

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2010-1/147

## ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	J4-9331
<b>Naslov projekta</b>	Regulacija procesa biosinteze FK 506 (tacrolimus)
<b>Vodja projekta</b>	13542 Hrvoje Petković
<b>Tip projekta</b>	J Temeljni projekt
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	2.835
<b>Cenovni razred</b>	D
<b>Trajanje projekta</b>	01.2007 - 12.2009
<b>Nosilna raziskovalna organizacija</b>	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	13. Splošni napredek znanja - RiR financiran iz drugih virov (ne iz splošnih univerzitetnih fondov - SUF)

#### 2. Sofinancerji<sup>1</sup>

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

### B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

#### 3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta<sup>2</sup>

OPIS RAZISKOVANJA IN POMEN: V zadnjih dveh desetletjih se pri terapiji z imunosupresivnimi učinkovinami najpogosteje uporabljajo inhibitorji kalcineurina, kot sta naravna mikrobnega produkta ciklosporin in FK506 (imenovan tudi takrolimus). Še posebno se je razširila uporaba FK506 (takrolimus), kar kaže znatno povečana poraba tega imunosupresanta od začetka izvajanja tega projekta v letu 2007. Letni promet v letu 2006 je znašal okoli 200 milijonov USD, danes pa je že presegel 2 milijardi USD, kar kaže na izjemen pomen tega zdravila. Razen tega so FK506 in FK520 ter njuni analogi odobreni tudi za zdravljenje vnetnih kožnih bolezni.

Novejši analogi FK506 pa so trenutno v kliničnih testiranjih za zdravljenje nekaterih alergijskih bolezni vključno s FK506 analogi, ki se testirajo z namenom blaženja napadov pri bolnikih z astmo.

Cilj tega projekta je bil predvsem dopolniti zaporedje DNA genske skupine FK506 pri proizvajalcu FK506, sevu *Streptomyces* sp. Ker so najvišji donosi tega metabolita, ki se proizvaja s pomočjo biosinteznega procesa še relativno nizki (med 1-2g/L) v primerjavi s standardnimi industrijskimi postopki za proizvodnjo sekundarnih metabolitov, ki pogosto dosegajo donos več 10 g/L, smo v sklopu tega projekta namenili posebno pozornost prav identifikaciji in študiji regulatornih genov, ki vplivajo na biosintezo tega produkta in posledično na končni donos FK506. Tako je bil poglobljen del programa izvedenega projekta pridobitev celotne nukleotidne sekvence genske skupine ter predvsem identifikacija in kloniranje regulatornih genov, ki so prisotni v genski skupini. Nadalje smo preučili njihovo vlogo v regulaciji biosinteze FK506 in gene ter pridobljena znanja uporabili za dvig donosa ciljnega metabolita FK506.

**ZNANSTVENA HIPOTEZA** Glede na biosintezni izvor rapamicina, FK506 in FK520, vsi pripadajo skupini poliketidov, ki jih sintetizirajo poliketid-sintaze (PKS). To so multiencimski kompleksi, kodirani v velikih genskih skupinah. Napredek v razumevanju biosinteznih poti PKS je doprinesel k razvoju popolnoma novih pristopov biosinteznega inženiringa za tvorbo novih poliketidnih analogov makrolidov, kot so eritromicin, epotilon, rapamicin in FK520, kakršnih ni bilo mogoče ustvariti s sintezno kemijo. Pred začetkom izvedbe tega projekta je bila znana DNA sekvenca celotnih genskih skupin strukturno sorodnih spojin rapamicina in FK520. DNA sekvenca genske skupine FK506 pa je bila do začetka tega projekta še nepoznana, in prav določitev celotne nukleotidne sekvence ter analiza genske skupine za biosintezo tega metabolita je bila del programa tega projekta, ki smo ga v celoti izvedli, kot smo opisali kasneje. Glede na lastnosti genskih skupin, ki kodirajo biosintezo rapamicina in FK520, strukturno podobnih metabolitov medicinskega pomena, smo z veliko verjetnostjo lahko predvidevali, da celotno zaporedje genske skupine za biosintezo FK506 pri *Streptomyces* sp. poleg genov, t.i. poliketid sintaz (PKS), ki katalizirajo biosintezo osnovnega skeleta makrolaktonske molekule, genska skupina vsebuje tudi druge gene. Pričakovali smo, da bomo našli gene za biosintezo nenavadnih gradbenih enot, kot sta metoksimalonil-ACP in alilmalonil-CoA in pa seveda tudi gene, ki uravnavajo izražanje vseh genov v genski skupini, t.i. regulatornih genov. Regulatorni geni imajo ključno vlogo pri donosu FK506 ob koncu biosinteznega procesa, kar ima pomemben vpliv na ekonomiko biosinteznega procesa za proizvodnjo FK506 v industrijskem merilu. V sklopu tega projekta smo se zato osredotočili izključno v študij potencialnih regulatornih genov znotraj genske skupine za biosintezo FK506.

**UGOTOVLJENI REZULTATI:** V sklopu projekta smo uspeli pridobiti celotno zaporedje DNA genske skupine za biosintezo imunosupresorja FK506 iz produkcijskega seva *Streptomyces tsukubaensis*. Namesto seva *Streptomyces* sp. ATCC 55098, kot je bilo predvideno prvotno, smo v naših eksperimentih uporabili sev *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 14891, kot so nam svetovali Lekovi raziskovalci (razlog za zamenjavo produkcijskega seva je opisan v točki 5.) Ugotovili smo, da genska skupina vsebuje večje število prej nepoznanih genov, ki kodirajo biosintezo nekaterih gradbenih enot, in vsaj tri regulatorne gene. Vlogo vseh treh regulatornih genov smo preučili z njihovim prekomernim izražanjem in/ali njihovo inaktivacijo. V sklopu tega projekta smo pridobili celotno zaporedje genske skupine FK506 in del zaporedja, ki kodira biosintezo nekaterih predvidenih, regulatornih genov, kar smo tudi nedavno objavili v reviji the Journal of Biological Chemistry (Goranovič in sod., 2010) z visokim količnikom vpliva. Trenutno pa pripravljamo novo publikacijo, ki bo osredotočena na lastnosti in delovanje identificiranih regulatornih genov.

Kot je bilo predhodno ugotovljeno, se sekvenca osrednjega dela genske skupine za biosintezo FK506, ki kodira PKS pri sevu *S. tsukubaensis* ne razlikuje bistveno od sekvence seva, ki proizvaja FK520, ki je strukturni analog FK506 in se od njega razlikuje le v stranski skupini na ogljikovem atomu C21; FK506 ima na tej poziciji alilno skupino, FK520 pa ima etilno skupino. V skladu s to razliko smo na levi strani genske skupine identificirali dodatne odprte bralne okvirje (gene). Identificirali smo tri verjetne regulatorne gene, enega na levi strani genske skupine (*allN*,

AsnC homolog)) in dva transkripcijska regulatorja iz skupin LysR in fkbN homologov na desni strani.

Na levi strani genske skupine smo identificirali odprt bralni okvir, ki nosi zapis za regulatorni protein AsnC. AsnC spada v Lrp skupino transkripcijskih regulatorjev, ki so široko razširjeni med prokarionti in arhejami. So globalni regulatorji in modulirajo številne metabolne funkcije, vključno z anabolizmom in katabolizmom aminokislin. AsnC proteini vsebujejo N-terminalno DNA vezavno domeno vijačnica-zavoj-vijačnica in C-terminalno domeno, kjer se veže ligand. Z eksperimenti prekomernega izražanja in prekinitve gena sicer nismo mogli potrditi vpliva tega regulatorja na sintezo FK506, ki je ostala na ravni produkcije izhodnega seva. Gen za AsnC se nahaja poleg gena za metionin-gama liazo, s katerim si verjetno delita »dvosmerni« promotor. Zato smo poskusili prekomerno izraziti še oba gena skupaj, vendar prav tako nismo opazili razlik pri donosu FK506.

Desno od centralnega dela, ki kodira PKS, smo identificirali še dva potencialna regulatorna gena. Prvi spada v skupino regulatorjev tipa LysR (LTTR), ki je največja družina prokariontskih DNA vezavnih proteinov. Ti regulatorji vsebujejo N-terminalno DNA vezavno regijo v obliki ohranjenega motiva vijačnica-zavoj-vijačnica (HTH) in C-terminalno regijo za vezavo kofaktorjev. Pogosto so ti regulatorji aktivatorji transkripcije, zavirajo pa izražanje lastnega gena. LysR iz *S. tsukubaensis* kaže največjo podobnost z LysR iz *S. clavurigerus*, je pa tudi soroden transkripcijskemu regulatorju FkbR1 iz *S. hygroscopicus* subsp. *ascomyceticus*, ki je producent zelo podobne spojine FK520. Prekomerno izražanje LysR pri *S. tsukubaensis* je pokazalo, da ima ta regulator pozitiven vpliv na produkcijo FK506, saj so imeli sevi z dodatno kopijo gena za LysR pod močnim konstitutivnim promoterjem »in trans« za 15-20% višjo produkcijo FK506. Prekinitev gena LysR je potrdila pozitivno vlogo tega gena pri sintezi FK506 pri *S. tsukubaensis*, saj so imeli mutanti s prekinjenim genom LysR bistveno nižji donos, ki je znašal le 10-15% donosa divjega tipa.

Drugi transkripcijski regulator, ki se nahaja v neposredni bližini zapisa za LysR, je homolog *fkbN*. Njegov najbližji homolog najdemo v genski skupini za biosintezo FK520 iz *S. hygroscopicus* subsp. *ascomyceticus*, s katerim si deli 71% identičnosti aminokislinskega zaporedja. 58% identičnosti s FkbN pa ima tudi RapH iz *S. hygroscopicus*, ki je producent rapamicina. C-terminalna DNA-vezavna domena FkbN vsebuje zaporedje, ki je specifično za LuxR transkripcijske regulatorje, N-terminalna regija pa je signalna domena, ki se pogosto modificira in s tem modulira DNA-vezavno aktivnost C-terminalne regije. Regulatorji iz skupine LuxR so lahko transkripcijski aktivatorji ali represorji in mnogi so aktivni kot homodimeri. Za FkbN homologa pri *S. tsukubaensis* lahko z gotovostjo trdimo, da ima pozitiven vpliv pri regulaciji sinteze FK506, saj je prekinitev tega gena popolnoma prekinila sintezo FK506. Enako lahko sklepamo tudi iz eksperimentov s prekomernim izražanjem FkbN homologa, kjer smo z dodatno kopijo *fkbN* pod kontrolo močnega promotorja Erme\* dosegli povišanje donosa FK506 za približno 50%, kar kaže na velik industrijski potencial uporabe naših eksperimentov.

**UPORABA REZULTATOV:** Podrobno preučevanje regulacije genske skupine FK506v sklopu tega projekta nam nam je omogočilo identifikacijo ključnih genov odgovornih za regulacijo biosinteze FK506. Povečanje donosa FK506, ki smo ga dosegli s povečanim izražanjem dveh regulatornih genov, pa jasno nakazuje uporabno vrednost pridobljenih rezultatov, ki so lahko neposredno uporabni v izboljšavah bioprocesov v farmacevtski industriji.

**SODELOVANJE S TUJIMI PARTNERJI:** Izvedba tega projekta poteka v povezavi s skupino prof. dr. J.F. Martina (INBIOTEC, Univerza Leon, Španija). Raziskovalci prof. Martina so pripravili gensko knjižnico seva *Streptomyces sp.* ATCC55098, Skupina BF pa je v sklopu tega projekta nudila pomoč pri mikrobioloških delih. V sklopu tega sodelovanja je pri nas v laboratoriju Biotehniške fakultete izvajala del doktorske disertacije podoktorska študentka Miriam Castro iz laboratorija prof. Martina. Vodja projekta je v letih 2008 in 2009 enkrat obiskal skupino v Leonu. V sklopu tega projekta pa je tudi potekalo sodelovanje z laboratorijem prof. I.S. Hunterja (Univerza Strathclyde, Škotska) in prof. D. Hranuelija (Prehrambeno biotehniška fakulteta v Zagrebu), ki se nanaša na obdelavo nukleotidnih zaporedji genske skupine in pridobivanje potrebnih bioinformatičnih podatkov.

#### 4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>3</sup>

Ob zaključku projekta lahko ugotovimo, da smo bistveno presegle zastavljene cilje. Razlog za to je predvsem v tem, da smo v letu 2009 uspeli pridobiti dodatna sredstva v sklopu sodelovanj s podjetji Lek/Sandoz in Acies Bio. V okviru delovnih sklopov, ki smo jih predvideli v originalnem programu, ki so bili definirani na naslednjih delovnih paketih (WP) smo izvedli vse naloge v celoti:

1. Razvoj in optimizacija mikrobioloških postopkov, kultivacijskih pogojev in razvoj analitskih metod za ovrednotenje FK506.
  2. Selekcija seva v manjšem obsegu, ki bo zagotavljala ponovljivo produkcijo FK506.
  3. Optimizacija postopka transformacije.
  4. Razvoj orodij za gensko manipulacijo in testiranje primernih integrativnih plazmidov in reporterskih genov.
  5. Priprava kozmidne DNA knjižnice *Streptomyces sp.* ATCC 55098.
  6. Priprava ustreznih DNA sond in identifikacija kozmidov, ki vsebujejo sekvenco DNA za levo in desno stranico PKS genske skupine FK506.
  7. Sekveniranje izbranih DNA kozmidov v bližini genov za PKS, identifikacija odprtih bralnih okvirjev (ORF) in določitev morebitnih funkcij genov.
  8. Preučevanje vloge domnevnih regulatornih genov v biosintezi FK506.
- Kozmidne knjižnice seva *Streptomyces sp.* ATCC 55098 (WP5) nismo pripravili sami, saj smo dobili dostop do knjižnice, ki so jo pripravili v sklopu tega sodelovanja v laboratoriju prof. Martina (Leon, Španija). Sekveniranje celotne skupine za biosintezo FK506 (WP7) smo izvedli še hitreje, kot smo načrtovali, saj smo ga izvedli v sklopu sodelovanja z Lek/Sandoz in Acies Bio in s tem bistveno pospešili delo tega delovnega sklopa. Kot predvideno, smo v sklopu paketa WP8 izvedli vse prekinitve in prekomerne ekspresije ciljnih regulatornih genov in jasno identificirali njihove funkcije. Ob pomoči skupine prof. Hunterja (Univerza Strathclyde, Glasgow) in prof. Hranuelija (Univerza v Zagrebu) pa smo še dodatno obdelali ciljna nukleotidna zaporedja in pridobili potrebne bioinformatične podatke. Začeli pa smo tudi izvajati transkripcijske analize izražanja ciljnih regulatornih genov s pomočjo metod RT PCR in poročevalskega sistema kalkonske sintaze, ki smo ga razvili v našem laboratoriju.

#### 5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta<sup>4</sup>

Kot omenjeno v točki 4., smo izvedli vsa predvidena dela, glede na zastavljen program. Edina večja sprememba, ki jo omenjamo tudi v točki 3, je zamenjava seva, ki smo jo izvedli v drugem letu projekta. Namesto seva *Streptomyces sp.* ATCC 55098 smo uporabljali sev *Streptomyces tsukubaensis*, ki dosega bistveno višji donos FK506 in je tudi morfološko bolj primeren za delo. Ta sev pa je sicer nekoliko bolj zahteven za izvajanje genskih manipulacij, vendar pa smo s pomočjo raziskovalcev podjetij Acies Bio in Lek/Sandoz, uspešno izvedli tudi najzahtevnejše manipulacije ter tako izvedli večino del v sevu *S. tsukubaensis*.

#### 6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine<sup>5</sup>

Znanstveni rezultat			
1.	Naslov	SLO	Vloga regulatornih genov rapH in rapG v biosintezi rapamicina
		ANG	The role of rapH and rapG genes in the biosynthesis of rapamycin
	Opis	SLO	V tem delu je bila preučena vloga dveh regulatornih genov rapG in rapH v biosintezi medicinsko in industrijsko pomembnega naravnega produkta rapamicina, ki ga proizvaja <i>Streptomyces hygroscopicus</i> . S prekomernim izražanjem se je bistveno povečal donos, dočim je delecija teh dveh genov rezultirala v popolni prekinitvi biosinteze rapamicina. V tem članku so razloženi osnovni mehanizmi regulacije biosinteze rapamicina, potrjena

			vpletenost genov rapG in rapH, spoznanja pa so neposredno uporabna za industrijske cilje za povečanje donosa rapamicina.
		ANG	In this work, the role of rapH and rapG regulatory genes in the biosynthesis of rapamycin, a natural product of industrial importance, produced by <i>S. hygroscopicus</i> was studied. Overexpression of either gene resulted in a increase in rapamycin biosynthesis, confirming their positive regulatory role, while deletion of both of these genes resulted in a complete loss of antibiotic production. This paper therefore provided an initial understanding of two elements in the regulatory pathways, with the aim of exploiting this information to enhance the fermentation yields of rapamycin.
	Objavljeno v		KUŠČER, Enej, COATES, Nigel, CHALLIS, Iain, GREGORY, Matthew Alan, WILKINSON, Barrie, SHERIDAN, Rose M., PETKOVIĆ, Hrvoje. Roles of rapH and rapG in positive regulation of rapamycin biosynthesis in <i>Streptomyces hygroscopicus</i> : Enej Kuščer ... [et al.]. <i>J Bacteriol</i> , 2007, vol. 189, no. 13, str. 4756-4763. [COBISS.SI-ID 3310200] JCR IF: 4.013, SE (17/94), microbiology.
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		3310200
2.	Naslov	SLO	Substratna specifičnost aciltransferaznih domen EpoC pri epotilonski poliketidni sintazi
		ANG	Substrate specificity of the acyl transferase domains of EpoC from the epothilone polyketide synthase
	Opis	SLO	Preučevali smo specifičnost epotilonskih aciltransferaz (AT), ki odločajo o izbiri podaljševalnih enot v času biosinteze poliketidnih spojin in na takšen način bistveno vplivajo na končno strukturo te medicinsko pomembne protirakaste učinkovine. Pokazali smo tudi, da se lahko s pomočjo ciljno specifične (site-directed) mutagenoze vpliva na specifičnost AT domen. V tem eksperimentu smo uporabili AT domene iz FKBP12 imunofilinskih ligandov, kot so FK506 in rapamicina. Znanja pridobljena v epotilonskem sistemu nas usmerjajo v pristopih manipulacije PKS sistema, kot je to npr. FK506.
		ANG	We have studied specificity of epothilone acyltransferases (AT), which determine the choice of extender units during polyketide biosynthesis, thus shaping the final structure of this medically important anticancer drug. We have demonstrated that by using site-directed mutagenesis, it is possible to alter specificity of AT domain. In this experiment AT domain from FKBP12 immunophylin, such as FK506 and rapamycin were used as well. The knowledge generated in the epothilone system will lead our further efforts for PKS engineering of polyketide structures such as FK506.
	Objavljeno v		PETKOVIĆ, Hrvoje, SANDMANN, Axel, CHALLIS, Iain R., HECHT, Hans-Jürgen, SILAKOWSKI, Barbara, LOW, Lindsey, BEESTON, Nicola, KUŠČER, Enej, GARCIA-BERNARDO, Jose, LEADLAY, Peter Francis, KENDREW, Steven Gary, WILKINSON, Barrie, MÜLLER, Rolf. Substrate specificity of the acyl transferase domains of EpoC from the epothilone polyketide synthase. <i>Organic and Biomolecular Chemistry</i> . [Print ed.], 2008, vol. 6, no. 3, str. 500-506. [COBISS.SI-ID 3401080], JCR IF (2007): 3.167
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		3401080
3.	Naslov	SLO	Regulatorni elementi v genski skupinah tetraciklinskih antibiotikov
		ANG	Regulatory elements in tetracycline-encoding gene clusters
	Opis	SLO	Izražanje bakterijskih poliketidnih genskih skupin je pogosto regulirano s številnimi različnimi družinami regulatornih proteinov, kot je to primer pri tudi FK506. V tem članku smo izvedli primerjalno bioinformatično analizo regulatornih genov, ki se nahajajo v oksitetraciklinski genski skupini v <i>Streptomyces rimosus</i> in klortetraciklinski genski skupini v <i>S. aureofaciens</i> , identificirali smo nov regulatorni gen otcG iz družine LAL(luxR), in ga z eksperimenti prekinitve in povečanim izražanjem otcG gena ovrednotili kot pogojno pozitivni regulator.
		ANG	The expression of bacterial polyketide synthase gene clusters is often controlled by a number of different families of regulatory proteins, such as regulatory proteins from FK506. In this article, we have undertaken a comparative bioinformatic analysis of the regulatory genes present in the

		oxytetracycline and chlortetracycline gene clusters of <i>Streptomyces rimosus</i> and <i>S. aureofaciens</i> . We have identified a new LAL(luxR)-family regulatory gene, <i>otcG</i> . By applying gene disruption and over-expression experiments we have demonstrated a positive role of <i>otcG</i> .
Objavljeno v		LEŠNIK, Urška, GORMAND, Amelie, MAGDEVSKA, Vasilka, FUJS, Štefan, RASPOR, Peter, HUNTER, Iain S., PETKOVIČ, Hrvoje. Regulatory elements in tetracycline-encoding gene clusters : the <i>otcG</i> gene positively regulates the production of oxytetracycline in <i>Streptomyces rimosus</i> . Food technol. biotechnol., 2009, vol. 47, no. 3, str. 323-330. [COBISS.SI-ID 3608696]
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
COBISS.SI-ID		3608696
4.	Naslov	<i>SLO</i> Regulacija produkcije tetraciklinskih antibiotikov
		<i>ANG</i> Regulation of tetracycline antibiotics production
	Opis	<i>SLO</i> V sklopu tega prispevka smo prikazali rezultate raziskav na regulatornih genih, ki se nahajajo v genskih skupinah za biosintezo treh tetraciklinskih antibiotikov. Identificirali smo regulatorne gene, ki uravnavajo biosintezo dveh industrijsko pomembnih tetraciklinov, klortetraciklina in oksitetraciklina in novega tetraciklina kelokardina. S pomočjo novejših metod metabolnega inženirstva so bili nekateri sevi gensko manipulirani in tako pridobljeni rezultati so nam omogočili bolj poglobljeno razumevanje delovanja teh regulatornih elementov in njihovega vpliva na končni donos.
		<i>ANG</i> In this article we show the results of research on the regulatory genes located in gene clusters for biosynthesis of three tetracycline antibiotics. We have identified regulatory genes that regulate the biosynthesis of two industrially important tetracyclines, chlortetracycline and oxytetracycline and new tetracycline chelocardin. With use of metabolic engineering methods some strains have been genetically manipulated and so obtained results allow us to have a deeper understanding of these regulatory elements and their effect on the final yield.
	Objavljeno v	SLADIČ, G., LEŠNIK, U., MAGDEVSKA, V., HORVAT, J., RASPOR, P., FUJS, Š., HUNTER, I. S., PETKOVIČ, H. Regulatorni elementi v skupinah genov za biosintezo tetraciklinskih antibiotikov = Regulatory elements in gene clusters of tetracycline antibiotics. V: RASPOR, P. (ur.), PETKOVIČ, H. (ur.). Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 29. in 30. januar 2009, Ljubljana. Protimikrobne snovi. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2009, str. 87-95.
	Tipologija	1.06 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci (vabljen predavanje)
	COBISS.SI-ID	3580280
5.	Naslov	<i>SLO</i> Identifikacija genov za biosintezo alilne skupine v FK506
		<i>ANG</i> Identification of genes for biosynthesis of allyl group in FK506
	Opis	<i>SLO</i> V tem članku smo identificirali prej nepoznano regije genske skupine FK506 iz bakterije <i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488, ki vsebuje gene za zagotavljanje nenavadnih gradnikov za biosintezo FK506. Med drugim smo opredelili skupine genov, ki kodirajo biosintezo podaljševalne enote, ki določa alilno skupino na C21 spojine FK506, ki je sekundarni metabolit z močnimi imunopresivno aktivnostjo in je trenutno registriran za uporabo kot imunopresant pri presaditvi organov. Zanimivo je, da smo opredelili majhen neodvisen sistem diketid-sintaze, ki je vpletena biosintezo alilne skupine.
		<i>ANG</i> In this article we report the identification of a previously unidentified region of the FK506 gene cluster from <i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488 containing genes encoding provision of unusual building blocks for FK506 biosynthesis. Among others, we identified a group of genes encoding biosynthesis of the extender unit which provides the allyl group at C21 of FK506, a secondary metabolite with a potent immunosuppressant, currently registered for use after organ transplantation. Interestingly, we have identified a small independent diketide synthase system involved in the biosynthesis of allylgroup.
	Objavljeno v	GORANOVIČ, Dušan, KOSEC, Gregor, MRAK, Peter, FUJS, Štefan, HORVAT, Jaka, KUŠČER, Enej, KOPITAR, Gregor, PETKOVIČ, Hrvoje. Origin of the Allyl group in FK506 biosynthesis. J Biol Chem, 2010, str. [1-11, v tisku], doi: 10.1074/jbc.M109.059600. [COBISS.SI-ID 3754104]

Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
COBISS.SI-ID	3754104

## 7. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine<sup>6</sup>

Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat			
1.	Naslov	SLO	Nov in patentno-neodvisen biosintezni proces za proizvodnjo generičnega produkta
		ANG	New and patent-independent biosynthetic process for production of generic product
	Opis	SLO	V sodelovanju s Krko d.d. smo razvili nov in patentno-neodvisen biosintezni proces za proizvodnjo generičnega produkta iz skupine sekundarnih metabolitov, za katerega je bila vložena tudi PCT patentna aplikacija. Določena znanja pridobljena tekom tega raziskovalnega projekta so pripomogla k nastanku te patentne aplikacije.
		ANG	In collaboration with pharmaceutical company Krka, we have developed a new and patent-independent fermentation process for production of generic product from group of secondary metabolites. PCT patent application was filed. Some of the expertise acquired during this research project has contributed to the creation of this patent application.
Šifra		F.09 Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
Objavljeno v		GASPARIČ, Aleš, BENIČKI-ŠVAGELJ, Neda, RASPOR, Peter, FUJS, Štefan, SLADIČ, Gordan, PELKO, Mitja, PETKOVIČ, Hrvoje. Fermentative production of lipstatin : European patent application : EP 1 860 194 A1 : application number 06010470.0. Paris: Europäisches Patentamt: = European Patent Office: = Office européen des brevets, 28.11.2007. 13 str. [COBISS.SI-ID 3393144]	
Tipologija		2.23 Patentna prijava	
COBISS.SI-ID		3393144	
2.	Naslov	SLO	Konstrukcija mutanta za proizvodnjo novih rapamicinov
		ANG	Construction of mutant for novel rapamycin analogues production
	Opis	SLO	Patent opisuje konstrukcijo specifičnega mutanta <i>S. hygroscopicus</i> , ki je bil uporabljen za proizvodnjo novih imunosupresivnih in protirakastih učinkovin analogov rapamicina z različnimi začetnimi enotami (licenco za to tehnologijo uporablja farmacevtska družba Wyeth). Patent je dodeljen v EU (EP1589031) in ZDA (US7300942). Tehnologija pa je licencirana farmacevtskem podjetju Wyeth. Določena znanja, ki smo jih pridobili med pripravo tega patenta, smo uporabili tudi tekom izvedbe tega projekta.
		ANG	Patent describes construction of specific mutant of <i>Streptomyces hygroscopicus</i> which was used to generate novel rapamycin analogues using precursor-directed biosynthesis (Technology was licenced to pharmaceutical company Wyeth). Patent is now granted in Europe (EP1589031) and USA (US7300942). Some of the expertise acquired during the preparation of this patent, was used during the execution of this project.
Šifra		F.32 Mednarodni patent	
Objavljeno v		GREGORY, Matthew Alan, GAISSER, Sabine, PETKOVIČ, Hrvoje, MOSS, Steven J.. Production of polyketides and other natural products : patent no. US 7,390,895 B2. Alexandria (Va.): United States Patent and Trade Office, 24.06.2008. [COBISS.SI-ID 3622008]	
Tipologija		2.24 Patent	
COBISS.SI-ID		3622008	
3.	Naslov	SLO	Uredništvo nacionalne monografije: Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost: Protimikrobne snovi
		ANG	Editor of the national monography: Conference »Biotechnology and Microbiology for the future: Antimicrobial agents“
	Opis	SLO	V publikaciji so zbrani prispevki slovenskih raziskovalnih skupin in slovenskih podjetij, ki se ukvarjajo z raziskavami na področju protimikrobnih snovi. Predstavljeni so bili različni prispevki, s področja proizvodnje različnih mikrobioloških in rastlinskih protimikrobnih snovi, ki se uporabljajo v

		farmaciji, živilstvu in medicini, mehanizmi njihovega delovanja, regulacija njihove biosinteze, njihova izolacija in pojav rezistenc.
	ANG	Publication includes articles of Slovene research groups and companies in the field of antibiotics. Presentation and publication presents extensive work of Slovene academic and industrial institutions from field of production of microbial and plant antimicrobial agents, applied in pharmacy, food production and medicine, mechanisms of their action, regulation of their biosynthesis, their isolation and occurrence of resistance
Šifra		C.02 Uredništvo nacionalne monografije
Objavljeno v		RASPOR, Peter (ur.), PETKOVIČ, Hrvoje (ur.). Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 29. in 30. januar 2009, Ljubljana, Protimikrobne snovi, (Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 06). Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2009. XIII, 288 str., ilustr. ISBN 978-961-6333-71-9. [COBISS.SI-ID 243594496].
Tipologija		2.32 Zbornik recenziranih znanstvenih prispevkov na domači konferenci
COBISS.SI-ID		243594496
4. Naslov	SLO	Vabljen predavanje na znanstvenem srečanju »Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost«
	ANG	Invited lecture on scientific meeting »Biotechnology and Microbiology for the future«
Opis	SLO	Predavanje na znanstvenem srečanju na katerem so bili predstavljeni novi pristopi za pripravo novih spojin poliketidnega izvora, ki predstavljajo širok spekter biološko aktivnih učinkovin, kot so protibakterijske, protiglivne, protirakaste in imunosupresivne aktivnosti. Mnoge izmed teh molekul in njihovi pol-sintezni derivati so danes v klinični uporabi. V tem preglednem članku predstavljamo predvsem novejši dosežki na področju biosinteznega inženiringa encimov, ki so vpleteni v biosintezo mikrobnih učinkovin poliketidnega izvora.
	ANG	Lecture on scientific meeting where new biosynthetic engineering approaches were presented for preparation of novel polyketide compounds, which possess a wealth of pharmacological effects, including antibacterial, antifungal, antiparasitic, anticancer and immunosuppressive activities. Many of these compounds and their semi-synthetic derivatives are used today in the clinic. Recent advances in the area of biosynthetic engineering of the enzymes involved in polyketide biosynthesis are presented in this review
Šifra		B.04 Vabljen predavanje
Objavljeno v		BLAŽIČ, M., LEŠNIK, U., KUŠČER, E., PETKOVIČ, H. Biosintezni inženiring : novejši postopki pri razvoju protimikrobnih učinkovin = Biosynthetic engineering : new approaches to developing antimicrobial substances. V: RASPOR, P. (ur.), PETKOVIČ, H. (ur.). Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 29. in 30. januar 2009, Ljubljana. Protimikrobne snovi: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2009, str. 47-57.
Tipologija		1.06 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci (vabljen predavanje)
COBISS.SI-ID		3577976
5. Naslov	SLO	Identifikacija genov za biosintezo novih tetraciklinskih analogov
	ANG	Identification of genes for biosynthesis of novel tetracycline analogs
Opis	SLO	Kelokardin je poliketid iz skupine tetraciklinov. Klonirali in sekvencirali smo gensko skupino za biosintezo tega sekundarnega metabolita, ki prej ni bila poznana in izum patentirali. Patent štiti uporabo genske skupine kelokardina za dizajniranje novih kelokardinskih analogov s postopki biosinteznega in polsinteznega kemijskega inženiringa in je bil oddan na Evropski (EPO) in Ameriški (USPTO) patentni urad. Določena znanja, ki smo jih pridobili med pripravo tega patenta, smo uporabili tudi tekom izvedbe tega projekta.
	ANG	Chelocardin is a polyketide from the group of tetracyclins. We have cloned and sequenced its biosynthetic gene cluster which was previously unknown and patented the invention. The patent protects the rights to exploit the chelocardin gene cluster for novel chelocardin analogues design using the biosynthetic and semisynthetic chemical approaches and was filed at the European Patent Office (EPO) and United States Patent and Trademark Office (USPTO). Some of the expertise acquired during the preparation of this



	patent, was used during the execution of this project.
Šifra	F.32 Mednarodni patent
Objavljeno v	PETKOVIĆ, Hrvoje, RASPOR, Peter, LEŠNIK, Urška. Genes for biosynthesis of tetracycline compounds and uses thereof : European patent application : EP 2 154 249 A1 : application patent no. 08014141.9. München: Europäisches Patentamt: = European Patent Office: = Office européen des brevets, 17.02.2010. [COBISS.SI-ID 3689080]
Tipologija	2.24 Patent
COBISS.SI-ID	3689080

## 8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine<sup>7</sup>

V obdobju poteka tega projekta smo poleg regulacije delo na področju preučevanja biosinteze FK506 razširili tudi na druge vidike. Raziskovalne aktivnosti na tem področju smo povečali v sklopu sodelovanja s farmacevtskim podjetjem Lek/Sandoz in biotehnološkim razvojnim podjetjem Acies Bio. Nekateri raziskovalci projektne skupine so se v tem času zaposlili tudi v mladem biotehnološkem podjetju Acies Bio, ki so ga ustanovili nekdanji raziskovalci Biotehniške fakultete. V sklopu tega projekta so izvajali del eksperimentalnega dela tudi trije doktoranti, zaposleni v Acies Bio in na Biotehniški fakulteti, ki so sedaj v različnih stopnjah svojega študija.

## 9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine<sup>8</sup>

### 9.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>9</sup>

SLO

Poliketidi so zelo obsežna skupina naravnih produktov, ki vključujejo protibakterijske učinkovine kot so eritromicin in tetraciklin, protiglivne učinkovine (nistatin, amfotericin), protirakaste učinkovine (doksirubicin, rapamicin in epotilon), protizajedalske učinkovine (avermektin), imunosupresive, kot sta FK520 in FK506 in mnogo drugih medicinsko pomembnih metabolitov, kar se odraža v velikem gospodarskem pomenu. Glede na velik pomen teh spojin so večino genskih skupin, ki kodirajo biosintezo teh medicinsko pomembnih kemijskih struktur, do danes že klonirali in določili njihovo nukleotidno zaporedje. Kljub temu so mnogi vidiki biosinteze teh sekundarnih metabolitov ostali do danes nepojasneni. Razen nekaterih izjem je poznavanje regulacije biosinteze sekundarnih metabolitov in regulacije izražanja genov PKS, ki vključuje veliko različnih procesov v produkcijskem organizmu, ostalo relativno omejeno. Trenutno obstaja zelo malo literaturnih podatkov o regulaciji biosinteze strukturno sorodnih makrolaktonov rapamicina, FK520 in FK506. Celotni genski skupini rapamicina in FK520 sta bili sekvenirani, identificirali pa so tudi številne domnevne regulatorne genske homologe. Objavljena sekvenca genske skupine za biosintezo FK506 *Streptomyces* sp. ATCC 55089 pa ne vsebuje domnevnih genskih homologov, ki kodirajo regulatorne proteine. V sklopu tega projekta smo sekvencirali celotno gensko skupino za biosintezo FK506 in identificirali nove odprte bralne okvirje (domnevne gene), ki so glede na bioinformatične podatke vpleteni v biosintezo nekaterih nenevadnih gradbenih enot. Identificirali smo tudi tri regulatorne gene, katerih vlogo v regulaciji biosinteze FK506 smo podrobno preučili. Ugotovili smo, da sta dva od teh pot-specifična regulatorja t.i. pozitivna regulatorja, ki lahko bistveno vplivata na končni donos ciljnega produkta.

ANG

Polyketides are a large group of natural products which includes antibacterials such as erythromycin and tetracyclin, antifungals (nystatin and amphotericin), anti-cancer compounds (doxorubicin, rapamycin and epothilon), anti-parasitic agents (ivermectin), immunosuppressives such as FK506 and FK520 and many other clinically important metabolites with great economic significance. Due to the importance of these compounds the majority of their biosynthetic gene clusters have been cloned and sequenced. Nevertheless, many aspects of the biosynthesis of these secondary metabolites have remained obscure. Apart from few exceptions, the knowledge on the regulation of secondary metabolite biosynthesis including the regulation of expression of PKS genes has remained scarce, however, many processes in the production organism are known to be involved. Currently, literature data about the regulation of biosynthesis of structurally related macrolactones rapamycin, FK506 and FK520 is limited. Entire biosynthetic gene clusters of rapamycin and FK520 have been sequenced and several putative regulatory gene homologues have been identified. On the other hand, the published sequence of the FK506 gene cluster from *Streptomyces* sp. ATCC55089 does not contain putative gene homologues encoding regulatory proteins. In the scope of this project, the entire

FK506 biosynthetic gene cluster has been sequenced and novel open reading frames (putative genes) have been identified which seem to be involved in the provision of unusual building blocks according to bioinformatic data. In addition, three regulatory genes have been identified and their role in the regulation of FK506 biosynthesis has been thoroughly studied. We have established that two of these genes are positive pathway-specific regulators which drastically affect the yield of the target product.

## 9.2. Pomen za razvoj Slovenije<sup>10</sup>

SLO

Farmacevtska industrija ima pomembno vlogo v družbeno-ekonomskem razvoju Slovenije, predvsem dve farmacevtski tovarni, Krka d.d. in Lek d.d., član skupine Sandoz. Bioprocena tehnologija je pomemben sestavni del aktivnosti teh dveh podjetij. Krka d.d. je eden pomembnejših proizvajalcev različnih sekundarnih metabolitov, kot so antibiotiki bacitracin, oksitetraciklin, salinomycin, lipstatin in učinkovina za zniževanje holesterola lovastatin. Prav tako Lek, d.d. proizvaja ergot-alkaloide, vankomicin, gentamicin, klavulanovo kislino in pravastatin. Rapamicin, FK506 in FK520 in njihovi novi analogi bodo v bližnji prihodnosti nedvomno imeli pomembno vlogo v medicini, kot tudi v farmacevtski industriji, kjer Slovenija ni izjema. Lek/Sandoz proizvaja FK506 (tacrolimus) z biosinteznim procesom s *Streptomyces* sp. Boljše poznavanje regulacije biosinteze FK506 bo zato nedvomno uporabno tudi pri povečanju končnega donosa ali zmanjšanju količine nezaželenih intermediatov in stranskih produktov. S povečanim razumevanjem regulatornih sistemov, ki uravnavajo biosintezo FK506 nismo le doprinesli novih spoznanj, ki bodo pospešila razvoj novih analogov FK506, ampak smo tudi pokazali, da se lahko z manipulacijo tovrstnih regulatornih genov dvigne donos ciljnega produkta. Predvidevamo, da so rezultati izvedenih raziskav poglobili razumevanje regulacije biosinteze FK506 oziroma sekundarnih metabolitov nasploh, nova spoznanja pa bodo uporabna za izboljšavo sevov in bioprocsov v industrijskem okolju.

ANG

Pharmaceutical industry, especially two companies, Krka d. d. and Lek Pharmaceuticals d. d. a member of the Sandoz group,, plays a vital role in the social and economic development of Slovenia. Bioprocess technology is an important part of activities of these two companies. Krka d. d. is an important producer of diverse secondary metabolites, such as antibiotics bacitracin, oxytetracyclin, salinomycin, lipstatin and the cholesterol lowering drug lovastatin. Likewise, Lek Pharmaceuticals produces ergot-alkaloids, vancomycin, gentamicin, clavulanic acid and pravastatin. In the near future, rapamycin, FK506 and FK520 as well as their novel analogues are sure to play an important role in medical practice as well as in the pharmaceutical industry, whereby Slovenia will not be exempted. Lek/Sandoz is producing FK506 (tacrolimus) using a biosynthetic procedure based on the microorganism *Streptomyces* sp. Deeper understanding of the regulation of FK506 biosynthesis will clearly be applicable in increasing the final yield of FK506 and reducing the concentration of undesired intermediates and side products. In addition to showing that manipulation of regulatory genes can improve the yield of the final metabolite, better understanding of regulatory systems can also accelerate the development of novel FK506 analogues. We believe that our results have significantly improved the understanding of the regulation of FK506 biosynthesis as well as secondary metabolites in general and moreover, new insights will be widely applicable in the field of strain improvement and bioprocess development in industrial environment.

## 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	
<b>F.01</b>	<b>Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin</b>
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov <input type="text"/>
<b>F.02</b>	<b>Pridobitev novih znanstvenih spoznanj</b>
	Zastavljen cilj <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat <input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.03</b>	<b>Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.04</b>	<b>Dvig tehnološke ravni</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.05</b>	<b>Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.06</b>	<b>Razvoj novega izdelka</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.07</b>	<b>Izboljšanje obstoječega izdelka</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.08</b>	<b>Razvoj in izdelava prototipa</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.09</b>	<b>Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.10</b>	<b>Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.11</b>	<b>Razvoj nove storitve</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.12</b>	<b>Izboljšanje obstoječe storitve</b>	

	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.13</b>	<b>Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.14</b>	<b>Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.15</b>	<b>Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.16</b>	<b>Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.17</b>	<b>Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.18</b>	<b>Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.19</b>	<b>Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.20</b>	<b>Ustanovitev novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.21</b>	<b>Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.22</b>	<b>Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.23</b>	<b>Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.24</b>	<b>Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.25</b>	<b>Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.26</b>	<b>Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.27</b>	<b>Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.28</b>	<b>Priprava/organizacija razstave</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.29</b>	<b>Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.30</b>	<b>Strokovna ocena stanja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	

		<input type="text"/>
<b>F.31</b>	<b>Razvoj standardov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.32</b>	<b>Mednarodni patent</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.33</b>	<b>Patent v Sloveniji</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.34</b>	<b>Svetovalna dejavnost</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.35</b>	<b>Drugo</b>	
	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	
<b>G.01</b>	<b>Razvoj visoko-šolskega izobraževanja</b>					
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"/>	
<b>G.02</b>	<b>Gospodarski razvoj</b>					
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="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.03</b>	<b>Tehnološki razvoj</b>					
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"/>	
<b>G.04</b>	<b>Družbeni razvoj</b>					
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"/>	
<b>G.05.</b>	<b>Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete</b>					
<b>G.06.</b>	<b>Varovanje okolja in trajnostni razvoj</b>					
<b>G.07</b>	<b>Razvoj družbene infrastrukture</b>					
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"/>	
<b>G.08.</b>	<b>Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva</b>					
<b>G.09.</b>	<b>Drugo:</b>					

**Komentar**

--

**12. Pomen raziskovanja za sofinancerje, navedene v 2. točki<sup>11</sup>**

1.	<b>Sofinancer</b>		
	<b>Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje</b>		<b>EUR</b>

	<b>trajanja projekta je znašala:</b>		
	<b>Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:</b>		<b>%</b>
	<b>Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja</b>		<b>Šifra</b>
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
	<b>Komentar</b>		
	<b>Ocena</b>		
2.	<b>Sofinancer</b>		
	<b>Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:</b>		<b>EUR</b>
	<b>Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:</b>		<b>%</b>
	<b>Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja</b>		<b>Šifra</b>
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
	<b>Komentar</b>		
	<b>Ocena</b>		
3.	<b>Sofinancer</b>		
	<b>Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:</b>		<b>EUR</b>
	<b>Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:</b>		<b>%</b>
	<b>Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja</b>		<b>Šifra</b>
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		



	<b>Komentar</b>		
	<b>Ocena</b>		

### 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:

Hrvoje Petković	in	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseba RO

Kraj in datum:

Ljubljana,

14.4.2010

#### Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2010-1/147

<sup>1</sup> Samo za aplikativne projekte. [Nazaj](#)

<sup>2</sup> 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](#)

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

<sup>4</sup> 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](#)

<sup>5</sup> 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](#)

<sup>6</sup> 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](#)

<sup>7</sup> 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](#)

<sup>8</sup> 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](#)

<sup>9</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

<sup>10</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

<sup>11</sup> 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

81-47-8C-D2-53-04-73-C6-27-A8-5A-1A-EF-B1-2A-F8-8C-74-3C-96