih lipidnih membran. Te so zanimive, ker omogočajo biofunkcionalizacijo različnih anorganskih podlag, saj predstavljajo naravno okolje za pritrditev membranskih proteinov. Pomembno je, kako na nastanek podprtih membran vplivajo različna sestava lipidov in lateralna heterogenost.

Na različnih področjih raziskav, npr. pri razvoju zdravil, v proteomiki, pri nadzoru okolja, obstaja potreba za povečanje količine informacij na molekularnem nivoju. Rešitev bi lahko predstavljali biosenzorji, ki so sestavljeni iz biološkega zaznavnega elementa in pretvorniškega elementa ter združujejo izredno občutljivost in selektivnost živih sistemov z močjo procesiranja mikroelektronike. Pri encimskih biosenzorjih je za zaznavni element uporabljen encim. Način pritrditve na pretvorniški element je odvisen od tega ali je encim vodotopen ali je vključen v membrano.

Delovanje na membrano vezanega encima je močno odvisno od prisotnosti lipidne okolice zaradi lipidno-proteinskih interakcij. Če encim izoliramo iz njegovega naravnega okolja, je možno, da pride do denaturacije ali deaktivacije. Zato je pomemben razvoj postopkov za pritrditev na membrano vezanih encimov brez njihove izolacije iz membrane. Ena od možnih rešitev je pritrditev na membrano vezanega encima preko odlaganja vesiklov z vključenim encimom.

Pred začetkom projekta smo zaznali naslednje probleme.

P1. Nepopolno poznavanje faznih diagramov za modelne membrane iz različnih lipidnih mešanic.

P2. Pomanjkljivo razumevanje medmolekulskih interakcij, ki vodijo do pojava in stabilizacije lipidnih faz oziroma domen v modelnih in bioloških membranah.

P3. Dokaj nepoznan vpliv sestave lipidnih vesiklov in fazne separacije na nastanek podprtih membran.

P4. Dokaj neraziskana uporaba nanostrukturiranih in nanomanipulativnih materialov za izdelovanje biosenzorjev z veliko površino in lastnostmi, ki se spreminjajo na majhni skali.

P5. Omejena uporaba intaktnih na membrano vezanih encimov za izdelovanje biosenzorjev.

P6. Težave pri stabilizaciji encimov za uporabo v biosenzorjih.

Cilji raziskav

Glavni namen projekta je bila ugotovitev primernih pogojev za pripravo podprtih lipidnih membran z odlaganjem vesiklov glede na ugotovljeno lateralno heterogenost v teh vesiklih. Da bi poudarili pomen priprave podprtih membran za razvoj biosenzorjev na osnovi na membrano vezanih proteinov, smo pripravili podprte eritrocitne membrane z vključenim encimom acetilholinesterazo (AChE) in preverili delovanje tega encima.

Encim AChE v eritrocitih je biotehnoško zanimiv, saj je njegov aktivni center podoben aktivnemu centru AChE, ki jo najdemo v končičih živčnih celic. Živčni strupi in nekateri pesticidi se vežejo na aktivno mesto v encimu in ga s tem inhibirajo. Biosenzorji na osnovi AChE se torej lahko uporabljajo za zaznavanje zdravju škodljivih in nevarnih snovi.

Cilji raziskav so bili določeni glede na navedene probleme.

A1. Izdelava faznih diagramov za modelne membrane iz različnih lipidnih

mešanic (glej P1).

A2. Določitev medmolekulskih interakcij v različnih lipidnih fazah (glej P2).

A3. Ugotovitev primernih pogojev za nastanek podprtih membran na trdni podlagi z odlaganjem vesiklov (glej P3 in P4).

A4. Priprava podprtih eritrocitnih membran z vključenim encimom acetilholinesterazo kot modelnega sistema za biosenzorje na osnovi na membrano vezanih proteinov (glej P5 in P6).

Raziskovalna hipoteza

Pred začetkom projekta smo glede na cilje raziskav postavili naslednje hipoteze.

H1. Izdelava faznih diagramov za modelne membrane iz različnih lipidnih mešanic (glej A1).

H2. Vodikove vezi med lipidi in holesterolom so možna vrsta medmolekulskih interakcij, ki vplivajo na lastnosti različnih lipidnih faz (glej A2).

H3. Koncentracija holesterola v modelnih membranah vpliva na nastanek podprtih membran na trdni podlagi z odlaganjem vesiklov (glej A3).

H4. Z odlaganjem eritrocitnih membran je možno pripraviti podprte membrane z vključenim na membrano vezanim encimom acetilholinesterazo (glej A4).

Opis raziskav

Raziskave so potekale v več sklopih aktivnosti. V nadaljevanju je naveden kratek opis vsakega od sklopov.

1. Študij modelnih lipidnih membran z EPR s spinskim označevanjem

Modelne lipidne membrane smo pripravili iz različnih lipidnih mešanic v obliki liposomov - multilamelarnih vesiklov. Običajno smo delali z binarnimi mešanicami različnih vrst fosfatidilholinov in sfingomielina, drugo komponento v sistemu pa je predstavljal holesterol. Pripravljene liposome smo označili z nitroksidnimi spinskimi označevalci na osnovi maščobnih kislin.

Meritve na spinsko označenih modelnih membranah smo izvedli z X-pasovno elektronsko paramagnetno resonanco (EPR). Opazovali smo odvisnost spektrov od sestave liposomov in od temperature. Spektri liposomov iz mešanic so superpozicije večih spektralnih komponent, ki odražajo membransko heterogenost v vzorcu. Tako smo lahko študirali fazne prehode in obliko faznih diagramov.

Za analizo spektrov ter izračun parametrov smo uporabili programsko opremo, ki je bila razvita v naši raziskovalni skupini. Uporabili smo novo metodologijo pri kateri najprej izvedemo veliko število ponovitev simulacije spektra. Nato uporabimo poseben avtomatski kondenzacijski algoritem za združevanje vseh rešitev in predstavitev parametrov.

2. Študij podprtih modelnih lipidnih membran z ATR-FTIR

Za meritve z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo na atenuiran totalni odboj (ATR-FTIR) smo lipidne vesikle odložili na element z notranjim odbojem. Z uporabo ATR-FTIR je bil storjen pomemben preskok naprej pri uporabi IR spektroskopije pri delu z vzorci, ki vsebujejo veliko vode.

Nastale podprte membrane so bile hidratirane z vodo, v določenih primerih pa smo uporabili tudi devterirano vodo. S tem smo rešili problem prekrivanja nekaterih absorpcijskih črt vode in lipidnih molekul.

Temperaturna odvisnost položaja ali oblike določenih lipidnih absorpcijskih črt odraža fazo ali soobstoj faz v opazovanem sistemu. Poleg tega lahko nekatere

črte uporabimo za študij nivoja hidracije v membrani in za študij medmolekularnih interakcij, npr. vodikovih vezi.

3. Študij nastanka podprtih modelnih lipidnih membran z AFM in SNIM

Za pripravo posameznih podprtih lipidnih membran smo uporabili majhne enolamelarne vesikle. Vesikle iz različnih lipidnih mešanic smo odlagali na sljudo ali na zlate podlage obložene s tioli. Z izbiro primernih koncentracij vesiklov smo pripravili površine, ki so bile delno prekrivane s posamezno lipidno membrano.

Podlage s pripravljenimi podprtimi membranami smo postavili na mizico mikroskopa na atomsko silo (AFM). Za slikanje smo uporabljali kontaktni in tipalni način. Študirali smo odvisnost oblike in topografije nastalih podprtih membran od sestave vesiklov.

Poleg AFM smo za karakterizacijo podprtih membran uporabili tudi metodo vrstične infrardeče mikroskopije z bližnjim poljem (SNIM). SNIM je nova metoda slikanja z IR svetlobo, kjer resolucijo močno izboljšamo v primerjavi s klasično IR mikroskopijo (iz nekaj mikrometrov na nekaj deset nanometrov). Ta metoda je bila razvita šele v zadnjih letih, tako da gre za popolnoma nov pristop v svetovnem merilu.

4. Karakterizacija domenske strukture eritrocitnih membran

Za poskuse smo uporabljali hematokrit eritrocitov ali pa smo pripravili t.i. eritrocitne srajčke, kjer s posebnim postopkom speremo notranjost eritrocitov, tako da ostane le zunanja membrana.

Temperaturno odvisnost domenske strukture eritrocitnih membran smo preučevali z EPR s spinskim označevanjem. Membrane smo označili z enakimi spinskimi označevalci kot v primeru modelnih membran. Prav tako smo uporabili isti pristop analize EPR spektrov.

5. Študij nastanka podprtih eritrocitnih membran

Pripravljene eritrocitne membrane smo odlagali na zlato, ki je bilo funkcionalizirano z lipofilnimi sidri v dekstranski matriki. Nastanek podprtih membran smo preučevali s površinsko plazmonsko resonanco.

Stabilnost eritrocitnih membran smo preučevali s spremljanjem časovne odvisnosti aktivnosti acetilholinesteraze (AChE). Aktivnost AChE smo merili s kolorimetrično Ellmanovo metodo.

Ključne ugotovitve in znanstvena spoznanja

Lateralna heterogenost lipidnih membran vpliva na nastanek podprtih membran. Zato smo preko študija faznih prehodov in lateralne fazne separacije najprej raziskovali heterogenost različnih modelnih membran. Zanimale so nas tudi medmolekulske interakcije, ki privedejo do pojava in stabilizacije lipidnih faz. Za karakterizacijo smo uporabili spektroskopske metode elektronsko paramagnetno resonanco (EPR) s spinskim označevanjem in infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo na atenuiran totalni odboj (ATR-FTIR) ter metode mikroskopije na atomsko silo (AFM) in vrstične infrardeče mikroskopije z bližnjim poljem (SNIM). Ugotovili smo, da lahko pripravimo podprte eritrocitne membrane z vključenim encimom acetilholinesterazo (AChE). Nastanek podprtih membran smo lahko spremljali s površinsko plazmonsko resonanco (SPR).

Izpostavili bi naslednja znanstvena spoznanja.

S1. Pokazali smo, da lahko z uporabo posebnega kondenzacijskega algoritma za avtomatsko grupiranje rešitev večkratnih simulacij eksperimentalnega EPR spektra avtomatsko detektiramo stopnjo lateralne heterogenosti membran.

S2. Nadalje smo pokazali, da mnogo informacij o faznih lastnostih modelnih membran vsebuje tudi temperaturna odvisnost oblike absorpcijske črte zaradi raztezanja karbonilne skupine pri fosfatidilholinih oziroma amidne skupine pri sfingomielinih. Dobljeni rezultati so omogočili dopolnitve oziroma preverjanje obstoječih faznih diagramov.

S3. Ugotovili smo tudi, da pride do direktne interakcije med holesterolom in karbonilno oziroma amidno skupino preko tvorbe vodikove vezi, kar je eden redkih eksperimentalnih dokazov za obstoj te interakcije.

S4. Z AFM smo pokazali, da je oblika, topografija ter stabilnost podprtih membran odvisna od koncentracije holesterola v vesiklih, ki jih uporabimo za odlaganje.

S5. Dokazali smo uporabnost SNIM za študij podprtih lipidnih membran, saj s to metodo dobimo informacije o topografiji in kemijskih lastnostih na nanometrski skali.

S6. Z meritvami aktivnosti AChE smo potrdili visoko vsebnost encima v eritrocitnih membranah, ki smo jih uporabljali za pripravo podprtih membran.

S7. Z metodo SPR smo potrdili nastanek podprtih eritrocitnih membran ter pokazali njihovo stabilnost.

Rezultati in učinki raziskovalnega projekta

Poleg rezultatov in učinkov so navedene tudi šifre iz Šifranta raziskovalnih rezultatov in učinkov ARRS. Del rezultatov, ki so bili pridobljeni med projektom, še ni objavljenih, pripravljamo pa jih za objavo.

Rezultati:

- objavljeni so bili 3 izvirni znanstveni članki (A.01),
- objavljeno je bilo 1 poglavje v knjigi (A.03),
- članek na temo zaznavanja heterogenosti membran in interakcij med sfingomielinom in holesterolom v reviji Biochim. Biophys. Acta ima v nekaj več kot pol leta že 4 čiste citate (A.05),
- predstavljena so bila 3 predavanja na mednarodnih konferencah (B.03),
- predstavljeno je bilo 1 vabljen predavanje na mednarodni konferenci in 2 vabljeni predavanja na tujih univerzah (B.04),
- pridobljena so bila nova praktična znanja glede različnih biofizikalnih metod (F.01),
- pridobljena so bila nova znanstvena spoznanja; še posebej odmevni so rezultati infrardeče spektroskopije na podprtih membranah (F.02),
- pridobljeno znanje je bilo posredovano na seminarjih in konferencah (F.18),
- razvoj metodoloških rešitev za izdelavo biosenzorjev na osnovi membranskih encimov (F.23),
- izboljšanje programskih rešitev za avtomatizirano obdelavo EPR spektrov (F.24).

Rezultati dela na projektu imajo zaradi uvajanja novih metodologij ter zaradi možne uporabe encimskih biosenzorjev na osnovi acetilholinesteraze za zaznavanje živčnih strupov in pesticidov potencialne učinke na naslednjih področjih:

- razvoj podiplomskega izobraževanja (G.01.02),
- dvig kvalitete življenja (G.04.01),
- varovanje okolja in trajnostni razvoj (G.06),
- varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva (G.08).

4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev³

Delo v okviru 1. leta raziskav na projektu je potekalo v skladu z zastavljenimi cilji in je bilo posvečeno predvsem študiju lateralne heterogenosti v modelnih lipidnih membranah z metodama EPR in ATR-FTIR (1. in 2. sklop aktivnosti). Pokazali smo, da lahko pripomoremo k izboljšanju poznavanja faznih diagramov za membrane iz različnih lipidnih mešanic. Pri EPR smo največ informacij dobili iz spremljanja temperaturne odvisnosti ureditvenega parametra, pri ATR-FTIR pa iz temperaturne odvisnosti položaja absorpcijskih črt. Potrdili smo pričakovanje, da je ATR-FTIR metoda zaradi majhne vdorne globine zelo primerna za vzorce na osnovi vodnih suspenzij. Iz sprememb v ATR-FTIR spektrih, ki kažejo na prisotnost vodikovih vezi, smo potrdili tudi prisotnost nekaterih medmolekulskih interakcij v različnih lipidnih fazah. Potekale so tudi uvodne dejavnosti v okviru 3. sklopa aktivnosti glede študija nastanka podprtih modelnih lipidnih membran z mikroskopijo na atomsko silo (AFM).

V 2. letu raziskav smo se najprej posvetili slikanju podprtih membran z metodama AFM in SNIM. SNIM je še posebno zanimiva metoda. Deluje na osnovi AFM, hkrati pa vsebuje elemente infrardeče mikroskopije. Tako omogoča hkratno določanje in s tem korelacijo topografije ter kemijskih lastnosti merjenja z resolucijo, ki je reda velikosti nekaj 10 nanometrov. Z AFM smo pokazali, da so lastnosti podprtih membran odvisne od lastnosti membran vesiklov, ki jih uporabljamo za njihovo pripravo. Prikazali smo tudi uporabnost SNIM za študij podprtih lipidnih membran. Nadaljevali smo s 4. sklopom aktivnosti glede karakterizacije domenske strukture eritrocitnih membran s spektroskopskimi metodami. V zadnjem 5. sklopu aktivnosti smo proučevali nastanek podprtih eritrocitnih membran z vključenim encimom AChE. Ugotovili smo, da lahko pripravimo dokaj stabilne funkcionalizirane podprte membrane, kar bi v prihodnosti lahko imelo velik pomen za razvoj biosenzorjev na osnovi na membrano vezanih proteinov ali encimov.

Realizacijo raziskovalnih hipotez, ki smo jih postavili pred začetkom projekta, smo načrtovali v obliki mejnikov. Vsi načrtovani mejniki so bili doseženi v polnem ali v velikem obsegu.

M1. Izboljšanje poznavanja faznih diagramov z EPR.

M2. Izboljšanje poznavanja faznih diagramov z ATR-FTIR.

M3. Določanje medmolekulskih interakcij v različnih lipidnih fazah.

M5. Vpliv lateralne heterogenosti membran na nastanek podprtih membran.

M6. Domenska struktura in lastnosti eritrocitnih membran.

M7. Priprava podprtih membran iz eritrocitnih membran z vključenim encimom AChE.

Manjkajoča mejnika sta del aktivnosti, ki sodijo v sklop nadzora in spremljanja projekta.

M4. Letno poročilo.

M8. Končno poročilo.

Ugotovimo lahko, da smo se v projektu posvetili vsem načrtovanim sklopom aktivnosti ter tudi dosegli ustrezne rezultate.

5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta⁴

Ni sprememb.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni rezultat			
1.	Naslov	SLO	Uporaba različnih spektroskopskih metod za karakterizacijo strukture in lastnosti membran

		ANG	Employment of different spectroscopic techniques for characterization of membrane structure and properties
	Opis	SLO	Za sistematični študij in primerjavo lastnosti lipidnih faz za različne lipidne mešanice smo uporabili dve spektroskopski metodi, elektronsko paramagnetno resonanco (EPR) in infrardečo spektroskopijo. Pri EPR so bile osnova pristopa simulacije EPR spektrov ter uporaba posebnega kondenzacijskega algoritma za avtomatsko grupiranje rešitev večkratnih simulacij eksperimentalnega EPR spektra. Ugotovili smo, da z obema metodama dobimo primerljive zaključke, kar je v skladu s pričakovanji. Metodi imata namreč primerljivo krajevno in časovno skalo opazovanja.
		ANG	Two spectroscopic techniques, i.e. electron paramagnetic resonance (EPR) and infrared spectroscopy, have been used to systematically study and compare properties of lipid phases in different lipid mixtures. The basis of the EPR approach was the use of a special condensation algorithm for automatic grouping of solutions from multiple simulations of experimental EPR spectra. We have shown that both methods give similar conclusions, which is expected since they have comparable spatial and time scales.
	Objavljeno v		Štrancar J., Arsov Z., Application of spin-labeling EPR and ATR-FTIR spectroscopies to the study of membrane heterogeneity, In: Advances in planar lipid bilayers and liposomes, Vol. 6.: Ed. A. Leitmannova, Academic, London, pp. 139-163 (2007)
	Tipologija		1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji
	COBISS.SI-ID		21356071
2.	Naslov	SLO	Dokaz interakcij preko vodikovih vezi v lipidnih membranah iz fosfatidilholina in holesterola
		ANG	Evidence of the hydrogen bond interactions in lipid membranes from phosphatidylcholines and cholesterol
	Opis	SLO	Za razumevanje strukture lipidnih membran je pomembno poznavanje medmolekulskih interakcij. Tako so naši rezultati potrdili prisotnost direktne interakcije preko vodikovih vezi med holesterolom in lipidi s fosfatidilholinsko polarno glavo. Ugotovili smo še, da absorpcijska črta zaradi raztezanja karbnilne skupine odraža fazne lastnosti modelnih membran. Pomen rezultatov je še posebej velik, ker so bile meritve opravljene na podprtih membranah pripravljenih v presežku vode. Meritve na takih vzorcih je omogočila posebna metoda infrardeče spektroskopije ATR-FTIR.
		ANG	The knowledge about intermolecular interaction is important for the understanding of the structure of lipid membranes. Our results have confirmed the existence of a direct interaction between cholesterol and lipids with phosphatidylcholine headgroup through hydrogen bonds. We have also found out that the absorption line corresponding to the stretching of carbonyl group reflects phase properties of model membranes. The significance of these results is even higher because the use of the ATR-FTIR enabled measurements on supported membranes in excess water.
	Objavljeno v		Arsov Z., Quaroni L., Direct interaction between cholesterol and phosphatidylcholines in hydrated membranes revealed by ATR-FTIR spectroscopy, Chem. Phys. Lipids (2007) 150:35-48
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		21114407
3.	Naslov	SLO	Obstoj lipidnih faz in medmolekulskih interakcij v lipidnih membranah iz sfingomielina in holesterola
		ANG	Existence of lipid phases and intermolecular interactions in lipid membranes from sphingomyelin and cholesterol
	Opis	SLO	Z ATR-FTIR metodo infrardeče spektroskopije smo raziskovali podprte lipidne membrane iz sfingomielina in holesterola. Kot prvi smo pokazali, da oblika absorpcijske črte amidne skupine odraža soobstoj različnih lipidnih faz. Poleg tega nas je zanimal obstoj vodikovih vezi med sfingomielinom in holesterolom, ki bi lahko razložil nastanek in stabilizacijo lateralne heterogenosti celičnih membran, t.i. lipidnih raftov. Naši rezultati so potrdili prisotnost vodikovih vezi, kar je v skladu z izračuni simulacij molekulske dinamike.
			We have investigated supported lipid membranes from sphingomyelin and cholesterol by the ATR-FTIR. We were the first to show that the shape of

		ANG	absorption lines for amide groups reflects coexistence of different lipid phases. We have also examined the existence of hydrogen bonds between sphingomyelin and cholesterol, which might explain the formation and stabilization of lateral heterogeneity in cell membranes, i.e. lipid rafts. Our results have confirmed the presence of hydrogen bonds, which is in agreement with numerical results obtained by molecular dynamics simulations.
	Objavljeno v		Arsov Z., Quaroni L., Detection of lipid phase coexistence and lipid interactions in sphingomyelin/cholesterol membranes by ATR-FTIR spectroscopy, Biochim. Biophys. Acta (2008) 1778:880-889
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		21577767
4.	Naslov	SLO	Karakterizacija podprtih lipidnih membran z mikroskopijo na atomsko silo in z vrstično infrardečo mikroskopijo z bližnjim poljem
		ANG	Characterization of supported lipid membranes by atomic force microscopy and scanning near-field infrared microscopy
	Opis	SLO	Z mikroskopijo na atomsko silo (AFM) smo študirali vpliv lipidne sestave majhnih enolamelarnih vesiklov na nastanek podprtih membran. Nato smo za slikanje uporabili vrstično IR mikroskopijo z bližnjim poljem (SNIM), ki temelji na AFM in ima izjemno resolucijo nekaj deset nanometrov. Določili smo odvisnost kontrasta slikanja od debeline podprtih membran. Metoda SNIM je bila razvita šele v zadnjih letih, tako da gre za nov pristop k študiju podprtih membran v svetovnem merilu. Rezultati so bili objavljeni v reviji Optics Express, ki je druga revija SCI področja Optike.
		ANG	The effect of the composition of small unilamellar vesicles on the formation of supported membranes has been first studied by atomic force microscopy (AFM). Next, we have used scanning near-field IR microscopy (SNIM). This AFM-based method has exceptional resolution of a few tens of nanometers. We have determined the dependence of contrast on the thickness of supported membranes. The SNIM approach is the state of the art, since this method was only developed in recent years. Results were published in the journal Optics Express, which is ranked 2nd in the SCI category Optics.
	Objavljeno v		Wollny G., Bründermann E., Arsov Z., Quaroni L., Havenith M., Nanoscale depth resolution in scanning near-field infrared microscopy, Opt. Express (2008) 16:7453-7459
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		21716775
5.	Naslov	SLO	
		ANG	
	Opis	SLO	
		ANG	
	Objavljeno v		
	Tipologija		
	COBISS.SI-ID		

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine⁶

Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat			
1.	Naslov	SLO	Izboljšanje programske opreme in metodoloških rešitev za obdelavo EPR spektrov pri raziskavah lastnosti lipidnih membran
		ANG	Improvement of software and methodological solutions for EPR spectra analysis in research on the properties of lipid membranes
	Opis	SLO	Izboljšana je bila programska oprema za avtomatizirano karakterizacijo EPR spektrov modelnih in bioloških membran, ki temelji na razstavitvi EPR spektrov na več spektralnih komponent. Parametre modela za simulacijo EPR spektrov iščemo z večkratno ponovitvijo optimizacije na osnovi genetskega algoritma. Za avtomatizirano analizo rešitev je bil izboljšan poseben kondenzacijski algoritem.
			The software for automated characterization of EPR spectra of model and

		ANG	biological membranes was improved. It is based on EPR spectra decomposition to different spectral components. Parameters of the model for EPR spectra simulation are searched by a multiple run of optimization based on genetic algorithm. For automated analysis of solutions a special condensation algorithm has been improved.
	Šifra		F.24 Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev
	Objavljeno v		Štrancar J., Arsov Z., Application of spin-labeling EPR and ATR-FTIR spectroscopies to the study of membrane heterogeneity, In: Advances in planar lipid bilayers and liposomes, Vol. 6.: Ed. A. Leitmannova, Academic, London, pp. 139-163 (2007)
	Tipologija		1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji
	COBISS.SI-ID		21356071
2.	Naslov	SLO	Vabljen predavanje na temo interakcije med sfingomielinom in holesterolom v modelnih membranah z ATR-FTIR spektroskopijo
		ANG	Invited talk on the subject of interaction between sphingomyelin and cholesterol in model membranes by ATR-FTIR spectroscopy
	Opis	SLO	Pri raziskovanju lastnosti lipidnih faz v mešanicah sfingomielina in holesterola smo prišli do novih rezultatov, saj ATR-FTIR metoda še ni bila uporabljena pri študiju tega sistema. Pokazali smo, da del infrardečega spektra, ki ustreza absorpciji zaradi raztezanja amidne skupine, nosi veliko informacij o faznih lastnostih in o medmolekulskih interakcijah. Vse te aktivnosti so bile v strokovni javnosti sprejete z velikim zanimanjem, saj je raziskovana lipidna mešanica pogost modelni sistem za posebno heterogeno strukturiranost v bioloških membranah.
		ANG	We were the first to use a special ATR-FTIR method in the studies of properties of lipid phases in mixtures of sphingomyelin and cholesterol, which enabled us to gain new results. We have shown that the part of the infrared spectrum corresponding to the absorption due to the stretching of the amide group carries lots of information about phase properties and intermolecular interactions. Scientific public has shown a great interest in these results, while the investigated lipid mixture is frequently used as a model system for special heterogeneous structures in biological membranes.
	Šifra		B.04 Vabljen predavanje
	Objavljeno v		Arsov Z., Study of interaction between sphingomyelin and cholesterol in model membranes by ATR-FTIR spectroscopy, In: 15th International Symposium Spectroscopy in Theory and Practice, Nova Gorica, Slovenia, April 18-21, 2007. Book of abstracts: Eds. Bavcon M., Trebše P., Univerza v Novi Gorici, p. 50 (2007)
	Tipologija		1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
	COBISS.SI-ID		20786983
3.	Naslov	SLO	Pridobitev novih znanj na področju metod za slikanje podprtih lipidnih membran
		ANG	Acquisition of new practical knowledge of methods for imaging of supported lipid membranes
	Opis	SLO	V okviru projekta so bila pridobljena znanja za uporabo mikroskopije na atomsko silo ter vrstične infrardeče mikroskopije z bližnjim poljem. Obe metodi sta izjemno koristni za študij lastnosti podprtih membran, saj omogočata slikanje in kemijsko karakterizacijo posameznih lipidnih membran z visoko resolucijo. S širšim naborom metod, ki smo jih tako uporabili v projektu, smo se bolj učinkovito spoprijeli s projektnimi problemi. Metodologija ter njena uporaba pri karakterizaciji podprtih membran je bila predstavljena na mednarodni konferenci.
		ANG	Within the framework of the project knowledge about the use of atomic force microscopy and scanning near-field infrared microscopy has been acquired. Both methods are extremely useful for the study of the properties of supported membranes, while they allow high resolution imaging and chemical characterization of single lipid membranes. Their application have also provided the use of a wider range of methods, thus making possible a more efficient approach to the project problems. The methodology and its use has been presented at an international conference.
			F.01 Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin

Šifra		
Objavljeno v		Arsov Z., Wollny G., Bründermann E., Quaroni L., Havenith M., Label-free nanoscale imaging and spectroscopy of supported lipid membranes by near-field infrared microscopy, In: Hot nano topics 2008: Incorporating SLONANO 2008, Portorož, Slovenia, May 23-30, 2008. Book of abstracts: Eds. Mihailović D., Kobe S., Remškar M., Jamnik J., Čopič M., Drobne D., Ljubljana, p. 198 (2008)
Tipologija		1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
COBISS.SI-ID		21759271
4.	Naslov	SLO Razvoj metodologije za pripravo podprtih lipidnih membran z encimi za razvoj biosenzorjev
		ANG Development of methodology for preparation of supported lipid membranes with enzymes for development of biosensors
	Opis	SLO Eden od načinov priprave podprtih lipidnih membran je odlaganje membranskih vesiklov na trdno podporo. Podprte membrane z vključenimi proteini ali encimi lahko služijo kot biološki zaznavni elementi v biosenzorjih. Z imobilizacijo membranskih proteinov preko uporabe podprtih membran se izognemo izolaciji, čiščenju in rekonstituciji proteinov, kar lahko vodi k denaturaciji ali deaktivaciji proteinov. Kot primer je bila pokazana priprava podprtih membran z vključenim encimom AChE iz eritrocitov. Nastanek podprtih membran smo spremljali z metodo površinske plazmonske resonance.
		ANG Supported lipid membranes can be prepared by deposition of vesicles on a solid support. With included proteins or enzymes they can serve as biological sensing elements in biosensors. With the immobilization of membrane proteins in supported membranes one avoids isolation, purification and reconstitution of proteins, which often leads to denaturation or deactivation of proteins. As an example the preparation of supported membranes with included enzyme AChE from erythrocytes has been shown. The formation of supported membranes has been followed by the method of surface plasmon resonance.
	Šifra F.23 Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Objavljeno v Arsov Z., Anderluh G., Priprava in karakterizacija podprtih lipidnih membran z encimom acetilholinesterazo, V: 6. konferenca fizikov v osnovnih raziskavah, Podčetrtek, 7. november 2008. Zbornik povzetkov: Ur. Humar M., Škarabot M., Conradi M., DMFA - založništvo, Ljubljana, str. 37 (2008)	
	Tipologija 1.13 Objavljeni povzetek strokovnega prispevka na konferenci	
	COBISS.SI-ID 22235687	
5.	Naslov	SLO Predstavitev rezultatov in metodologije za pripravo podprtih lipidnih membran z encimi za razvoj biosenzorjev
		ANG Presentation of results and methodology for preparation of supported lipid membranes with enzymes for development of biosensors
	Opis	SLO V okviru vabljenega predavanja na Univerzi v Novi Gorici, Podiplomska šola za okoljske študije, so bile predstavljene aktivnosti na projektu. Glavni namen predavanja je bilo posredovanje različnih znanj s področja uporabljene metodologije ter dobljenih rezultatov. Poleg tega je obisk omogočil tudi iskanje možnosti za sodelovanje oziroma iskanje možnosti uporabe rezultatov pridobljenih v okviru projekta. Na omenjeni inštituciji se že ukvarjajo z razvojem biosenzorjev na osnovi acetilholinesteraze za uporabo pri detekciji pesticidov.
		ANG As a part of invited talk at the University of Nova Gorica, Graduate School of Environmental Sciences, the project activities have been presented. The main aim of the talk was to transfer the know-how about the employed methodology and to present the obtained results. In addition, the visit also offered an opportunity to search for the possibilities of collaboration and of potential use of results obtained in the project, while at the mentioned institution they are already engaged in the development of biosensors based on acetylcholinesterase for detection of pesticides.
	Šifra F.18 Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konferenca)	
		Arsov Z., Preparation of supported lipid membranes with enzymes for

Objavljeno v	application in biosensing, University of Nova Gorica, Graduate School of Environmental Sciences, Nova Gorica, May 31, 2007
Tipologija	3.14 Predavanje na tuji univerzi
COBISS.SI-ID	20786215

8. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁷

8.1. Pomen za razvoj znanosti⁸

SLO

Rezultati projekta bodo prispevali k razumevanju nastanka in možne uporabe podprtih lipidnih membran brez proteinov kot modelnih sistemov, oziroma podprtih membran z vključenimi proteini pri razvoju biofunkcionaliziranih površin.

Najprej je pomembno razumevanje lateralne heterogenosti v lipidnih membranah zaradi njenega vpliva na samoureditvene procese pri nastanku podprtih membran z odlaganjem vesiklov, npr. zlivanje in pretrganje vesiklov. Pri študiju membranske heterogenosti sta bila v okviru projekta narejena dva pomembna koraka naprej. Pri delu z elektronsko paramagnetno resonanco (EPR) smo pokazali, da lahko z razvojem posebnih algoritmov za avtomatsko obdelavo eksperimentalnih spektrov povečamo učinkovitost pridobivanja informacij o strukturi membran. Poleg tega smo prednosti infrardeče spektroskopije na atenuiran totalni odboj (ATR-FTIR metoda) pred običajno transmisijsko metodo izkoristili za izvajanje poskusov na podprtih membranah v presežku vode, kar je privedlo do novih spoznanj, saj so se dosedaj poskusi večinoma izvajali na membranah hidratiranih v vlažni atmosferi. Uspeli smo tudi pokazati prednosti hkratne uporabe obeh metod na enakih vzorcih. Rezultati tega dela projekta prispevajo k poznavanju faznih diagramov za modelne lipidne membrane. Ti fazni diagrami so pomembni, ker s spreminjanjem sestave membran lahko vplivamo na delež posameznih lipidnih faz. Razvoj metodologije je zelo pomemben tudi za raziskovanje lateralne strukture bioloških membran, saj jo je možno uporabiti brez velikih prilagoditev.

Posebej bi izpostavili rezultate študija medmolekularnih interakcij z ATR-FTIR. Ugotovili smo, da pride do direktne interakcije med holesterolom in karbonilno oziroma amidno skupino preko tvorbe vodikove vezi, kar je eden redkih eksperimentalnih dokazov za obstoj te interakcije. Ti rezultati prispevajo k razjasnitvi enega največjih problemov membranske biofizike, t.j. problema stabilizacije lateralne strukturiranosti membran.

Z mikroskopijo na atomsko silo (AFM) smo potrdili domneve, da sestava membrane oziroma delež različnih lipidnih faz vpliva na lastnosti podprtih membran. Če torej najprej določimo lastnosti neke membrane, lahko napovemo njeno obnašanje pri tvorbi podprtih membran. Poleg tega smo pokazali uporabnost metode vrstične infrardeče mikroskopije z bližnjim poljem (SNIM) za topografsko in kemijsko karakterizacijo podprtih membran, s čimer smo naredili pionirske korake pri uporabi te metode za študij podprtih membran. Zelo pomemben je tudi prispevek pri ugotavljanju možnosti za pripravo modificiranih trdnih podlag za pripravo nanostrukturiranih podprtih membran. Odkritja, ki jih lahko prinese to delo, so izjemnega pomena za aplikacijo podprtih membran pri razvoju biosenzorjev.

V okviru projekta smo tudi pokazali način priprave podprtih membran, ki vključujejo na membrano vezane proteine oziroma encime. Take funkcionalizirane površine je možno uporabiti kot biološke zaznavne elemente za biosenzorje. Ugotovili smo, da lahko nastanek podprte eritrocitne membrane z vključenim encimom acetilholinesterazo (AChE) spremljamo s površinsko plazmonsko resonanco. Pomen eritrocitne AChE je v njeni podobnosti z AChE, ki se nahaja v živčnih sinapsah. Rezultati so zelo pomembni za področje razvoja biosenzorjev na osnovi membranskih proteinov, saj je trenutno razvoj biosenzorjev omejen predvsem na uporabo vodotopnih proteinov.

ANG

Results of the project will contribute to the understanding of formation and of possible use of supported lipid membranes without proteins as model systems, or of supported membranes with included proteins in the development of biofunctionalized surfaces.

First of all, it is important to understand the role of lateral heterogeneity of lipid membranes in the self-assembly processes affecting the formation of supported membranes by vesicle deposition, such as vesicle fusion or vesicle rupture. Two important steps forward have been made in the study of membrane heterogeneity. Firstly, we have shown that by development of special algorithms for automated analysis of experimental electron paramagnetic resonance (EPR) spectra the efficiency of the extraction of information about membrane structure can be increased. Secondly, we have used the advantage of the attenuated total reflection infrared spectroscopy (ATR-FTIR method) with respect to the conventional transmission method to conduct measurements on supported membranes in excess water. This lead to new findings, while up until now the majority of experiments have been conducted only on membranes

hydrated in humid atmosphere. We were also able to demonstrate the advantages of simultaneous use of both methods on equal samples. The results of this part of the project contribute to the knowledge about the phase diagrams for model lipid membranes. These phase diagrams are important, while by changing the composition of membranes we can influence the fraction of particular lipid phase. The development of the described methodology is also very important for research of lateral structure of biological membranes.

We would especially like to emphasize the results of the study of intermolecular interactions with ATR-FTIR. We have shown that there exists a direct interaction between cholesterol and carbonyl or amide group through the formation of hydrogen bonds. This is one of the rare experimental evidences of the existence of such interaction. These results shed light on one of the biggest problems in membrane biophysics, which is the problem of stabilization of lateral membrane structure.

It has been confirmed with atomic force microscopy (AFM) that the membrane composition affects properties of supported membranes. Therefore, if we determine the properties of some membrane vesicles, we can predict their behavior in the formation of supported membranes. Moreover, we have shown the capability of the scanning near-field infrared microscopy (SNIM) for topographic and chemical characterization of supported membranes, which can be regarded as pioneering steps in the use of this method for the study of supported membranes. Also contribution in ascertaining the possibility of preparation of modified solid supports for formation of nanostructured supported membranes is important. The findings, which can be extracted from our work, have an outstanding significance for application of supported membranes for development of biosensors.

In the framework of the project we have also shown the manner in which supported membranes with included membrane-bound proteins or enzymes can be prepared. It is possible to use such functionalized surfaces as biological sensing elements in biosensors. We were able to follow the formation of erythrocyte membranes with included enzyme acetylcholinesterase (AChE) with surface plasmon resonance. The significance of erythrocyte AChE is in its similarity to AChE, which can be found in nerve synapses. This part of the results is very important in the field of development of biosensors based on membrane proteins, while currently the development of biosensors is mostly limited to the use of water-soluble proteins.

8.2. Pomen za razvoj Slovenije⁹

SLO

Rezultati projekta bodo prispevali k razumevanju odvisnosti nastanka podprtih membran od njihove strukture. Razumevanje in poznavanje postopkov za pripravo podprtih membran z vključenimi proteini bo omogočilo uporabo na membrano vezanih proteinov pri razvoju biosenzorjev ter s tem vplivalo na dosego različnih družbeno-ekonomskih ciljev. Eden od takih ciljev je tehnološki razvoj, saj izdelava oziroma razvoj biosenzorjev sodi v visokotehnološko proizvodnjo merilnih in diagnostičnih pripomočkov. Kot primer navedimo biosenzorje za spremljanje nivoja sladkorja v krvi diabetičnih bolnikov, ki so v svetu doživeli uspešno komercializacijo.

Biosenzorji, ki delujejo na podlagi encima acetilholinesteraze (AChE), imajo pomen za naslednja področja: nadzor in skrb za okolje, varstvo človekovega zdravja, varnost in obramba. S takimi biosenzorji namreč lahko zaznamo prisotnost strupenih in nevarnih snovi v vodi, hrani in okolju, kot so npr. pesticidi, insekticidi ali živčni plini. Uporaba bi omogočila dvig kvalitete življenja, saj bi lahko npr. nadzorovali kvaliteto živil, kar je ena od prioritet slovenske raziskovalne politike. Rezultati glede možne modifikacije trdnih podlag za pripravo nanostrukturiranih podprtih membran so pomembni na področju razvoja nanomaterialov. V zadnjem času zelo napredujejo metode oblikovanja vzorcev na površinah na mikro in nanoskali. S kontroliranim odlaganjem različnih vesikov z različnimi encimi na strukturirane in modificirane podlage bi lahko pripravili strukturirane podprte membrane. Le-te bi lahko postale del načrtovanih prizadevanj na področju razvoja biosenzorjev, ki gredo v smeri razvoja prenosnih multianalitskih in multiencimskih biosenzorjev.

Pri izvajanju projekta smo se povezovali z različnimi institucijami v Sloveniji, s čimer smo pripomogli k prenosu in posredovanju različnih znanj. Tako smo v sodelovanju z Oddelkom za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, uporabili komercialno dostopne zlate podlage za pripravo podprtih eritrocitnih membran z AChE, katerih nastanek smo ovrednotili z metodo površinske plazmonske resonance. Poleg tega so bile aktivnosti na projektu predstavljene v Laboratoriju za raziskave v okolju, Univerza v Novi Gorici, ter na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, Klinični center Ljubljana. Glavni namen predstavitev je bilo posredovanje različnih znanj s področja uporabljene metodologije ter iskanje možnosti za sodelovanje.

Pri izvajanju projekta smo sodelovali z mladimi raziskovalci in mladimi doktorji znanosti iz različnih področij, saj je bil projekt zastavljen interdisciplinarno. S tem smo posredno vplivali na povečanje usposobljenosti mladih strokovnjakov, ki bodo v prihodnosti s svojim znanjem

dopolnili ekspertne sisteme v zdravstvu, visokošolskih in raziskovalnih ustanovah, farmacevtski industriji ter visokotehnoloških podjetjih na področju biotehnologije, s čimer bi lahko posredno prispevali k trajnostnemu razvoju slovenske družbe. Zelo pomemben del projekta so predstavljala tudi sodelovanja s partnerji iz tujine: Sinhrotron v Trstu, Italija, Inštitut za biofiziko in raziskave nanosistemov Avstrijske akademije znanosti, Gradec, Avstrija, in Ruhr-univerza v Bochumu, Nemčija. Sodelovanje je omogočilo pridobitev novih praktičnih znanj ter prenos znanja v Slovenijo.

ANG

Results of the project will contribute to the understanding of the influence of membrane structure on the formation of supported membranes. The understanding and knowledge about the procedures for preparation of supported membranes with included proteins will enable application of membrane-bound proteins in the development of biosensors and with that the achievement of different socio-economic goals. One of these goals is technological progress, while the development of biosensors is relevant for high-tech production of measurement and diagnostic devices. One example of such devices is biosensor for the detection of blood sugar level in the diabetic patients, which represent a commercial success in the world. Biosensors based on the enzyme acetylcholinesterase (AChE) are important in the following fields: control and care of environment, human health care, security and defense. The reason for this is that such biosensors are able to detect the presence of poisonous and dangerous substances such as pesticides, insecticides, and nerve gases in water, food and environment. The use of biosensors based on AChE would raise the quality of life, while it is for example possible to control the food quality, which is one of the priorities of Slovenian research policy. Results concerning possible modifications of solid supports for preparation of nanostructured supported membranes are important in the field of nanomaterial development. Lately, methods for patterning samples on surfaces on micro- or nanoscale show a significant progress. A controlled deposition of different vesicles with different enzymes on structured and modified substrates could lead to the formation of structured supported membranes. Such structured materials could become a part of concerted action toward development of portable multianalyte and multienzyme biosensors. Connections with various institutions in Slovenia have been established during the project, which have contributed to the transfer of knowledge. For example, commercially available golden supports were used to prepare supported erythrocyte membranes with AChE and to follow their formation by surface plasmon resonance in collaboration with Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana. In addition, project activities have been presented in the Laboratory for Environmental Research, University of Nova Gorica, and at the University Institute of Clinical Chemistry and Biochemistry, University Medical Center Ljubljana. The main aim of the presentation was to convey experience of the used methodologies and to search for possibilities of collaboration. During the project we have worked together with young researchers from different research areas, while the project was strongly interdisciplinary. Consequently, we have in indirect way influenced the level of professional capabilities of young experts, which in the future will contribute to the expert systems in health service, in higher education, in research institutes, in pharmaceutical companies and in high-tech companies in the area of biotechnology. With this the project could have an impact on the sustainable development of Slovenian society. A very important part of the project has also been collaboration with groups at the international institutions: Synchrotron Trieste, Italy, Institute of Biophysics and Nanosystems Research of the Austrian Academy of Sciences, Graz, Austria, and Ruhr-University Bochum, Germany. The joint work enabled acquisition of new practical knowledge and the transfer of knowledge to Slovenia.

9. Samo za aplikativne projekte!

Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri aplikativnem 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	

	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

10. Samo za aplikativne projekte!**Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja**

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visoko-šolskega 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:	☐	☐	☐	☐	
	Varovanje zdravja in razvoj					

G.08.	zdravstvenega varstva	☐	☐	☐	☐	
G.09.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	

Komentar

--

11. Pomen raziskovanja za sofinancerje, navedene v 2. točki¹⁰

1.	Sofinancer			
	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				
2.	Sofinancer			
	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				
3.	Sofinancer			
	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			

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, za objavo 6., 7. in 8. točke na spletni strani <http://sicris.izum.si/> ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki

Podpisi:

Zoran Arsov	in/ali	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseb RO

Kraj in datum:

Ljubljana

16.4.2009

Oznaka poročila: ARRS_ZV_RPROJ_ZP_2008/168

¹ Samo za aplikativne projekte. [Nazaj](#)

² Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja ter rezultate in učinke raziskovalnega projekta. Največ 18.000 znakov vključno s presledki (približno tri strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

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

⁴ Samo v primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Navedite največ pet najpomembnejših znanstvenih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov v slovenskem in angleškem jeziku (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki) v slovenskem in angleškem jeziku, navedite, kje je objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote.
Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>.

PRIMER (v slovenskem jeziku):

Zaključno poročilo o rezultatih raziskovalnega projekta

Naslov: Regulacija delovanja beta-2 integrinskih receptorjev s katepsinom X;

Opis: Cisteinske proteaze imajo pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju raka. Zadnje študije kažejo njihovo povezanost s procesi celičnega signaliziranja in imunskega odziva. V tem znanstvenem članku smo prvi dokazali... (največ 600 znakov vključno s presledki)

Objavljeno v: OBERMAJER, N., PREMZL, A., ZAVAŠNIK-BERGANT, T., TURK, B., KOS, J.. Carboxypeptidase cathepsin X mediates $\beta 2$ - integrin dependent adhesion of differentiated U-937 cells. Exp. Cell Res., 2006, 312, 2515-2527, JCR IF (2005): 4.148

Tipologija: 1.01 - Izvirni znanstveni članek

COBISS.SI-ID: 1920113 [Nazaj](#)

⁶ Navedite največ pet najpomembnejših družbeno-ekonomsko relevantnih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki), izberite ustrezen rezultat, ki je v Šifrantu raziskovalnih rezultatov in učinkov (Glej: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/sif-razisk-rezult.asp>), navedite, kje je rezultat objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote.

Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>. [Nazaj](#)

⁷ 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](#)

⁸ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

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

¹⁰ Rubrike izpolnite/prepišite skladno z obrazcem "Izjava sofinancerja" (<http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>), ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-ZV-RPROJ-ZP/2008 v1.00