

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2010-1/169

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J1-9740
Naslov projekta	Razvoj proteinske mikromreže za raziskavo tumorskega proteoma pri raku želodca
Vodja projekta	6135 Radovan Komel
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	4.245
Cenovni razred	D
Trajanje projekta	01.2007 - 12.2009
Nosilna raziskovalna organizacija	381 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	312 Univerzitetni klinični center Ljubljana
Družbeno-ekonomski cilj	13. Splošni napredek znanja - RiR financiran iz drugih virov (ne iz splošnih univerzitetnih fondov - SUF)

2. Sofinancerji¹

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

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta²

Namen projekta je bil odkritje novih proteinskih označevalcev, ki so značilni za različne razvojne stopnje adenokarcinoma želodca in predrakastih lezij. Te bi v nadaljevanju, skupaj z že poznanimi označevalci, uporabili za oblikovanje proteinskega onko-čipa, uporabnega v diagnostiki za zgodnje odkrivanje vzorcev diferencno izraženih proteinov, ki naj bi predstavljali specifičen podpis razvojne stopnje raka.

Z namenom pridobitve orodja za iskanje proteinskih označevalcev onkogeneze smo razvili inovativen pristop izdelave knjižnic rekombinantnih protiteles, ki temelji na ko-amplifikaciji oz. ko-ekspresiji hipervariabilnih domen laminih protiteles VH in VHH, po imunizaciji lame z združenimi proteinskimi ekstrakti tumorskih tkiv. Posebnost lam oz. *Cameleid* je izražanje dvoverižnih protiteles s po eno težko verigo, ob konvencionalnih štiriverižnih protitelesih. Pri omenjeni vrsti protiteles variabilna domena (VHH) sama specifično prepoznava antigen, brez navzočnosti partnerske lahke verige in njene variabilne domene (VL). VHH, ki so najmanjše poznane antigen-vezujoče domene (15 kDa), so stabilnejše od konvencionalnih VH IgG-protiteles in jih je tudi mogoče brez težav in v velikih količinah (več kot 1 mg/l) izraziti v bakteriji *E. coli*. Ker so zelo majhne, so tudi zelo primerne za imobilizacijo na površini čipa. Zaradi visoke sekvečne podobnosti s človeškimi protitelesi jih upoštevajo kot obetavne za imunoterapijo raka. Nasprotno pa je bilo zelo malo pozornosti usmerjene na enoverižne hipervariabilne domene konvencionalnih kamelidnih protiteles, VH (čeprav imajo višjo sekvenčno podobnost s človeškimi VH), največ zato, ker imajo zaradi odsotnosti VL na površini izpostavljene hidrofobne ostanke in tako zelo rade agregirajo, če jih izražamo same, brez VL partnerja. Zato so do sedaj sistematično pripravljali rekombinantne knjižnice samo iz domen VHH, ki so bile narejene tako, da je izolaciji mRNA sledilo obratno prepisovanje z gensko specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki za drugo domeno imunoglobulinskih težkih verig, CH2. Nato sta bili izvedeni dve zaporedni reakciji PCR. S prvo so ločili domene VH od VHH, in sicer na osnovi velikosti produktov PCR. S ponovnim pomnoževanjem so nato selektivno pomnožili domene VHH. V nasprotju s to ustaljeno metodo smo mi oblikovali enostaven in učinkovit pristop ter izdelali tako imenovano »kombinirano VH/VHH knjižnico«, ki vključuje samo eno reakcijo PCR in omogoča ohranjanje molekularne raznolikosti znotraj knjižnice [Kastelic et al., 2009]. Naredili smo rekombinantno knjižnico iz limfocitne RNA lam, ki so bile predhodno imunizirane s proteinskim ekstraktom iz rakastih tkiv želodcev, odstranjenih med operacijami bolnikov. Knjižnica je bila diferenčno presejana med proteinskimi ekstrakti iz zdravega in rakastega tkiva s pomočjo fagne predstavitve, ki smo ji izpostavili proteinske ekstrakte iz zdravih in tumorskih tkiv, imobilizirane na sefarozi. Pokazali smo, da smo v nasprotju z dosedanjimi pristopi, s hkratnim pomnoževanjem cDNA domen VH in VHH uspeli učinkovito izraziti in pridobiti tako rekombinantne domene VHH težkoverižnih protiteles kot tudi VH domene konvencionalnih protiteles. Iz skupne mešanice smo jih uspeli tudi razdvojiti. Po prvih dveh krogih afinitetnega izločanja z referenčnimi, komercialno dostopnimi označevalci rakavih obolenj smo namreč opazili primerljivo število vezalcev VH in VHH, po tretjem krogu pa so bili vezalci z višjo afiniteto do zgoraj omenjenih označevalcev predvsem iz družine VH. Le-ti pa so zaradi večje podobnosti s človeškimi VH III zelo zanimivi za razvoj novih bioloških zdravil za imunoterapijo rakavih obolenj pri človeku, medtem ko so vezalci iz družine VHH zaradi kemične odpornosti in velike stabilnosti primerni za vezavo na trdne nosilce bio-čipov.

Za opredelitev specifičnih protiteles, primernih za vezavo na površino načrtovanega bio-čipa, smo pridobljeno knjižnico rekombinantnih VHH/VH uporabili za iskanje izvirnih označevalcev razvoja raka. Zato smo v nadaljevanju ponovili diferenčno presejavanje (tumorska vs. normalna tkiva) knjižnic rekombinantnih laminih protiteles, pridobljenih po imunizaciji lam z združenimi proteinskimi ekstrakti ustreznih tkiv (tumorskih oz. normalnih). Po tretjem ciklu afinitetne preparative s fagnim prikazom in kolonsko imobiliziranimi proteinskimi ekstrakti (izhodišče za prvi cikel) in izločitvi visokoafinitetnih VH smo pridobili obogateno zalogo rekombinantnih VHH protiteles, ki so kazala izrazite razlike pri vezavi proteinov iz tumorskega vs. normalnega tkiva. Ta protitelesa smo nato vezali na sefarozo in jih uporabili za obratno afinitetno prečiščevanje prostih proteinskih ekstraktov raka želodca in jeter. Eluirane proteine smo ločili z diferenčno 2D-elektroforezo, ki je pri primerjanju normalnih in rakastih tkiv pokazala popolnoma različne proteinske vzorce. Iz primerjave 60 parov 2D-gelov smo ugotovili 160 proteinskih podpisov, ki so prisotni samo v rakastem in odsotni v normalnem tkivu želodca in/ali jeter oz. *vice versa*. Masna spektrometrija (MALDI-TOF MS/MS; LC-ESI MS/MS) je omogočila identifikacijo 117 proteinov, diferencialno izraženih v tumorjih želodca in jeter, in sicer 41 proteinov želodca, 74 proteinov jeter in 2 proteina iz tumorske celične linije AGS. Ugotovljene označevalce smo razvrstili v skupine glede na njihovo potencialno fiziološko relevanco (znani oz. predpostavljeni onkoproteini, tumorje zaviralni proteini) in seveda tudi izvornost. Zato smo jih 92 izločili kot proteine, ki so tudi sicer v organizmu navadno navzoči v velikih količinah (npr. človeški serumski albumin, proapolipoprotein, miozin, aktin, imunoglobulinska veriga J ipd.), vendar z ozirom na njihovo lokacijo nekateri med njimi ostajajo v raziskavi možne specifične vloge pri razvoju

bolezni. Preostale 25 antigenov smo opredelili kot pomembne kandidate za biološke označevalce raka jeter in želodca. Nekateri med njimi so že bili opisani kot udeleženci v razvoju raka prebavil oz. nekaterih drugih vrst raka, ostale pa smo med kandidate uvrstili zaradi značilne vloge v fiziologiji celice (npr. gibljivost, posredovanje sporočil). Trenutno poteka validacija teh označevalcev na transkripcijski (qPCR) in na proteinski ravni (analiza Western). Najbolj obetavne označevalce uporabljamo za povratno selekcijo odgovarjajočih VHH iz zgoraj omenjene pridobljene zaloge rekombinantnih VHH protiteles, kar nam omogoča pridobitev parov »antigen (proteinski označevalec onkogeneze) : protitelo (odgovarjajoči VHH)« in tudi odgovarjajočih VHH cDNA iz knjižnic laminih rekombinantnih VH/VHH. Ker je vsa metodologija dobro utečena, sedaj izvajamo še dodatno presejevanje knjižnic rekombinantnih VH/VHH. Rastoči nabor specifičnih VHH uporabljamo za izgradnjo prototipa proteinske onko-mikromreže, ki bo omogočila določevanje »prstnih odtisov« rakastih tkiv v različnih stopnjah bolezni.

V vzporednem poskusu smo knjižnice laminih rekombinantnih VH/VHH presejali tudi za VHH protitelesa, ki naj bi prepoznala prečiščene že poznane označevalce raka (p53, Bcl2, TGF α , VEGF, IL-6, IL-8), ki smo jih izbrali kot modelne molekule za validiranje naših poskusov. Dejansko nam je na ta način uspelo pridobiti visoko specifična VHH protitelesa proti proteinom p53, Bcl-2 in VEGF, in sicer v nM afinitetni ravni. Omenjena protitelesa smo v kombinaciji z referenčnimi komercialnimi protitelesi uporabili za gradnjo zelo občutljivega sistema detekcije, ki temelji na analizi Biacor oz. površinski plazmonski resonanci.

Namen projekta je bil, kot uvodoma že rečeno, ustvariti izhodišča za izdelavo čim enostavnejšega, vendar učinkovitega diagnostičnega onko-čipa. Izbrani pristop, osnovan na sensoriki s površinsko plazmonsko resonanco (angl. surface plasmon resonance imaging, SPRi), omogoča sočasno in v realnem času izvedljivo kvantifikacijo nekaj sto protein-protein interakcij, brez potrebe po fluorescenčnem ali encimskem označevanju. Na z zlatom prekriti stekleni prizmi smo preizkusili več pristopov imobilizacije komercialno dostopnih monoklonskih protiteles IgG mišjega izvora. Kot najboljši se je izkazal sistem, ki temelji na prekritju nanometrski zlate površine z 18-20 Å alifatskim monoslojem, na katerega smo na nano-razdaljah vezali biotin in nanj streptavidin. Na tako pripravljeno površino smo lahko vezali biotilinirana monoklonska protitelesa. Za vezavo protiteles smo preizkusili različne postopke nanašanja. Ročno nanašanje je ustvarilo oblikovno in velikostno (cca. 1 mm²) heterogene skupke (36 skupkov / 0,5 cm²), čeprav sušenje zaradi njihove velikosti ni bil bistven problem. S kontaktnim igličnim nanašalcem Quiagen 8000 je bilo na enako površino mogoče nanesti 72 skupkov s premerom 150-300 µm, vendar so tudi ti bili heterogeni, velik problem pa je bila vmesna kontaminacija zaradi nezadostnega izpiranja igle med posameznimi koraki nanašanja. Bistveno boljše rezultate je dalo nanašanje z nanašalcema Micro Grid (do 200 homogenih skupkov s premerom po 100 µm) in z nekontaktnim piezo-nanašalcem (pikolitrski volumni protiteles, do 1000 grušč na senzorni površini prizme), vendar je v obeh primerih nastopil velik problem hitrega sušenja nanešenih proteinov (zaradi majhnosti skupkov) in posledično njihove denaturacije (zaradi povečane koncentracije soli). Problema ni rešilo nanašanje v atmosferi z visoko vlažnostjo, saj je v njej na hidrofobni površini prihajalo do fuzije kapljicastih grušč. Majhnost grušč je povzročila tudi kvantitativno heterogenost med gruščami (skupki) in tudi znotraj posamezne grušče, saj je SPRi analiza pokazala tudi razlike v odgovoru med območji posamezne grušče. Razmeroma velika protitelesa IgG (120 kDa) so se tudi medsebojno ovirala, se slabo vezala na majhno površino in so se zato med poskusi z nje izpirala. Vse to je bil razlog, da smo razvili izviren, zgoraj opisani pristop izdelave knjižnic majhnih (15 kDa) rekombinantnih težkoverižnih protiteles. Odpornost VHH na visoke temperature in kemične reagentne kot tudi njihova stabilnost in povratna denaturacija so namreč kvalitete, ki pridejo v poštev pri izdelavi proteinskih oz. protitelesnih čipov (mikromrež), saj imobilizacija konvencionalnih protiteles na površino čipa navadno vodi, kot smo prikazali tudi mi, v njihovo deaktivacijo ali nepovratno denaturacijo. Z zgoraj omenjenimi referenčnimi VHH protitelesi proti proteinom p53, Bcl-2 in VEGF smo izdelali prototip mikromreže, vendar se je v tem primeru pojavil problem njene časovne stabilnosti. Ugotovili smo hitro upadanje aktivnosti imobiliziranih proteinov, do 99% po enotedenskem shranjevanju pri 4°C.

Problemi, povezani s stabilnostjo in specifičnostjo površinske kemije, homogenostjo lis in ohranitvijo vezavnih lastnosti imobiliziranih protiteles, predvsem pa zelo hitro sušenje lis, onemogočajo, da bi proteinske mikromreže postale zanesljivo orodje v klinični proteomiki. Da bi

na tem področju napredovali, smo se v sodelovanju z laboratorijem M. Taussiga z Inštituta Babraham v Cambridgeu odločili izdelati mrežo cDNA, ki temelji na potrjenih vezalcih VH in VHH, dobljenih v naših raziskavah, in to cDNA mrežo uporabiti kot matrico za izdelavo ustrežajočega proteinskega »onko-čipa« s sistemom prepisovanja in prevajanja *in vitro*. Ta nov pristop se ne le izogne potrebi po ločenem izražanju, čiščenju in izdelovanju kopij posameznih proteinov, temveč tudi zniža tveganje za spremembe v funkciji proteinov pri srednje dolgem ali dolgotrajnem shranjevanju. Metoda brezcelične proteinske mreže, ki ji pravimo proteinska mreža *in situ* (angl. protein in situ arrays, PISA) se izvaja s pomočjo združenega brezceličnega sistema (sistem z lizatoma zajčjih retikulocitov TNT ali sistem RTS100 *E. coli* HY), kar pomeni, da proizvedemo proteinske mreže neposredno iz DNA s pomočjo metod PCR in z brezcelično sintezo označenih proteinov na lovilni površini. Novo proizvedeni proteini se ob nastajanju imobilizirajo *in situ*. Pri izdelovanju mrež PISA običajno uporabljamo površine, prevlečene z nikljem, za lovljenje proteinov, označenih s His, kar se dobro ujema z našo strategijo pri pripravi vezalcev VH/VHH. Naše prve poskuse smo usmerili k vzpostavitvi najboljših pogojev za izdelavo mikromrež PISA VH/VHH. Zato smo začeli s protitelesi, ki smo jih v prejšnjih raziskavah že potrdili z komercialno dostopimi antigeni p53, BCL2 in VEGF. Tem poskusom sedaj dodajamo informacije o zaporedju cDNA za protitelesa, ki ustrezajo različno izraženim tumorskim bio-označevalcem, ki jih izbiramo po analizi in potrditvi diferenčno izraženih označevalcev raka želodca oz. hepatokarcinoma.

Vzporedno smo na 30 parih T/N vzorcev, pridobljenih na Onkološkem inštitutu v Ljubljani, izvedli tudi raziskave proteomov s pristopom neposredne diferenčne 2D-elektroforeze, v kombinaciji z masno spektrometrijo. Poleg primerjave proteoma tumorskega tkiva (T) s proteomom okoljnega normalnega tkiva bolnikov (N), smo kot standard pri tej raziskavi upoštevali še proteom želodčnega tkiva zdrave osebe. Tudi v tem primeru smo ugotovili večje število proteinskih podpisov, ki se izražajo v rakastem tkivu. Raziskave smo izvedli v sodelovanju z odsekom Proteomics na ICGEB v Trstu. Ker obstaja možnost, da smo z omenjeno neposredno metodo proteomike zaznali predvsem močno nadizražene proteine v tumorju, medtem ko nam je metoda trikratne obogatitve preko afinitetne kromatografije z laminimi protitelesi (trije ciklični afinitetne preparative s fagnim prikazom in proteinskimi ekstrakti) pokazala sicer tudi nadizražene, vendar tudi strukturno spremenjene proteine, se v nadaljnjih raziskavah posvečamo osvetlitvi te hipoteze. V te raziskave zajemamo tudi VH/VHH proteine, pri katerih smo sicer ugotovili relativno enakost izražanja njihovih antigenov v tumorskih in normalnih tkivih, vendar je SPRi analiza pokazala razlike v afiniteti vezave. V primeru, da bi v naših knjižnicah rekombinantnih VH/VHH odkrili tudi enoverižne hipervariabilne domene, ki specifično vežejo zaradi mutacij strukturno spremenjene antigene (onkoproteine), bi taka protitelesa lahko postala dragoceno orodje za imunoterapijo raka.

Med analizo laminih VHH proteinskih sekvenc pa smo tudi razvili računalniški algoritem, ki temelji na ugotovljeni ko-evoluciji različnih aminokislinskih ostankov na površini protiteles, z aminokislinskimi ostanki, ki so neposredno vpleteni v prepoznavanje antigenov. To odkritje lahko pomeni uvod v novo tehnologijo pridobivanja rekombinantnih protiteles, saj iz aminokislinskega zaporedja protitelesa lahko predvidimo in načrtujemo razpoznavno mesto za specifičen antigen. Splošno znano je, da je prerazporeditev zaporedij variabilnih zank CDR v protitelesih, katerih celotna zaporedja so zapisana v zarodnih celicah, naključen proces, tudi na ravni somatskih hipermutacij. Malo je znanega o tem, kako lahko te hipermutacije, ki povzročijo majhne strukturne spremembe na obrobjih vezavnih mest za antigene, omogočijo povišanje afinitete protiteles za vezavo antigenov. Odkrili smo, da so zamenjave ene same aminokislinske, oddaljene od vezavnega mesta za antigen, sposobne spremeniti specifičnost ali celo izničiti vezavo antigena preko interakcij na dolge razdalje med aminokislinskimi ostanki vezavnega mesta za antigen in oddaljenimi mesti v proteinu. Takšna mreža interakcij kaže na koevolucijski proces vseh vpletenih aminokislinskih ostankov. Namen tega procesa je vzdrževanje strukturne in funkcijske neokrnjenosti protiteles. Naš izvorni pristop z algoritmom za globalno analizo aminokislinskih zaporedij (angl. Global Sequence Signature Analysis, GSS) nam omogoča, da lahko poiščemo globalni sekvenčni odtis glede na enega ali več lokalnih podpisov. Uporabili smo ga za povezavo značilnosti glavnih zank CDR3 z različicami ogrodij protiteles. Pri tem smo odkrili morebitni somatski koevolucijski proces v zorenju imunoglobulinov zaradi ohranjenih interakcij. Za preprost model smo uporabili enoverižna protitelesa lam (v nasprotju s klasičnimi

štiriverižnimi protitelesi) in pokazali, da lahko takšen koevolucijski proces odkrije nepričakovano mrežo interakcij med zanko CDR3 in okoliškim krogom 15 aminokislin. Izdelali smo fizično mrežo kointerakcij aminokislinskih ostankov laminih imunoglobulinskih domen, kjer so aminokislinska zaporedja prikazana s krogom, v katerem so položaji aminokislin natančno določeni. Interakcije med različnimi položaji so označene s črtami, ki prečkajo krog. To odkritje bi lahko bilo uporabno pri načrtovanju terapevtskih protiteles. Algoritem GSS bomo dalje razvijali in »humanizirali« (prilagodili v uporabniku prijazno obliko) za načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov za PCR, s katerimi bi zožali izbor rekombinantnih protiteles z željeno lastnostjo iz knjižnic rekombinantnih protiteles lam.

4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev³

Razvili in objavili smo inovativen pristop izdelave knjižnic rekombinantnih protiteles oz. njihovih hipervariabilnih domen, ki temelji na ko-amplifikaciji oz. ko-ekspresiji VH in VHH, in opisali razmere, ki omogočajo učinkovito pridobivanje visokoafinitetnih in specifičnih enoverižnih VH-oz. VHH-vezalcev onkogenih označevalcev pri hepatokarcinomu in adenokarcinomu želodca (D. Kastelic et al., *J. Immunol. Meth.*, 2009).

Protitelesa, pridobljena z omenjenim pristopom, smo uporabili za afinitetno selekcijo diferencialno izraženih proteinov pri adenokarcinomu želodca in pri hepatokarcinomu. Identificirali smo 117 proteinov, diferencialno izraženih v tumorjih želodca in jeter, in sicer 41 proteinov želodca, 74 proteinov jeter in 2 proteina iz tumorske celične linije AGS. Rezultate s funkcijskimi opisi ugotovljenih proteinskih označevalcev raka bomo v letu 2010 objavili v dveh mednarodnih revijah.

Preliminarni rezultati so skupaj z razvojem nove metodologije pridobivanja enoverižnih VH/VHH protiteles že prikazani v mednarodnem doktorskem delu D. Kastelic (Ljubljana/Orsay, 2009).

Preučili smo dva alternativna pristopa diferenčne 2D-PAGE, in sicer: (a) paralelno 2D-elektroforezo T/N z enotnim barvanjem proteinov, ločenih na dveh gelih; (b) predhodno diferenčno barvanje proteinov T in F z dvema fluorescenčnima barviloma ter skupno 2D-elektroforezo. Prednosti in pomanjkljivosti obeh metod so opisane v diplomskem delu M. Šnajder (2009) in v preglednem članku v *Med. Razgl.* (2008).

Z afinitetno vezavo komercialno dostopnih že poznanih označevalcev raka, ki smo jih izbrali kot modelne molekule za validiranje naših poskusov, smo pridobili visoko specifična VHH protitelesa proti proteinom p53, Bcl-2 in VEGF. Z njimi smo izdelali prototip proteinskega bio-čipa (mikromreže), ki vezavo specifičnih antigenov zaznava s površinsko plazmonsko resonanco (SPRi) in omogoča sočasno ter v realnem času izvedljivo kvantifikacijo nekaj sto protein-protein interakcij, brez potrebe po fluorescenčnem ali encimskem označevanju.

Izdelali smo algoritem za globalno analizo aminokislinskih zaporedij (angl. Global Sequence Signature Analysis, GSS), ki omogoča, da lahko poiščemo globalni sekvenčni odtis glede na enega ali več lokalnih a.k. podpisov. Odkritje bi lahko bilo uporabno pri načrtovanju terapevtskih protiteles oz. za načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov za PCR, s katerimi bi zožali izbor rekombinantnih protiteles z željeno lastnostjo iz knjižnice rekombinantnih protiteles lam. Odkritje strukturne koevolucije VHH bomo po ohrabrujočih preliminarnih uredniških odzivih poskusili v kratkem objaviti v vrhunski reviji *Nature Structural Biology*.

Ocenjujemo, da so bili cilji projekta doseženi in da predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnje raziskave izdelave stabilnega diagnostičnega proteinskega onko-čipa z metodologijo PISA.

5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta⁴

Večjih sprememb programa raziskovalnega projekta ni, lahko pa govorimo o njegovi razširitvi, saj smo z na novo razvitim računalniškim algoritmom ugotovili ko-evolucijo različnih aminokislinskih ostankov na površini protiteles z aminokislinskimi ostanki, ki so neposredno

vpleteni v prepoznavanje antigenov. Zato bomo v prihodnosti raziskavo širili na preučitev te hipoteze, ki bi ob potrditvi odprla možnosti za novo tehnologijo načrtovanja in prodobivanja specifičnih rekombinantnih protiteles.

Kemijo vezave VH protiteles na zlato podlago (zlata prevleka na prizmi za bio-čip s sensoriko na osnovi površinske plazmonske resonance) smo sicer preučili, vendar so najnovejši poskusi pokazali, da se VHH protitelesa (za razliko od VH protiteles) pri tem preveč konformacijsko spremenijo, da bi ohranila afiniteto vezave antigenov. Zato smo za rešitev tega problema raziskovanje razširil z alternativnim pristopom, ki zajema izdelavo matričnega cDNA-čipa in nato iz njega z *in situ* / *in vitro* transkripcijo & translacijo odtis bio-čipa rekombinantnih protiteles, za kar smo vzpostavili sodelovanje z Babraham Institute v Cambridge-u v V. Britaniji, ki omenjeno tehnologijo obvladuje.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni rezultat			
1.	Naslov	SLO	Predlog načrtovanja in uporabe kombinacije multiplih označevalcev za natančnejšo diagnostiko in prognozo onkogeneze.
		ANG	Proposal of experimental design and use of multiple markers to improve accuracy of diagnosis and prognosis of oncogenesis.
	Opis	SLO	K naši objavi so trije poznani ameriški znanstveniki (J.S. Alexander, J.M. Mathis, K. Pruitt) iz LSU Health Sciences Center, Shreveport, LA, 71130, U.S.A., v isti reviji napisali uvodni članek, v katerem so izpostavili naš opis kako status tumorja in bolnikovo preživetje sovpadata z multiplimi označevalci mikrosatelitske nestabilnosti (MSI) in izgube alelne heterozigotnosti (LOH), in kako te označevalce lahko uporabimo v prognozi. S študijo smo izzvali koncept uporabe enega samega ali samo nekaj prognostičnih označevalcev in ponudili koncept uporabe multiplih označevalcev.
		ANG	An introductory article to our paper was written by three eminent American scientists (J.S. Alexander, J.M. Mathis, K. Pruitt) from LSU Health Sciences Center, Shreveport, LA, 71130, U.S.A. It was pointed out that we have investigated how tumor status and patient survival is correlated with multiple markers of MSI and LOH, and how these markers can be used prognostically. A major aim of the study was to challenge the concept of the use of single or few prognostic markers in favor of multiple markers.
	Objavljeno v	GAZVODA Barbara, JUVAN Robert, ZUPANIČ-PAJNIČ Irena, REPŠE Stanislav, FERLAN-MAROLT Vera, BALAŽIČ Jože, KOMEL Radovan: Genetic changes in Slovenian patients with gastric adenocarcinoma evaluated interms of microsatellite DNA. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 2007, vol. 19, no. 12, p. 1082-1089.	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
	COBISS.SI-ID	3688986	
2.	Naslov	SLO	Nova metoda za funkcijsko analizo patogenih mutacij v sistemu popravljanja napak DNA pri človeku.
		ANG	Novel method for the functional analysis of pathogenic mutations of the human DNA mismatch repair system.
	Opis	SLO	Opisali smo nov pristop za natančno funkcijsko ocenjevanje mutacij gena hMLH1 in vivo, ki temelji na koekspresiji človeških genov MLH1 in PMS2 v kvasnih celicah. Kromosomska integracija obeh genov v kvasni genom zagotavlja ekspresijo pod nadzorom ortolognih kvasnih promotorjev ter enotno genetsko ozadje za vse teste. Sistem je uporaben za funkcijsko karakterizacijo vseh variant pri bolnikih z rakom, najdenih po celotnem kodirajočem območju gena. Natančna kvantifikacija MLH1 variant je kritična za učinkovito zgodnjo diagnostiko in prognozo, kot tudi za genetsko svetovanje bolnikom.
		We described a novel approach to determine accurately the functional significance of hMLH1 mutations in vivo, based on co-expression of human MLH1 and PMS2 in yeast cells. With chromosomal integration of the genes in	

		ANG	the yeast, expression of both human genes was controlled by the orthologous yeast promoters and unique genetic background was assured for all variants tested. Our yeast-based in vivo system may thus be used for functional characterization of variants in cancer patients found throughout the entire coding region of the gene including those with incomplete clinical data.
	Objavljeno v		Vogelsang Matjaž, Comino Aleksandra, Zupanec Neja, Hudler Petra, Komel Radovan: Assessing pathogenicity of MLH1 variants by co-expression of human MLH1 and PMS2 genes in yeast. BMC Cancer, 2009, vol. 9, no. 382, p. 1-9.
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		4304666
3.	Naslov	SLO	Pregledni članek in podatkovna baza o eritropoetskem receptorju (EpoR).
		ANG	Review and data base on the erythropoietin receptor (EpoR).
	Opis	SLO	Eritropoetin (Epo) igra številne vloge tudi izven hematopoeze. Epo in EpoR so ugotovili v številnih ne-hematopoeznih celicah in tkivih, receptorje (EpoR) tudi pri različnih tipih tumorjev in malignih celic. Pri tem vloga Epo in EpoR pri razvoju raka še vedno ni docela pojasnjena. Napisali smo kombinacijo preglednega članka in podatkovne baze o receptorju Epo. Podatkovna baza vsebuje aktivne povezave z drugimi bazami podatkov in spletnimi stranmi.
		ANG	Erythropoietin (Epo) appears to have multiple functions outside of hematopoiesis. Epo and its receptors (EpoR) have been identified on several non-hematopoietic cells and tissues. EpoRs have been found on several types of tumors and malignant cells. However, research regarding the role of Epo and EpoR in cancer is sometimes contradictory. Our data base associated review on EpoR is offering active links to a number of different data bases and web pages.
	Objavljeno v		DEBELJAK Nataša, SYTKOWSKI Arthur J.: EpoR. Nature (Basingstoke, Online), 2007, vol. 425, p. [1-11].
	Tipologija		1.02 Pregledni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		23209945
4.	Naslov	SLO	Analiza stanja in novi predlogi za uporabo rekombinantnega eritropoetina.
		ANG	State-of-the-art analysis and novel suggestions to improved molecular design and therapeutic alternatives of rhuEpo.
	Opis	SLO	Prikazani so novi pristopi za povečanje učinkovitosti rekombinantnega Epo pri lažšanju anemij, povezanih z rakom in drugimi boleznimi, in sicer s posegi v zgradbo proteina kot tudi z razvojem novih Epo- podobnih ali Epo-mimetičnih učinkovin. Vse predloge povezujemo z ugotovitvami možne vloge eritropoetina kot signalne molekule pri nekaterih vrstah raka, kar vzbuja previdnost v medicinskih krogih, posledica pa je tudi strožji nadzor nad uporabo omenjenih zdravil.
		ANG	Efforts to increase efficacy of recombinant Epo in corecting anemias associated with cancer and other diseases, by manipulating the protein's structure have met with some success, and novel Epo-like agents as well as Epo mimetic agents are in development. The demonstration that Epo can trigger signaling in some cancer cells with, potentially, adverse effects on patient health has raised warning signs in the medical community and has gained the attention of regulatory authorities.
	Objavljeno v		DEBELJAK Nataša, SYTKOWSKI Arthur J.: Erythropoietin: new approaches to improved molecular designs and therapeutic alternatives. Curr. Pharm. Des., 2008, vol. 14, no. 13, p. 1302-1310.
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		24260313
5.	Naslov	SLO	Nov postopek izdelave knjižnic rekombinantnih protiteles za selekcijo in učinkovito proizvodnjo VH-vezalcev proteinskih označevalcev raka.
		ANG	New procedure of recombinant library construction for selection of efficiently produced VH binders directed against cancer markers.
			Težko-verižna protitelesa so ob konvencionalnih IgG naravno prisotna v kamelidih (kamele in lame). Proti ustaljenemu prepričanju smo pokazali, da s ko-amplifikacijo cDNA in z učinkovito selekcijo lahko preprečimo zlepljanje in učinkovito pridobimo hipervariabilne domene obeh vrst protiteles (VHH, VH).

Opis	SLO	Lamini VH izkazujejo veliko sekvenčno in strukturno homologijo s človeško skupino III VH, zato so zelo zanimivi za terapevtske aplikacije (imunoterapija in zdravljenje raka), medtem ko so majhni in stabilni VHH primerni za imobilizacijo na trdne površine pri izdelavi proteinskih mikromrež.
	ANG	Both heavy chain antibodies and conventional IgGs are naturally occurring in camelidae (camels and llamas). We have shown that in contrast to usual finding, aggregation can be prevented and hypervariable domains (VHHs and VHs) of both antibody types can be efficiently produced via co-amplification of VH and VHH cDNAs. Llama VHs show high sequence and structural homology with the human VH III group constituting very interesting agents in (immuno)therapeutic applications in cancer, whereas small and stable VHHs can be efficiently immobilized on a solid support of a protein microarray.
Objavljeno v	Kastelic D., Frković-Grazio S., Baty D., Truan G., Komel R., Pompon D.: A single-step procedure of recombinant library construction for the selection of efficiently produced llama VH binders directed against cancer markers. J. Immunol. Methods, 2009, vol. 350, p. 54-62.	
Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
COBISS.SI-ID	26129369	

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine⁶

Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat		
1.	Naslov	SLO Vodenje interdisciplinarne in medinstitucionalne programske skupine
		ANG Heading an interdisciplinary and interinstitutional research group
Opis	SLO	P1-0104 "Funkcijska genomika in biotehnologija za zdravje" je ena od najuspešnejših programskih skupin na področju ved o življenju, ki je poleg številnih znanstvenih objav, slovenskemu zdravstvu dala molekularno diagnostiko bolezni, forenziki sodoben pristop z analizo DNA in farmacevtski industriji prva »slovenska« biološka zdravila. Je resnično medinstitucionalna in interdisciplinarna, saj v svoji sestavi povezuje dve ustanovi – univerzo (MF UL, Medicinski center za molekularno biologijo - MCMB) in javni raziskovalni inštitut (KI, Laboratorij za biosintezo in biotransformacije - L11).
	ANG	P1-0104 "Functional Genomics and Biotechnology for Health" is one of the best Life Sciences programme research groups. In addition to numerous scientific publications, it introduced molecular genetic analysis in Slovenian medical science and practice and forensic medicine, and contributed pharmaceutical industry with first "Slovenian" biological drugs. This is truly an interinstitutional and interdisciplinary group, harbouring research groups from Faculty of Medicine UL (Medical Centre for Molecular Biology, MCMB) and National Institute of Chemistry (L11 – Biosynthesis and Biotransformation).
Šifra	D.07 Vodenje centra/laboratorija	
Objavljeno v	<p>PREDSTAVITEV NAJBOLJŠIH RAZISKOVALNIH PROGRAMSKIH SKUPIN V LETU 2004</p> <p>ARRS: http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rprog/najboljsi.asp; http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rprog/gradivo/inc/Naj-razisk-prog-2004.pdf</p> <p>DEMŠAR, Franci, FERLIGOJ, Anuška, GRDINA, Igor, KOMEL, Dean, KRAŠOVEC, Jože, MAJCEN, Jože. Raziskovalne programske skupine v letu 2004 : Oddaja Studio ob sedemnajskih : Tedenski aktualni mozaik : Radio Slovenija : I. program. Ljubljana, 31.VIII.2005.</p>	
Tipologija	1.25 Drugi članki ali sestavki	
COBISS.SI-ID	604748	
2.	Naslov	SLO Ustanovitev in vodenje Centra odličnosti "Biotehnologija s farmacijo" (CO BF)
		ANG Establishment and Coordination the Centre of Excellence "Biotechnology with Pharmacy" (CoE BP)
	Virtualni center odličnosti Biotehnologija s farmacijo (CO BF), ki je bil ustanovljen leta 2004, je ob koncu leta 2008 zaključil prvo obdobje svojega	

Opis	SLO	delovanja, sofinancirano s sredstvi Evropskega sklada za regionalni razvoj (ESRR). Strateški cilj Centra z 19 partnerji iz univerze, raziskovalnih inštitutov, zdravstvenih ustanov, S&M podjetij in farmacevtske industrije, je bil premagovanje medinstitutskih ovir in s tem dolgoročno povezovanje ter nadgradnja in zagotavljanje infrastrukture, tehnologij in vrhunskih znanj, kar naj bi ustvarilo inovacijsko okolje, primerljivo z ostalimi državami EU.
	ANG	Virtual Centre of Excellence Biotechnology with Pharmacy (CoE BP) in 2008 celebrated the end of first period of his activity, co-financed by European Structural Funds for Regional Development (ESRD). Strategic aims of the Centre, associating 19 partners from the university, research institutes, clinics, SMEs and pharmaceutical industry, were overcoming interinstitutional barriers in order to assure long-term cooperation, and up-grade / purchase and maintain infrastructure, technologies and top expertises to create innovative environment, comparable with other advanced countries in EU.
Šifra	D.02 Ustanovitev raziskovalnega centra, laboratorija, študija, društva	
Objavljeno v	Rezultati 2004-08: skupni RR projekti (SLO, EC); nakup sklopov opreme - iniciacija izgradnje postgenomske infrastrukture; izgradnja nacionalnega Centra za funkcijsko genomiko in bio-čipe; prva slovenska biološka zdravila; prvi bio-čip; prva transgenska žival; 478 člankov sodelavcev CO v SCI-revijah; 23 mednarodnih patentov. http://www.centriodl.si/ KOMEL R. Odmev: kaj je pokazala naša analiza. Znanost, 8.10.2009, letn. 51, št. 233, str. 24. http://www.delo.si/tiskano/html/20091008/Delo	
Tipologija	1.04 Strokovni članek	
COBISS.SI-ID	26128857	
3. Naslov	SLO	Članstvo v organu vrhunske mednarodne znanstvene ustanove
	ANG	Članstvo v organu vrhunske mednarodne znanstvene ustanove Membership in the body of a top international research institution
Opis	SLO	ICGEB CSA (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, 81 držav članic): R.Komel - član 15-članskega Znanstvenega sveta ICGEB (CSA - Council of Scientific Advisers; tretji mandat 2009 ...). Člani CSA so sicer mednarodno uveljavljeni znanstveniki, med njimi sta tudi dva Nobelova nagrajenca. Sodelovanje pri razvoju mednarodne znanstvene politike na področju genskega inženirstva in nove biotehnologije.
	ANG	ICGEB CSA (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, 81 member states): R.Komel - member of ICGEB CSA - Council of Scientific Advisers; third mandate since November 2009). Members of CSA are 15 scientists with international reputation, among them two Nobel Price winners. Contribution to international policy and scientific development in the field of genetic engineering and new biotechnology.
Šifra	D.03 Članstvo v tujih/mednarodnih odborih/komitejih	
Objavljeno v	http://www.icgeb.trieste.it/council-of-scientific-advisers.html http://www.icgeb.trieste.it/council-members.html KOMEL Radovan: Priložnosti za vključitev v evropske raziskave je veliko : [za majhne države je pomembno mednarodno sodelovanje na znanstvenih področjih, saj tako pridobijo več finančnih sredstev in nova spoznanja]. Finance, 16. februar 2006, št. 32(2219), str. 24.	
Tipologija	1.22 Intervju	
COBISS.SI-ID	3461658	
4. Naslov	SLO	Organizacija znanstvene konference
	ANG	Organization of scientific conference
Opis	SLO	R Komel je bil predsednik organizacijskega odbora SBD združenega mednarodnega kongresa "Otočec 2009" (Slovensko Biokemijsko Društvo & Društvo Genetikov Slovenije), 20.-23. september 2009, Otočec, Slovenija. http://ibk.mf.uni-lj.si/otocec2009 . Konference se je udeležilo preko 320 raziskovalcev iz 12 držav.
		R Komel was a Co-President of the joint International Congress "Otočec

	ANG	2009" (Slovenian Biochemical Society & Genetics Society of Slovenia), September 20–23, 2009, Otočec, Slovenia. http://ibk.mf.uni-lj.si/otocec2009 . The meeting hosted over 320 participants from 12 countries.
Šifra	B.01	Organizator znanstvenega srečanja
Objavljeno v		http://ibk.mf.uni-lj.si/otocec2009 http://ibk.mf.uni-lj.si/otocec2009/sponzorji/vabilo.doc KOMEL Radovan. Pogledi na sodobno znanost: intervju v radijski oddaji, Radio Slovenia, program ARS, 9.10.2009 ob 13.05 uri. 2009; Ljubljana.
Tipologija	1.22	Intervju
COBISS.SI-ID		26127833
5. Naslov	SLO	Lapanjetova nagrada za vrhunske dosežke na področju biokemijskih znanosti
	ANG	Lapanje Award for outstanding achievements in biochemical sciences
Opis	SLO	V počastitev 25. obletnice delovanja Slovenskega biokemijskega društva je društvo leta 2008 prvič podelilo društvena priznanja, poimenovana po prof. dr. Savu Lapanjetu, ki je bil eden od začetnikov moderne biokemije v Sloveniji. Lapanjetova nagrada je strokovno priznanje, ki ga društvo podeli članu za vrhunske dosežke na področju biokemijskih znanosti na znanstveno-raziskovalnem ali pedagoškem področju, s katerimi je pomembno prispeval k razvoju biokemijskih znanosti v slovenskem in mednarodnem prostoru. Prvo Lapanjetovo nagrado je prejel prof. dr. Radovan Komel.
	ANG	In honor of the 25th anniversary of the Slovenian Biochemical Society, the association in 2008 awarded for the first time a recognition named after prof. dr. Savo Lapanje who was one of the pioneers of modern biochemistry in Slovenia. Lapanje Award is professional recognition given to society member for outstanding achievements in the field of biochemical sciences in research or teaching area, for significant contribution to the development of biochemical sciences in the Slovenian and the international arena. The Lapanje price was delivered to prof. dr. Radovan Komel.
Šifra	E.01	Domače nagrade
Objavljeno v		http://web.bf.uni-lj.si/bi/biokemija/SBD/arhiv.htm ANDERLUH Gregor, DOLINAR Marko, CIGIČ Blaž, DROBNIČ-KOŠOROK Marinka, KREGAR Igor, KRIŽAJ Igor, POKLAR ULRIH Nataša, PUNGERČAR Jože, RENKO Metka, ROZMAN Damjana, TURK Vito, ZORKO Matjaž, ŽAKELJ-MAVRIČ Marija: Petindvajset let Slovenskega biokemijskega društva. Ljubljana: Slovensko biokemijsko društvo, 2008. 80 str., ilustr. ISBN 978-961-91651-4-0.
Tipologija	2.25	Druge monografije in druga zaključena dela
COBISS.SI-ID		242021376

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine^Z

Članica projektne skupine doc. dr. Nataša Debeljak je sicer tudi nosilka projekta J3-0124 (Vpliv rekombinantnega humanega eritropoetina na izražanje genov in prenos signala pri raku na dojkah; trajanje 2008 - 2011), ki med drugim zajema tudi preučevanje celostnega izražanja genov, vključenih v angiogenezo, proliferacijo in apoptozo. Ta raziskava je tudi v interesu našega projekta oz. njegovega nadaljevanja, saj ima potencial identifikacije zanimivih označevalcev karcinogeneze. Prepletanje obeh raziskav v skupni programski skupini smo prikazali tudi z navedbo nekaterih pomembnejših rezultatov skupnega raziskovanja.

Vzpostavili smo dobro delujočo mrežo mednarodnega sodelovanja, ki omogoča učinkovito nadaljevanje, nadgradnjo in zaključek v tem projektu začetih in razvitih raziskav. Pri ARRS smo zato na razpis za projekte v letu 2010 prijavi vlogo za "veliki projekt" z naslovom "Pridobivanje visokospecifičnih protiteles za iskanje proteomskih označevalcev onkogeneze". Vloga je bila v I. fazi ocenjevanja ocenjena z oceno odlično in je med 846 ocenjevanimi projekti na celotnem področju znanosti bila uvrščena med 8 najvišje ocenjenih vlog. V drugi fazi ocenjevanja (221 ocenjevanih prijav) je projekt s strani tujega recenzenta A prejel odlično oceno, recenzent B pa mu je s slabo utemeljeno nižjo oceno zmanjšal konkurenčnost, kar je v luči znižanja razpisnih

sredstev za več kot polovico (med samim potekom razpisa) imelo za posledico nesprejetje projekta v financiranje. Kljub pomanjkanju sredstev bomo raziskave nadaljevali v okviru raziskovalnega programa P1-0104 »Funkcijska genomika in biotehnologija za zdravja«. Doseženi rezultati pa so vzbudili pozornost na mednarodni ravni; sprejeli smo povabilo za vabljen predavanje na svetovni konferenci WCC (BIT's 3rd World Cancer Congress), ki bo junija letos v Singapuru, v teku pa so tudi preliminarni pogovori s tujo farmacevtsko družbo, ki projekt našega nadaljnjega raziskovanja ocenjuje kot zelo perspektiven.

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

9.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Namen projekta je odkritje novih proteinskih označevalcev, ki so značilni za različne razvojne stopnje adenokarcinoma želodca in predrakastih lezij. Te bi v nadaljevanju, skupaj z že poznanimi označevalci, uporabili za oblikovanje proteinskega onko-čipa, uporabnega v diagnostiki za zgodnje odkrivanje vzorcev diferencialno izraženih proteinov, ki naj bi predstavljali specifičen podpis razvojne stopnje raka. Pričakujemo boljši vpogled v molekulske mehanizme onkogeneze in izboljšanje nabora molekulskih označevalcev za normalna in patološka fiziološka stanja. Razviti proteinski čip bo omogočil razvoj nadaljnjih raziskav in bo prototip za komercialne diagnostične čipe.

Med analizo laminih VHH proteinskih sekvenc pa smo tudi razvili računalniški algoritem, ki temelji na ugotovljeni ko-evoluciji različnih aminokislinskih ostankov na površini protiteles z aminokislinskimi ostanki, ki so neposredno vpleteni v prepoznavanje antigenov. To odkritje lahko pomeni uvod v novo tehnologijo pridobivanja rekombinatnih protiteles, saj iz aminokislinskega zaporedja protitelesa lahko predvidimo in načrtujemo razpoznavno mesto za specifičen antigen.

Visokospecifična protitelesa oz. njihove enoverižne variabilne domene sodijo med visoke prioritete raziskovanja na področju molekularne onkologije, zaradi pričakovane uporabnosti v imunoterapiji oz. zdravljenju raka kot tudi pri razvoju novih, natančnejših diagnostičnih metod.

ANG

The aim of the project was selection of new protein markers for the different development stages of stomach adenocarcinoma and its precancerous lesions, and use of these markers in conjunction with classical markers for the design of a protein onco-chip usable as a diagnostic tool for early detection of differential expression patterns of proteins constituting specific signatures in cancer. Results will provide a better basic insight into molecular mechanisms of cancerogenesis and will allow to define a new set of markers corresponding to normal and pathologic physiological states. Developed protein chip will represent valuable prototype for further development of investigative or commercial diagnostic microarrays.

When analysing llama VHH protein sequences we developed a computer algorithm based on the discovery of co-evolution of amino acid residues located on the antibody surface, with certain a.a. residues directly implicated in antigen recognition. This discovery could have a high value in recombinant antibody technology, since we can predict and design antigen recognition site from amino acid sequence of an antibody.

Highly specific antibodies and/or their hypervariable single-chain domains belong to top priority research in molecular oncology, because of the expected usefulness in immunotherapy and cancer treatment as well as in design and development of new accurate diagnostic procedures.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Proteomski pristop pri iskanju specifičnih označevalcev onkogeneze v slovensko medicino uvaja nove metode post-genomske znanosti. Boljši vpogled v molekulske mehanizme onkogeneze in izboljšanje nabora molekulskih označevalcev za normalna in patološka fiziološka stanja ponujata možnosti za učinkovitejše zgodnje odkrivanje raka, napovedovanje in spremljanje poteka bolezni ter izboljšane pristope k zdravljenju (osebna medicina). Razvoj proteinske mikromreže je interdisciplinaren, saj združuje pristope funkcijske genomike, medicinske molekularne biologije, nanotehnologije in bioinformatike. Proteinski čipi bodo omogočili razvoj nadaljnjih in bolj poglobljenih raziskav na področju onkologije in bodo prototip za komercialne

diagnostične čipe. Projekt ustvarja možnosti za postavitev spin-off podjetij, ki bi lahko razvijala omenjena diagnostična in terapevtska orodja.

ANG

Proteomic approach for looking for specific markers of oncogenesis is introducing new methodology of the post-genomic science to Slovenian medical research and practice. Better insight into molecular mechanisms of oncogenesis and improved selection of markers corresponding to normal and pathologic physiological states will offer possibilities for more efficient early detection of cancer, prediction and follow-up of the disease, and also better therapeutic approach. The interdisciplinary development of a protein microarray is associating approaches of functional genomics, medical molecular biology, nanotechnology and bioinformatics. The developed bio-chips will allow further improvement of research in molecular oncology and will represent valuable prototypes for commercial diagnostic microarrays. The project is also creating starting positions for creation of spin-offs for the development of new diagnostic and therapeutic tools.

10. 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 <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
F.04	Dvig tehnološke ravni
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
F.06	Razvoj novega izdelka
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljaljskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

Rezultat	<input type="text"/>
Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

Komentar

11. Samo za aplikativne projekte!

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	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.02.	Izoljšanje vodenja in upravljanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izoljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

G.04.06.	Drugo:		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture						
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.02.	Prometna infrastruktura		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.03.	Energetska infrastruktura		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.04.	Drugo:		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.09.	Drugo:		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

Komentar

--

12. Pomen raziskovanja za sofinancerje, navedene v 2. točki¹¹

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
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

Podpisi:

Radovan Komel	in	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseba RO

Kraj in datum:

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2010-1/169

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

Zaključno poročilo o rezultatih raziskovalnega projekta

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):

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 Navedite rezultate raziskovalnega projekta v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

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

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

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

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

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2010 v1.00a

61-5F-0E-E5-31-F6-C7-53-9D-A5-7D-DF-51-E0-D6-6F-66-20-30-39