

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2016/23



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	Z4-5523
Naslov projekta	Inducirane pluripotentne matične celice pri kozi.
Vodja projekta	28505 Jernej Ogorevc
Tip projekta	Zt Podoktorski projekt - temeljni
Obseg raziskovalnih ur	3400
Cenovni razred	B
Trajanje projekta	08.2013 - 07.2015
Nosilna raziskovalna organizacija	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.02 Živalska produkcija in predelava 4.02.01 Genetika in selekcija
Družbeno-ekonomski cilj	
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	4 Kmetijske vede 4.02 Znanosti o živalih in mlekarstvu

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

2. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Pluripotentne matične celice so nespecializirane celice, ki lahko tekom razvoja in rasti tvorijo vse celične tipe odraslega organizma. Do leta 2006 jih je bilo mogoče pridobiti le iz zarodkov v zgodnjih stopnjah razvoja (embrionalne matične celice – EMC). Takšno pridobivanje EMC je bilo uspešno pri človeku in glodavcih, medtem ko pri domačih živalih izolacija in vzdrževanje embrionalnih matičnih celic ni bila uspešna. Posledica

tega je, da pri domačih živalih nimamo na voljo etabliranih celičnih linij embrionalnih matičnih celic.

Leta 2006 je raziskovalcem prvič uspelo reprogramirati somatske celice z metodo direktnega reprogramiranja, in pridobiti t.i. inducirane pluripotentne matične celice (iPMC). iPMC pridobimo iz odraslih somatskih celic z ektopično indukcijo izražanja določenih transkripcijskih faktorjev. Razvoj te metode je omogočil pridobivanje pluripotentnih celic tudi pri različnih vrstah domačih živalih, kjer le-te (EMC), do takrat niso bile na voljo.

iPMC so avtologne donorskim (somatskim) celicam in predstavljajo velik aplikativni potencial za razvoj regenerativne medicine, modeliranje bolezni, razvoj in testiranje zdravil ter bazične raziskave v medicini. Molekularni mehanizmi, pomembni za procese diferenciacije in de-diferenciacije, ostajajo v veliki meri nepojasneni in jih je potrebno pred uporabo iPMC v humani medicini dodatno raziskati. Pri domačih živalih so zato iPMC zlasti pomembne za razvoj živalskih modelov za predklinične raziskave na področju regenerativne medicine. Druga aplikativna možnost je priprava transgenih živali, z jedrnim prenosom genetsko spremenjenih pluripotentnih matičnih celic v jajčno celico ali s komplementacijo le-teh v blastocisto. Takšne živali bi bile lahko uporabne v kmetijstvu ali kot bioreaktorji za izražanje rekombinantnih proteinov v biofarmaciji (npr. uporaba ekspresijskega sistema v mlečni žlezi, kjer lahko rekombinantne proteine relativno lahko izoliramo iz mleka). Preden pa bo mogoče docela izkoristiti njihov potencial, je potrebno podrobno pojasniti in razumeti procese reprogramiranja in razviti varne metode reprogramiranja.

Večina raziskav kot vir donorskih celic uporablja fibroblaste, ker so lahko dostopni in jih je lahko vzdrževati v kulturi. O možnosti direktnega reprogramiranja ostalih celičnih tipov ni veliko znanega. Ker je bila možnost reprogramiranja celic mlečne žleze pri prežvekovalcih že dokazana (kloniranje ovce Dolly z metodo jedrnega prenosa epitelne celice mlečne žleze) je bil namen projekta raziskati ali je epitelij mlečne žleze primeren celični tip za direktno reprogramiranje in vnos katerih transkripcijskih faktorjev oz. drugih molekul je potreben za reprogramiranje. Cilj projekta je bil ustvariti linijo induciranih pluripotentnih celic iz primarne celične kulture kozje mlečne žleze in ugotoviti ali reprogramirane celice ustrezajo vsem značilnostim pluripotentnih matičnih celic.

ANG

Stem cells are unspecialized cells that can evolve in different cell types during development and growth of an organism. Until 2006 they could be isolated from inner cell mass of early stage embryos (embryonic stem cells – ESC). Embryonic stem cell (ESC) lines were established in mouse, and subsequently in human. In contrast, derivation of ESCs from embryos of farm animal species was inefficient. Accordingly, there are no established pluripotent stem cell lines available in farm animals.

In 2006 researchers developed a method for direct reprogramming of somatic cells. The so called induced pluripotent stem cells (iPSCs) are generated from adult somatic cells by ectopic expression of certain transcription factors. Development of this method enabled generation of pluripotent cells also in farm animals where such (ESC) cell lines were not available.

iPSCs are autologous to donor-somatic cells and represent a great potential for use in regenerative medicine, disease modelling, drug testing, and basic research in medicine. However, molecular mechanisms behind the reprogramming process remain largely unknown and hamper generation of *bona fide* iPSCs and their use in human clinical practice. Large animal models are essential to expand the knowledge obtained on rodents and facilitate development and validation of transplantation therapies in preclinical studies. Additionally, transgenic animals with special traits could be generated from genetically modified pluripotent cells, using advanced reproduction techniques (SCNT, blastocyst complementation). Such transgenic animals could improve agricultural production or be used as bioreactors for production of recombinant proteins (e.g. use of

transgenic milk expression systems, which allows recombinant proteins to be relatively easy isolated from milk). However, there are still many obstacles to overcome. First, it is necessary to reveal and understand reprogramming process and develop methods that will allow generation of genetically and epigenetically stable iPSCs without tumorigenic potential.

Most of the research has been done using fibroblasts as donor cells for reprogramming experiments, because fibroblasts are easily accessible and maintained in culture. There are almost no literature reports about reprogramming other cells types. Because the ability of reprogramming has been proven for ruminant mammary epithelial cells (cloning of Dolly by using SCNT of mammary epithelial cell) the goal of this project was to determine whether mammary epithelial cells are suitable cell type for direct reprogramming, and ectopic expression of which transcription factors is necessary to achieve it. The idea was to establish iPSC lines from primary culture of goat mammary epithelial cells and determine whether reprogrammed cells show characteristics of pluripotent cells.

3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

Delo opravljeno na podoktorskem raziskovalnem projektu je obsegalo naslednje sklope:

1. Vzpostavitev in karakterizacija celične linije kozjih epitelnih celic mlečne žleze

Kot vir donorskih celic za reprogramiranje sem uporabil linijo primarnih epitelnih celic mlečne žleze, ki sem jo pripravil iz tkiva mlečne žleze. Kot vir tkiva sem uporabil mlečne žleze iz trupov klavnih živali, ga mehansko tretiral in razgradili v raztopini kolagenaze in hialuronidaze ter nacepil v plastične posodice. Na ta način sem pridobil večje število primarnih celičnih kultur iz živali v različnih fizioloških stanjih (juvenilna koza, koza v laktaciji in koza v involuciji). Celične kulture so dobro uspevale in ohranjale proliferacijski potencial tekom večjega števila pasaž.

Med pripravo tkivnih kultur se je izkazalo, da je karakterizacija celičnih kultur zahtevnejša od pričakovanj. Primarne kulture je sestavljalo več morfološko različnih celičnih tipov. Za določitev posameznih tipov je bila potrebna obsežna karakterizacija primarne kulture. Dodatno težavo je predstavljalo dejstvo, da proti kozjim antigenom ni na voljo komercialno pripravljenih protiteles, zato je bilo potrebno testirati večje število protiteles pripravljenih proti antigenom sorodnih vrst. Nekatera od njih so delovala tudi proti antigenom prisotnim v celicah kozje mlečne žleze. Z uporabo imunobarvanja proti prisotnosti večjega števila antigenov (Slika 1), analizo izražanja mRNA in analizo morfoloških značilnosti sem zaključil, da celično kulturo sestavljajo pretežno tipi epitelnih celic in fibroblasti. Z uporabo diferenčne tripsinizacije mi je uspelo pridobiti "čisto" linijo epitelnih celic, vendar pa je karakterizacija pokazala, da so tudi celice epitelnega tipa heterogene. Z dodatno karakterizacijo sem uspel ločiti luminalni in mioepitelni celični tip. V kulturi sem potrdil prisotnost mlečnih kazeinskih proteinov, kar je nedvoumen dokaz, da so v kulturi prisotne luminalne celice. Dodatek laktogenih hormonov v gojišče in gojenje celic na ekstracelularnem membranskem matriksu je v nekaterih primerih specifično značilno povečalo izražanje beta-kazeina, kar kaže na to, da pogoji v kulturi bistveno vplivajo na stopnjo diferenciacije celic. Tako tudi znotraj luminalnega tipa obstajajo celice, ki izražajo različne hormonske receptorje (npr. estrogen in progesteron receptor) oz. kombinacije receptorjev.

Na področju karakterizacije epitelnih celic mlečne žleze je bil storjen pomemben korak, saj sem razvil postopke, ki omogočajo ločevanje celičnih tipov in ugotavljanje izražanja označevalcev, povezanih z diferenciacijo epitelnih celic mlečne žleze. Tekom karakterizacije sem ugotovil, da je v primarni kulturi mlečne žleze težko pridobiti in vzdrževati homogeni celični tip, saj se v kulturi nahajajo številne celice epitelija v različnih stopnjah diferenciacije, hkrati pa v kulturi potekajo tranzicije med celičnimi tipi (npr. epitelnih v mezenhimske).

2. Določitev stopnje endogenega izražanja faktorjev pluripotentnosti v primarni epitelni celični kulturi mlečne žleze

Naslednji korak je bila določitev stopnje endogenega izražanja transkripcijskih faktorjev, ki so povezani s pluripotentnostjo in določitev vpliva stopnje diferenciacije celic v primarni kulturi na njihovo izražanje. S pregledom transkriptomskih podatkov, pridobljenih s sekvenciranjem RNA epitelnega celičnega tipa mlečne žleze, ki so že bili na voljo, sem ugotovil prisotnost transkripcijskih faktorjev MYC in KLF4. Za podrobnejšo analizo določitve endogenega izražanja v obstoječih kulturah sem zasnoval test, ki temelji na uporabi reverznega prepisa in kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (RT-qPCR). Preveril sem raven endogenega izražanja transkripcijskih faktorjev OCT4, SOX2, KLF4, MYC, LIN28 in NANOG, v različnih rastnih pogojih, in pri celicah, ki izvirajo iz živali v različnih fizioloških stanjih.

Omenjeni transkripcijski faktorji so pomembni označevalci pluripotentnega značaja celic, njihova endogena prisotnost v celicah pa bi verjetno omogočila lažje reprogramiranje. Rezultati so pokazali, da se v primarnih celičnih kulturah kozje mlečne žleze endogeno izražajo MYC, KLF4, OCT4 in SOX2, medtem ko izražanja LIN28 in NANOG ni bilo mogoče zaznati. V vseh testiranih celičnih kulturah je bil daleč najbolj izražen transkripcijski faktor MYC. Izražanje KLF4 in OCT4 je bilo v primerjavi z MYC bistveno manjše, medtem ko je bilo izražanje SOX2 na meji detekcije (alika 2). S stališča endogenega izražanja transkripcijskih faktorjev so za namene reprogramiranja bolj primerne celice, vzdrževane v pogojih, ki omogočajo delovanje osnovnega metabolizma celic, ne pa laktogene diferenciacije in vzpostavitve *in vitro* laktacije. Fiziološko stanje donorskega tkiva na izražanje transkripcijskih faktorjev ni imelo bistvenega vpliva. Glede na dokaj visoko stopnjo endogenega izražanja, bi bilo reprogramiranje verjetno možno izvesti brez vnosa eksogenega transkripcijskega faktorja MYC.

3. Reprogramiranje celic

O reprogramiranju celic pri kozah ni veliko znanega. Ravno tako v literaturi ni podatkov o uspešnem direktnem reprogramiranju celic mlečne žleze pri katerikoli živali. Glede na trenutne trende v raziskavah induciranih pluripotentnih celic, ki težijo k uporabi neintegrativnih metod, sem se odločil za uporabo prehodne transfekcije, z uporabo komercialnega episomalnega vektorja, ki je vseboval človeške transkripcijske faktorje (OCT4, SOX2, KLF4, MYC in LIN28). Vnos episoma je potekal z elektroporacijo, zato je bilo najprej potrebno določiti parametre elektroporacije, optimalne za uporabljeni celični tip. Optimizacijo pogojev sem izvajal z reporterskim vektorjem, ki je vseboval zapis za zeleni fluorescentni protein (GFP). Ugotovil sem, da celice v hiposmolarnem pufri dosežajo premer 20-30 μm in da je optimalna napetost pri transfekciji približno 1000 V/cm. Kljub optimizaciji parametrov (osmolarnost elektroporacijskega pufra, električna napetost in dolžina pulza) je bila uspešnost transfekcije še vedno dokaj nizka. Po vnosu transkripcijskih faktorjev pluripotentnosti se je v celični kulturi po približno desetih dneh pojavilo manjše število kompaktnih skupkov (klastrov) celic (Slika 3), ki so bili po morfologiji podobni pluripotentnim matičnim celicam (kompaktne kolonije, celice z velikimi jedri in malo citoplazme) in niso kazali značilne morfologije epitelnih celic. V teh skupkih je bilo mogoče zaznati nekoliko povišano alkalno-fosfatazno aktivnost, vendar pa so kmalu izginili in niso omogočali nadaljne namnožitve in karakterizacije. Domnevam, da je šlo za deloma reprogramirane celice, ki so se prehodno pojavile in diferencirale, bodisi zaradi nepopolnega reprogramiranja, bodisi zaradi neustreznih pogojev v kulturi, ki v literaturi za kozje pluripotentne matične celice še niso opisani. Podobne težave pri reprogramiranju kozjih embrionalnih fibroblastov so opisane v članku Ren in sod., kjer je bilo za vzpostavitev kulture pluripotentnih celic potrebno vstaviti tudi SV40 T-antigen in hTERT, kljub temu pa so se celice po utišanju eksogenih faktorjev ponovno diferencirale (Ren in sod., 2011).

Kot alternativo metodo sem poizkusil s transfekcijo neinfektivne RNA, ki je bila razvita iz virusa Venezuelskega konjskega encefalitisa 3 in zaradi sposobnosti samopodvojevanja skozi omejeno število celičnih delitev ne zahteva multiplih transfekcij (kot je običajno pri metodah reprogramiranja, temelječih na RNA). Ker sem predhodno ugotovil endogeno izražanje faktorja MYC, sem izbral RNA replikon, ki je vseboval zaporedja faktorjev OCT4, SOX2, KLF4 in GLIS1 v policistronskem prepisu. RNA replikon sem v celice vnesel z uporabo lipofekcije. Tudi v tem primeru je bila potrebna optimizacija transfekcije z uporabo različnih reagentov za lipofekcijo in različnih koncentracij. Ker sistem vsebuje puromicinski selekcijski marker je bilo potrebno določiti tudi optimalno koncentracijo puromicina, ki je toksičen za netransficirane celice, ne pa transficirane. Po optimizaciji parametrov transfekcije in koncentracije puromicina sem sledil protokolu, ki je bil sicer razvit za reprogramiranje človeških fibroblastov. Po transfekciji in presaditvi celic na rastno podlago iz deaktiviranih fibroblastov sem opazil manjše skupke celic, ki so se morfološko razlikovali od epitelnih celic, vendar niso kazale povečane alkalno-fosfatazne aktivnosti in so po nadaljni rasti skupkov kazali morfologijo epitelnih celic.

4. Pregled reprogramiranja celic pri domačih živalih in primerjalna analiza.

V sklopu projekta sem opravil obsežen pregled literature in iz literature izluščil znane primere reprogramiranja celic pri domačih živalih, vključno z uporabljenimi metodami, transkripcijskimi faktorji in pogoji v kulturi, ki so bili potrebni za uspešno reprogramiranje živalskih somatskih celic. Poleg tega sem opravil primerjalno analizo aminokislinskih zaporedij glavnih transkripcijskih faktorjev reprogramiranja, tako da sem iz podatkovnih zbirk pridobil proteinska zaporedja pri domačih živalih in jih primerjal z zaporedji miši in človeka, kjer je reprogramiranje tudi najbolj raziskano. Mišji in človeški faktorji so običajno uporabljeni v večini vektorjev namenjenih reprogramiranju.

Ugotovil sem, da je pri domačih živalih (govedo, kunec, konj, prašič, ovca in koza) mogoče najti le 32 opisanih primerov reprogramiranja celic, pri čemer so bili kot donorski (somatski) tip celic skoraj v vseh primerih uporabljeni fibroblasti, ki so bili reprogramirani večinoma z uporabo integrativnih metod. Vnešeni eksogeni faktorji in pogoji v kulturi so se med vrstami in študijami nekoliko razlikovali. Glede na analizo rezultatov lahko zaključim, da je kot kaže najtežje reprogramirati ravno celice prežvekovalcev, saj zahtevajo vnos največ faktorjev in največ dodatkov v gojišče, ki spodbudijo reprogramiranje. Glede na primerjavo zaporedij lahko zaključim, da transkripcijski faktoji kažejo visoko stopnjo evolucijske ohranjenosti med vrstami, kljub vsemu pa so za reprogramiranje živalskih celic, glede na podobnost v zaporedju aminokislilin, bolj primerni človeški kot mišji transkripcijski faktorji.

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

V literature je zelo malo znanega o reprogramiranju celic pri kozah. Prav tako ni mogoče najti poročil o uspešni uporabi epitelnih celic mlečne žleze kot viru donorskih celic za vzpostavitev iPMC. Cilj projekta je bila vzpostavitev prve celične linije iPMC, ki bi bila pripravljena z reprogramiranjem epitelnih celic kozje mlečne žleze. Izkazalo se je, da primarno kulturo mlečne žleze sestavlja večje število različnih celičnih tipov, prav tako pa znotraj različnih linij epitelnega tipa celic (mioepitelne, luminalne) obstajajo precejšnje razlike v lastnostih oziroma stanju diferenciacije celic (izražanje steroidnih receptorjev, sinteza mlečnih proteinov...). Karakterizacija celične kulture je zato zahtevala bistveno več časa in sredstev kot je bilo predvideno, vendar pa sem z uporabo kombinacije več označevalcev, uspel ločiti med posameznimi tipi celic, saj menim, da je za preučevanje reprogramiranja nujno začeti s čim bolj homogeno kulturo, kjer bi bil zastopan le določen celični tip, celice pa na enaki oziroma čim bolj podobni stopnji diferenciacije.

Nadaljno težavo je predstavljalo dejstvo, da kozji genom še ni ustrezno anotiran in da ni na voljo specifičnih protiteles proti kozjim antigenom. Ravno tako ni na voljo vektorjev reprogramiranja, ki bi vsebovali kozje transkripcijske faktorje pluripotentnosti, oziroma vsaj ustrezno anotiranih zaporedij zanje. Težava je bila tudi v vnosu vektorjev v primarno celično kulturo, saj se je bila učinkovitost transfekcij relativno nizka.

Kljub temu, da končni cilj – vzpostavitev stabilne linije iPMC, ni bil dosežen, menim da je bilo reprogramiranje deloma uspešno, saj sem prehodno zaznal kolonije celic, ki so bile deloma reprogramirane, vendar so diferencirale. Kljub temu menim, da so bili zastavljeni cilji v veliki meri izpolnjeni in da je bilo opravljeno veliko dela na področju karakterizaciji donorskih celic, optimizaciji in prilagoditvi protokolov in primerjalni analizi med vrstami, kar bo uporabno v nadaljnjih poskusih. Za pridobitev stabilne linije iPSC so verjetno potrebne dodatne prilagoditve uporabljenih metod (vnos dodatnih transkripcijskih faktorjev, dodatki določenih faktorjev ali inhibitorjev metaboličnih poti v gojišče, ki povečujejo učinkovitost reprogramiranja). Delo na projektu še ni končano, saj v skladu s časovnimi in finančnimi zmožnostmi, pripravljam poskus transdukcije, ki bo temeljil na virusnem vnosu transkripcijskih faktorjev.

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

Za vnos transkripcijskih faktorjev je bila sprva predvidena tudi metoda z virusnimi partikli. Glede na trenutne trende sem se odločil za uporabo neintegrativnih metod reprogramiranja. Uporaba neintegrativnih metod je varnejša, saj ne zahteva dela z viralnimi partikli, poleg tega pa so tako pridobljene iPSC genetsko nespremenjene in uporabnejše za nadaljne analize. Razvoj neintegrativnih metod reprogramiranja je napredoval v tolikšni meri, da naj bi bile nekatere (npr. tiste, ki temeljijo na RNA) celo bolj učinkovite od viralnih transdukcij. Vendar pa se je izkazalo, da je učinkovitost vnosa vektorjev pri donorskih celicah dokaj zahtevna. Vseeno menim, da izbira metode vnosa ni bistveno vplivala na rezultate, ampak je potreben vnos dodatnih transkripcijskih faktorjev in/ali uporaba dodatnih faktorjev in inhibitorjev v gojišču.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	3700616	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Reprogramiranje celic pri domačih živalih
		ANG	Cellular reprogramming in farm animals
	Opis	SLO	Vzpostavitev linij embrionalnih matičnih celic (ESC) je bila uspešna pri miši in človeku, ne pa pri domačih živalih. Razvoj direktnega reprogramiranja celic ponuja alternativo za pridobivanje pluripotentnih celic matičnih celic tudi pri domačih živalih. Inducirane pluripotentne matične celice (iPSC) predstavljajo neomejen, etično sprejemljiv, individuum-specifičen vir pluripotentnih celic, ki jih lahko pridobimo iz različnih telesnih celic. iPSC lahko diferencirajo v vse celične tipe organizma in imajo velik potencial za uporabo v medicini, kmetijstvu in biotehnologiji. Vendar pa molekularni mehanizmi reprogramiranja ostajajo nepojasnjeni in zavirajo pridobivanje dokončno reprogramiranih, stabilnih celičnih linij in njihovo uporabo v klinični praksi. Živalski modeli velikih domačih živali so nujni za razširitev znanja, pridobljenega na glodavcih in pospešitev razvoja ter validacijo transplantacijskih terapij v predkliničnih študijah. Poleg tega je mogoče, z uporabo naprednih reprodukcijskih tehnik, pluripotentne celice uporabiti za razvoj transgenih živali. Kljub velikemu aplikativnemu potencialu se zdi, da iPSC pri domačih živalih niso bile deležne zaslužene pozornosti. Cilj preglednega članka je sistematični pregled področja direktnega

		reprogramiranja pri najpomembnejših sesalskih vrstah domačih živali (govedo, prašič, konj, ovca, koza in kunec), primerjati ohranjenost transkripcijskih faktorjev reprogramiranja pri omenjenih vrstah ter diskutirati možnost njihove uporabe. Z iskanjem po literaturi smo našli 32 študij, ki opisujejo uspešno direktno reprogramiranje celic pri odmačih živalih pri prašiču (13 študij), govedu (5), konju (5), ovci (4), kozi (3) in kuncu (2). Študije so zbrane v pregledni tabeli.
	ANG	Establishment of embryonic stem cell (ESC) lines has been successful in mouse and human, but not in farm animals. Development of direct reprogramming technology offers an alternative approach for generation of pluripotent stem cells, applicable also in farm animals. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) represent practically limitless, ethically acceptable, individual-specific source of pluripotent cells that can be generated from different types of somatic cells. iPSCs can differentiate to all cell types of an organism's body and have a tremendous potential for numerous applications in medicine, agriculture, and biotechnology. However, molecular mechanisms behind the reprogramming process remain largely unknown and hamper generation of bona fide iPSCs and their use in human clinical practice. Large animal models are essential to expand the knowledge obtained on rodents and facilitate development and validation of transplantation therapies in preclinical studies. Additionally, transgenic animals with special traits could be generated from genetically modified pluripotent cells, using advanced reproduction techniques. Despite their applicative potential, it seems that iPSCs in farm animals haven't received the deserved attention. The aim of this review was to provide a systematic overview on iPSC generation in the most important mammalian farm animal species (cattle, pig, horse, sheep, goat, and rabbit), compare protein sequence similarity of pluripotency-related transcription factors in different species, and discuss potential uses of farm animal iPSCs. Literature mining revealed 32 studies, describing iPSC generation in pig (13 studies), cattle (5), horse (5), sheep (4), goat (3), and rabbit (2) that are summarized in a concise, tabular format.
	Objavljeno v	BioMed Central; Journal of animal science and biotechnology; 2016; Vol. 7, no. 10; str. 1-9; Impact Factor: 1.681; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 0.975; A': 1; WoS: AD; Avtorji / Authors: Ogorevc Jernej, Orehek Sara, Dovč Peter
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	3540360 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Relativna kvantifikacija izražanja beta-kazeina v primarnih kozjih epitelnih celicah mlečne žleze ANG Relative quantification of beta-casein expression in primary goat mammary epithelial cell lines
	Opis	SLO V primarnih epitelnih celičnih kulturah mlečne žleze koze, ki so bile vzpostavljene iz tkiva koz v laktaciji in juvenilnih koz, smo določali nivo izražanja mlečnega proteina beta-kazeina (CSN2) v in vitro pogojih. Primarne kulture smo vzpostavili z encimatsko razgradnjo tkiva mlečne žleze in jih določili z uporabo protiteles proti citokeratinu 14, citokeratinu 18 in vimentinu. Vzpostavljene celične linije v drugi pasaži smo gojili v osnovnem gojišču na plastični podlagi in v gojišču z dodatkom laktogenih hormonov na podlagi prevlečeni z ekstracelularnim matriksom. Izražanje CSN2 smo določili z uporabo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (RT-qPCR). Prisotnost transkriptov za CSN2 smo ugotovili v vseh vzorcih, tudi v celicah, ki izvirajo iz tkiva živali, ki niso bile v laktaciji, in v vzorcih gojenih le v osnovnem gojišču. Prisotnost proteina za CSN2 smo potrdili imunofluorescentnim barvanjem. Odziv na tretiranje s hormoni in celična morfologija sta se razlikovali med linijami celic in tretmaji. Dodatek

		<p>ekstracelularnega matriksa je pokazal pozitiven učinek na transkripcijo CSN2 pri eni celični liniji, medtem ko pri ostalih dveh celičnih linijah ni bilo zaznati statistično značilnih vplivov. Izražanje CSN2 je kot kaže odvisno od več dejavnikov; fiziološkega stanja tkiva iz katerega je pripravljena celična kultura, rastnih pogojev v kulturi in uporabljenih metod, s katerimi pripravimo celično kulturo. Potrebne so nadaljne študije, ki bodo identificirale faktorje, ki določajo hormonsko odzivnost in transkripcijsko aktivnost genov za mlečne protein v primarnih celičnih kulturah mlečne žleze.</p>
	ANG	<p>Primary mammary epithelial cell cultures were established from mammary tissue of lactating and non-lactating goats to assess the expression of beta-casein (CSN2) in vitro. Primary cell cultures were established by enzymatic digestion of mammary tissue and characterized using antibodies against cytokeratin 14, cytokeratin 18, and vimentin. The established primary cell lines in the second passage were grown in basal medium on plastic and in hormone-supplemented (lactogenic) medium on plastic and on an extracellular matrix-covered surface, respectively. CSN2 gene expression was evaluated using quantitative reverse transcription PCR. The presence of CSN2 transcripts was detected in all samples, including cells originating from non-lactating goat, grown in basal medium. The presence of CSN2 protein was confirmed using immunofluorescence. Response to the hormonal treatment and cell morphology differed between the cell lines and treatments. In 2 cell lines supplemented with lactogenic hormones in the medium, CSN2 expression was increased, while CSN2 levels in one of the cell lines remained constant, regardless of the treatment. Addition of extracellular matrix showed positive effects on CSN2 transcription activity in 1 of the cell lines, while in the other 2 showed no statistically significant effects. CSN2 expression appeared to depend on subtle differences in physiological state of the starting tissue material, growth conditions, cell types present in the culture, and methods used for cell culture establishment. Further studies are necessary to identify factors that determine hormone-responsiveness and transcriptional activity of milk protein genes in goat primary mammary cell cultures.</p>
	Objavljeno v	Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto.; Genetics and molecular research; 2015; Vol. 14, no. 2; str. 3481-3490; Impact Factor: 0.775; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.587; WoS: CQ, KM; Avtorji / Authors: Ogorevc Jernej, Dovč Peter
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
3.	COBISS ID	000000 Vir: vpis v obrazec
	Naslov	<p>SLO Izražanje estroge 1 (ESR1) in progesteron receptorja (PGR) v primarnih celicah kozje mlečne žleze</p> <p>ANG Expression of estrogen receptor 1 (ESR1) and progesterone receptor (PGR) in primary goat mammary epithelial cells</p>
	Opis	<p>SLO Natančna vloga estrogena in progesterona in občutljivost celic na estrogen in progesteron, ki poteka preko steroidnih receptorjev, med laktacijo še ni pojasnjena. Izražanje estrogen receptorja 1 (ESR1) in progesteron receptorja (PGR) smo določili v primarnih celičnih kulturah vzpostavljenih iz juvenilnega tkiva mlečne žleze in tkiva v laktaciji, da bi ovrednotili vpliv fiziologije donorskega tkiva (juvenilno tkivo in tkivo v laktaciji) in pogojev v kulturi (laktogeni oz. bazalni) na izražanje ESR1 in PGR v vzpostavljenih primarnih kulturah. Relativne ravni mRNA za oba receptorja so bile najvišje pri celicah, pridobljenih iz tkiva juvenilnih koz. Gojenje celic v laktogenih pogojih je povišalo izražanje ESR1 (1,36 do 12,35-krat) in znižalo izražanje PGR (-2,35 do -3,62-krat), v primerjavi z bazalnimi pogoji. Na podlagi prenosa po Westernu in detekciji s specifičnimi protitelesi lahko zaključimo, da so se spremembe v izražanju genov odražale tudi na ravni proteina. Kot</p>

		kaže je diferenčno izražanje genov v različnih pogojih korelirano s stopnjo diferenciacije celic. Dvojno imunobarvanje je pokazalo, da ER- α pozitivne celice ne pripadajo izključno luminalni liniji in da se ER- α in PR izražata posamično ali pa sta izražena skupaj. Vzpostavljene primarne kulture epitelnih celic mlečne žleze v zgodnjih pasajah se odzivajo na hormone in predstavljajo nadomestek tkiva mlečne žleze, uporaben za raziskave.
	ANG	The exact role and sensitivity of cells to estrogen and progesterone, mediated through the steroid receptors, during lactation is not known. Expression of estrogen receptor 1 (ESR1) and progesterone receptor (PGR) was quantified in mammary tissue-derived primary goat mammary epithelial cells (pgMECs) to determine the influence of donor tissue physiology (lactating and juvenile) and cell culture growth conditions (basal and lactogenic) on ESR1 and PGR expression in the derived cells. Relative mRNA levels for both receptors were the highest in cell lines derived from mammary tissue of juvenile goats. Maintaining pgMECs in lactogenic conditions resulted in up-regulation of ESR1 (1.36 to 12.35-fold) and in down-regulation of PGR (-2.53 to -3.62-fold), compared to basal conditions. Based on western blotting analysis we suggest that the differences in mRNA expression are translated to the protein level. We suggest that differential expression in lactating conditions is correlated with terminal differentiation of the pgMECs. Double immunostainings showed that ER- α positive cells do not exclusively belong to the luminal lineage and that ER- α and PR can be expressed individually or co-expressed in the pgMECs. The derived primary cultures/lines in early passages are hormone-responsive and represent a useful surrogate for mammary tissue in research experiments.
Objavljeno v		Animal Science Journal (sprejeto v objavo / accepted for publication); Impact Factor: 0.96; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 0.975; Avtorji / Authors: Ogorevc Jernej, Dovč Peter
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

	Družbeno-ekonomski dosežek	
1.	COBISS ID	3575176 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Funkcijska genomika v biologiji mlečne žleze ANG Functional genomics in mammary gland biology
	Opis	SLO Opis metod, ki smo jih razvili v raziskovalni skupini, za preučevanje biologije mlečne žleze, vključno s preučevanjem in detekcijo matičnih celic ter razvojem celičnih modelov za preučevanje mlečne žleze. ANG Description of methods developed by our research group for research of mammary gland biology, including research and detection of mammary stem cells and development of mammary cell models.
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci
	Objavljeno v	Faculty of Medicine; Book of abstracts; 2015; Str. 3; Avtorji / Authors: Dovč Peter, Ogorevc Jernej, Prpar Mihevc Sonja, Kunej Tanja, Čeh Eva
	Tipologija	1.10 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci (vabljen predavanje)

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine²

Vodja projekta je aktivno sodelovala tudi pri raziskavah znotraj širše raziskovalne skupine in bil udeležen pri pedagoškem procesu na Biotehniški fakulteti. V obdobju trajanja projekta je bil somentor pri enem diplomskem seminarju (BSc) in eni diplomski nalogi (MSc) in je aktivno sodelovala pri izvajanju vaj za študente biotehnologije, biokemije in zootehnike.

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

9.1. Pomen za razvoj znanosti²

SLO

Na področju raziskav matičnih celic in strategij za reprogramiranje je bil v zadnjem času storjen velik napredek. Reprogramiranje celic omogoča pridobivanje organizmu lastnih pluripotentnih celic v neomejenih količinah, ki ni odvisno od uporabe zarodkov. Trenutno so učinkovite metode reprogramiranja, ki omogočajo pridobitev pluripotentnih celic s potencialom razviti nov organizem in prispevati k germinalnim celicam, na voljo le za glodavske modele. V okviru projekta smo prvič poskusili reprogramirati epitelne celice mlečne žleze kože z metodo direktnega reprogramiranja. Poskus direktnega reprogramiranja somatskih celic je tudi eden prvih pri tej vrsti nasploh. Nadaljni razvoj tehnologij, ki bi omogočil uporabo reprogramiranih celic v humani medicini zahteva predklinična testiranja na velikih domačih živalih, ki so človeku mnogo bolj sorodne od glodavcev. Raziskave pri domačih živalih na tem področju prispevajo k razvoju novih strategij reprogramiranja in vzpostavitvi ter karakterizaciji pluripotentnih celic pri različnih vrstah. iPSCs različnih vrst domačih živali bodo sčasoma razkrile optimalne pogoje v kulturi, varne metode reprogramiranja in primerne označevalce pluripotentnosti za pridobivanje pluripotentnih celic pri različnih vrstah. Poleg tega bi bile iPSCs pri kozih, kjer nimamo na voljo etabliranih EMC, uporabne kot nadomestek EMC za razvoj transgenih koz. Pluripotentne matične celice domačih živali, ki jih v in vitro pogojih genetsko spremenimo, z uporabo metod genetskega inženiringa, so namreč lahko zelo uporabne v povezavi z modernimi reprodukcijskimi tehnikami (npr. metoda jedrnega prenosa, komplementacija v blastocisto) in omogočajo razvoj transgenih živali, s posebnimi lastnostmi. Takšne živali so uporabne v kmetijstvu ali kot bioreaktorji za produkcijo rekombinantnih proteinov. Pri slednjem so še posebej pomembni prežvekovalci, saj je sistem ekspresije v mlečno žlezo trenutno najoptimalnejši sistem za produkcijo in izolacijo rekombinantnih produktov. Rezultati projekta in redke objave v literaturi pri tej vrsti kažejo, da je reprogramiranje kozjih (prežvekovalskih) epitelnih celic zahtevnejše od reprogramiranja mišjih ali človeških fibroblastov in da je za uspešno reprogramiranje, poleg običajnih, potreben vnos dodatnih transkripcijskih faktorjev reprogramiranja in optimizacija pogojev v kulturi. V okviru projekta je bil storjen pomemben korak pri karakterizaciji epitelnih celic mlečne žleze in njihovem uspešnem reprogramiranju.

ANG

In the last years significant progress has been made in the field of stem cell research and reprogramming strategies. Reprogramming technology allows generation of pluripotent individual-specific stem cells in unlimited amounts that is not dependent on destruction of embryos. Currently, effective methods that allow generation of pluripotent cells with germline competence, are available only for rodents. Our experiment was the first try of direct reprogramming of mammary epithelial cells and one of the first in goats. Further development of technology that would allow use of reprogrammed cells in human medicine, requires preclinical testing in large farm animals, which are more related to human than murines. Research on large farm animals will facilitate the development of new reprogramming strategies and derivation and characterization of iPSCs in different species. iPSCs from different species will eventually reveal optimal culture conditions, safe reprogramming methods and suitable markers for generation of pluripotent cells in different species. Additionally, iPSCs in goats, where no ESCs lines are available, could be used as an ESC alternative for production of transgenic goats. Animal pluripotent stem cells can be genetically modified in in vitro conditions and used in combination with advanced reproduction techniques (e.g. SCNT, blastocyst complementation) for production of animals with special traits. Transgenic animals could be used in agriculture or as bioreactors for production of recombinant proteins. Ruminants (especially goats) are important species for biopharming, because expression of transgenic proteins in mammary gland is currently the most optimal production system that allows recombinant proteins to be relatively easy isolated from milk. Results of the project and rare literature reports show that reprogramming of goat (ruminant)

cells seems more difficult as reprogramming of human or mouse fibroblasts, and probably requires insertion of additional reprogramming factors and optimization of reprogramming medium. In the course of this project an important step forward was achieved in characterisation of ruminant mammary cells and towards their successful reprogramming.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Reprogramiranje somatskih celic v stanje pluripotentnosti je trenutno eno najpomembnejših področij sodobne znanosti in predstavlja velik potencial, uporaben v bazični znanosti, kmetijstvu, farmaciji in medicini. Področje reprogramiranja v Sloveniji še ni bilo predmet raziskav v znatnem obsegu, zato je potrebno povečati mednarodno konkurenčnost raziskovalcev na tem področju. Dostopnost živalskih pluripotentnih matičnih celic lahko bistveno prispeva k poznavanju mehanizmov reprogramiranja in omogoči predklinične raziskave na živalskih modelih. Poleg tega pa so pluripotentne matične celice koze lahko uporabne za razvoj transgenih živali, ki lahko služijo kot bioreaktorji v biofarmaceutski industriji. Ugotovitve projekta lahko služijo kot izhodišče za nadaljne raziskave in nove projekte na tem področju.

ANG

Reprogramming somatic cells back to pluripotency is one of the most important research topics in modern science and represents a great potential for further research in basic science and applicative uses in agriculture, pharmacy, and medicine. Field of cell reprogramming hasn't been subjected to a significant amount of research in Slovenia, therefore it is necessary to increase international competitiveness of researchers in this field. Accessibility of pluripotent stem cells in animals can aid in deciphering and understanding reprogramming mechanisms and enables preclinical research on animal models. Additionally, goat pluripotent stem cells can be used for development of transgenic goats that can be of high value as bioreactors in biopharmaceutical industry. Findings of this project are a starting point for further research and possible new projects in the field.

10. Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!

Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	<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 upravljavskih 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/varovanju 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 in podoktorske projekte iz gospodarstva!
Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<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="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.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izboljšanje 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					
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj					
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					
G.09.	Drugo:					

Komentar

--

12.Pomen raziskovanja za sofinancerje¹¹

	Sofinancer		
1.	Naziv		
	Naslov		
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja	Šifra	
	1.		
	2.		
3.			
4.			

	5.	
	Komentar	
	Ocena	

13. Izjemni dosežek v letu 2015¹²

13.1. Izjemni znanstveni dosežek

13.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza v Ljubljani, Biotehniška
fakulteta

Jernej Ogorevc

ŽIG

Datum:

18.3.2016

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2016/23

¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

² Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

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

⁴ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'. [Nazaj](#)

⁶ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja

izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'.

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

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

⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

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

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

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

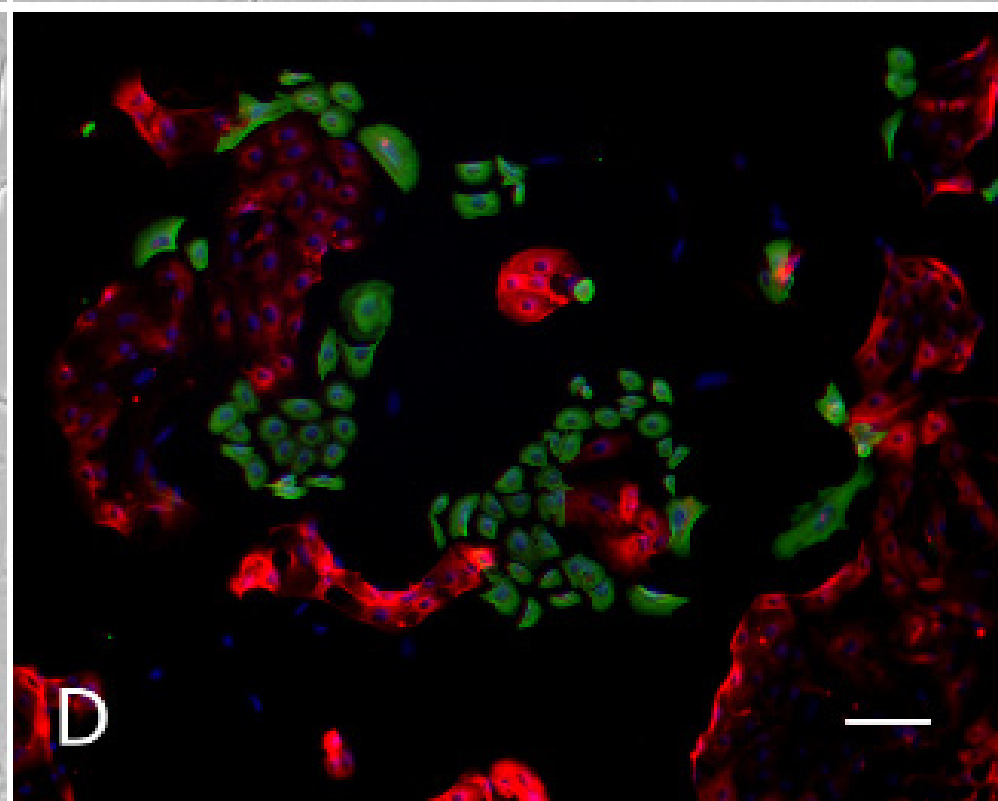
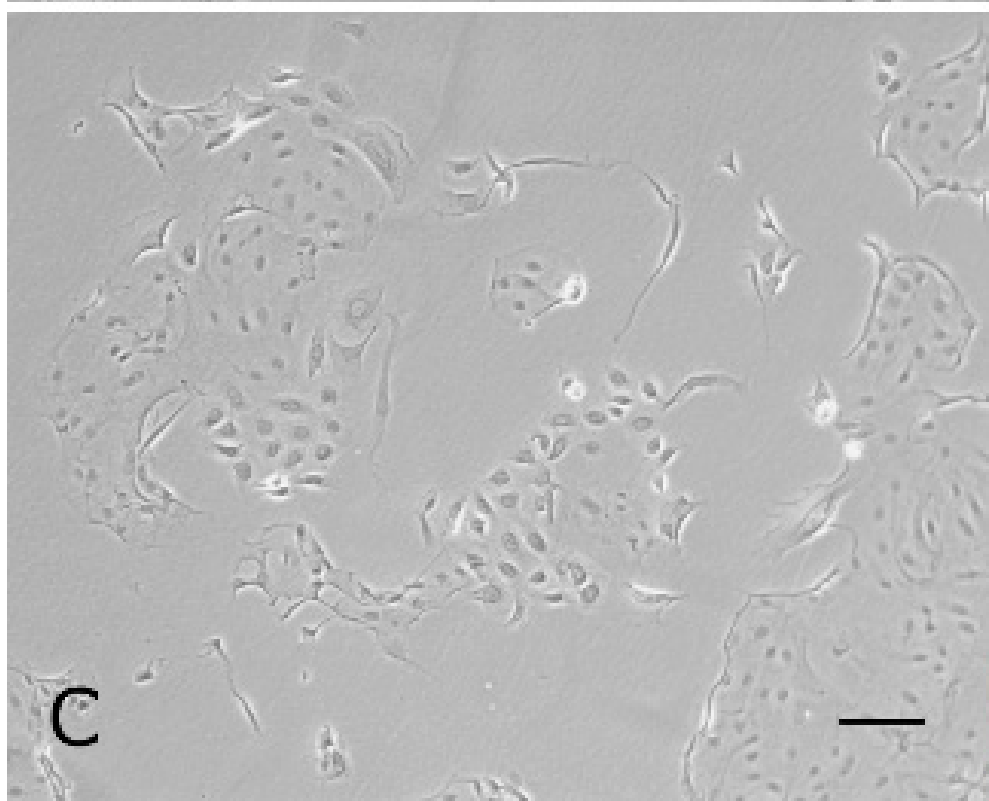
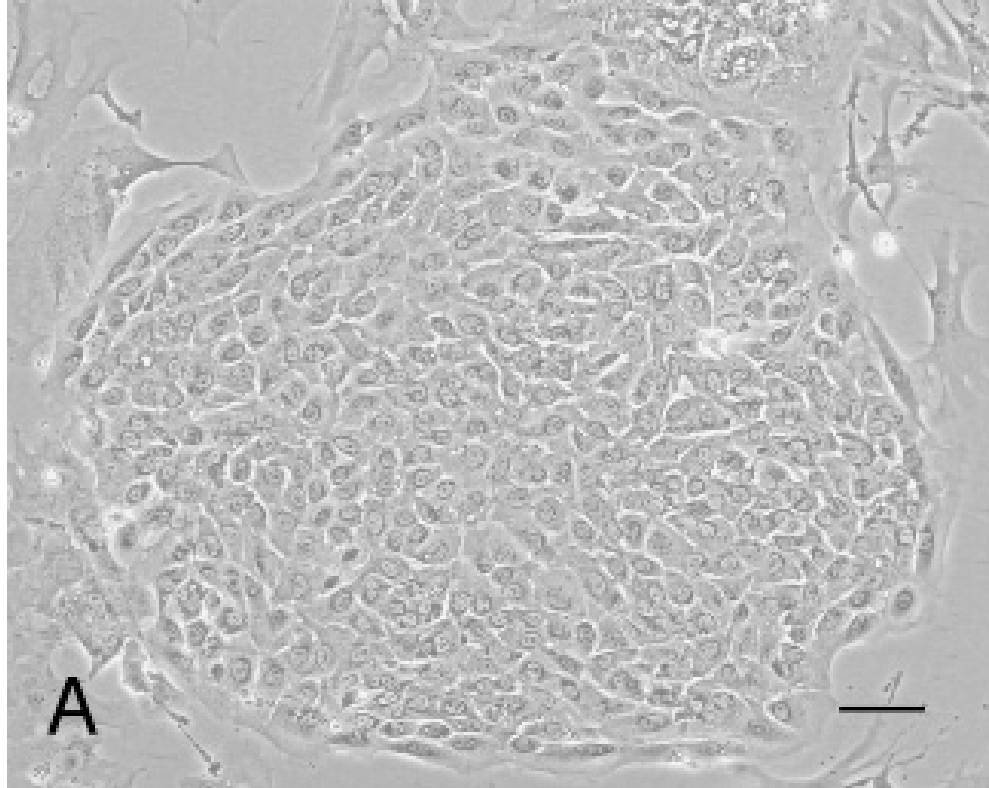
¹¹ Rubrike izpolnite / prepisite skladno z obrazcem "izjava sofinancerja" <http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>, ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

¹² Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2015 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

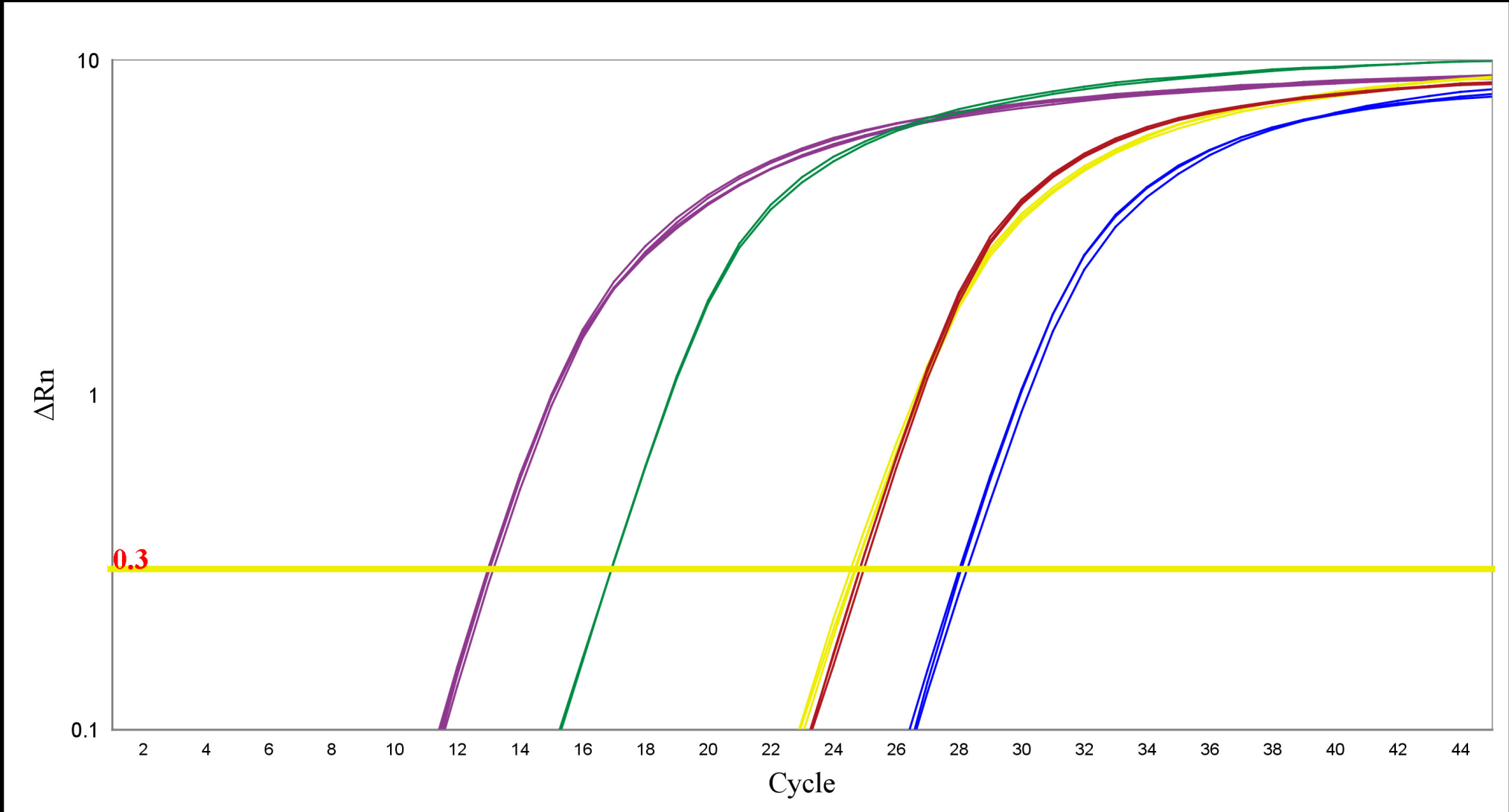
Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2016 v1.00

DD-19-53-38-66-3A-AA-49-75-BC-0C-55-B9-F9-B7-F4-28-22-5F-33

Priloga 1



Priloga 2



Priloga 3

