

Oznaka poročila: ARRS_ZV_RPROJ_ZP_2008/65

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	Z4-9595
Naslov projekta	Novi inhibitorji receptorja bakterijskega endotoksina MD-2 na osnovi vezave v hidrofobni žep
Vodja projekta	17915 Helena Gradišar
Tip projekta	Zt Podoktorski projekt - temeljni
Obseg raziskovalnih ur	3.400
Cenovni razred	B
Trajanje projekta	01.2007 - 12.2008
Nosilna raziskovalna organizacija	104 Kemijski inštitut
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Družbeno-ekonomski cilj	11 Neusmerjene raziskave (temeljne)

2. Sofinancerji¹

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

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta²

Raziskovalna hipoteza

Naraven imunski sistem omogoča človeškemu organizmu hitro prepoznavanje in odgovor na prisotnost patogenih organizmov (bakterij, gliv, virusov). Pretiran odziv imunskega sistema lahko vodi do sepse, kjer je zdravljenje predvsem simptomatsko in smrtnost ostaja visoka (30-50%). Pojavnost sindroma v medicini narašča in kljub intenzivnim raziskavam na molekularnem nivoju ostaja

preprečevanje in zdravljenje sepse velik izziv.

Imunske celice med številnimi receptorji, preko katerih uravnavajo stopnjo in tip celičnega odziva, izražajo tudi receptorski kompleks TLR4/MD-2 (Toll-like receptor 4, myeloid differentiation-2). Kompleks prepozna endotoksin (LPS, lipopolisaharid), enega najmočnejših stimulatorjev imunskega sistema, ki se nahaja v celični membrani Gram- bakterij. TLR4 je membranski glikoprotein in je odgovoren za prenos signala preko membrane v celico, vendar sam direktno ne veže LPS. Koreceptorski protein MD-2, ki je vezan na izvencelično domeno TLR4, je neobhodno potreben za aktivacijo celic, saj neposredno veže LPS. Signaliziranje LPS poteka izključno preko TLR4/MD-2.

MD-2 je zadnji LPS-vezalni protein pred sprožitvijo signala znotraj celice. Zaradi ključne vloge pri prepoznavanju LPS predstavlja MD-2 zelo primerno tarčo za farmakološko intervencijo. Protein MD-2 s tega vidika še ni bil raziskan, zato je bila naša **osnovna hipoteza projekta**, da bi lahko na osnovi strukturnega modela MD-2 (v času trajanja projekta je bila določena kristalna struktura proteina MD-2, ki je potrdila naš model) in opisanih bioloških lastnosti identificirali in ovrednotili spojine, ki bi z vezavo na MD-2 preprečile vezavo LPS in tako učinkovito inhibirale signalizacijo preko receptorskega kompleksa TLR4/MD-2. Spojine, ki bi na MD-2 zasedle vezavno mesto za LPS, bi delovale antagonistično in bi predstavljale izhodne spojine za potencialna zdravila proti sepsi, kot tudi proti drugim vnetnim boleznim, pri katerih je udeležen receptorski kompleks TLR4/MD-2 (rak na želodcu, revmatoidni artritis, Crohnova bolezen, ateroskleroza...).

Opis raziskovanja

1. Identifikacija potencialnih ligandov, ki bi se (kovalentno) vezali v hidrofobni žep proteina MD-2

MD-2 je protein, ki pri aktivaciji imunskih celic veže bakterijsko komponento endotoksin LPS, s čimer sproži imunski odziv okuženega organizma. V svoji tridimenzionalni strukturi ima MD-2 hidrofoben žep, kamor se LPS ujame. Na osnovi našega strukturnega modela smo odkrili, da se v notranjosti žepa nahaja edini prosti cistein s prosto -SH skupino (Cys133). Predvidevali smo, da bi spojine, ki bi se vezale v hidrofobni žep MD-2 in se kovalentno vezale na prosto -SH skupino cisteina, predstavljale nov tip ireverzibilnih inhibitorjev, ki bi zavrla signalno pot preko kompleksa TLR4/MD-2. Doslej so raziskovalci iskali antagoniste le med spojinami, ki so strukturno podobne LPS.

Kandidate za testiranje smo poiskali med sintetičnimi in naravnimi spojinami, katerih imunosupresivno delovanje na stimulacijo z LPS je opisano v znanstveni literaturi. Večinoma tarče oz. mehanizmi delovanja teh učinkovin niso poznani. Izbrali smo spojine z veliko afiniteto do hidrofobnega žepa in po možnosti s tiol-reaktivno skupino (maleimidno, tioestersko, tiolno, α,β -nenasičeno karbonilno skupino), zaradi katerih predpostavljamo, da se bodo molekule uspešno ujele v hidrofobni žep. V ožji izbor je prišlo 35 spojin. Med posebej zanimivimi so zlasti fitospojine kot so kurkumin, kvercetin, katehini zelenega čaja, resveratrol, likopen, kapsaicin,... za katere je znano protivnetno delovanje. Precej izbranih spojin se v medicini že uporablja za zdravljenje bolezni z drugimi indikacijami: taxol, taxoter, auranofin, JTT-705, kolhicin, geneticin, doksorubicin, ibuprofen, roksitromicin, rapamicin, deksametazon, talidomid, fosfomicin, kaptopril, geldanamycin, artemisinin... Za testiranje smo izbrali tudi fluorescentni spojinini IAANS (analog

bisANS, za katerega smo pokazali, da se veže v hidrofobni žep na vezavno mesto za LPS) ter N-piren maleimid, za kateri smo predvidevali lažje sledenje morebitne kovalentne vezave.

2. *In vitro* testiranje neposredne vezave spojin na rekombinantno pridobljen MD-2 in identifikacija mesta vezave na MD-2

Prvo sito za identifikacijo spojin, ki se vežejo na MD-2, je bila uporaba fluorescenčne spektroskopije. S sledenjem lastne fluorescence spojine ali fluorescence markerja bisANS smo izmerili neposredno vezavo testne spojine na MD-2. Princip meritve temelji na izpodrivanju v hidrofobni žep vezanega bisANS s testno spojino, pri čemer se fluorescence kompleksa bisANS/MD-2 manjša z večanjem koncentracije dodane spojine. Testirali smo 35 spojin, vezavo na MD-2 je pokazalo 20 spojin. Najboljše konstante izpodrivanja so bile v mikromolarnem območju (katehin EGCG, kurkumin, artemisinin, geldanamycin, taxol, taxotere). Z metodo ELISA, ki je bolj specifična, smo opravili nadaljnjo selekcijo. Razvili smo tri različne izvedbe ELISA testa. ELISA plošče smo prevlekli (i) s proteinom MD-2, (ii) ali s poliklonskimi protitelesi, ki prepoznavajo MD-2, (iii) ali z LPS. Princip metode temelji na vezavi testne spojine na MD-2, kar prepreči vezavo LPS ali protiteles na MD-2, če se je spojina vezala v hidrofobni žep. Različne izvedbe ELISA testa niso vplivale na vrednosti rezultatov. Rezultati so pokazali, da se fitospojini kurkumin in katehin EGCG iz zelenega čaja, ter tiol-reaktivne spojine auranofin, JTT 705, N-pirenmaleimid, IAANS vežejo na MD-2 (mikromolarne koncentracije) in zasedejo vezavno mesto za LPS. Vezava spojine je bila ob odsotnosti –SH skupine (uporaba mutante Cys133Phe ali z IAA zaščitena –SH skupina) precej manjša, kar kaže na pomembnost prisotnosti proste –SH skupine.

3. Spremljanje konformacijskih sprememb ob vezavi spojine na MD-2

Predvidevali smo, da morda vezava spojine v hidrofobni žep povzroči konformacijske spremembe MD-2, kar je primer pri nekaterih drugih proteinih. Z merjenjem cirkularnega dikroizma smo ob vezavi spojine (taxol, takoter, JTT-705) spremljali spremembe sekundarne (daljnji UV) in terciarne (bližnji UV) strukture MD-2. Konformacijskih sprememb MD-2 nismo zaznali, kar kaže na to, da se struktura MD-2 ob vezavi spojine v hidrofobni žep skoraj ne spremeni.

4. Potrditev kovalentne vezave spojin na tiolno skupino prostega cisteina v hidrofobnem žepu MD-2

Naša hipoteza predpostavlja možnost kovalentne vezave spojine v hidrofobnem žepu MD-2, kajti tiol-reaktivne spojine vsebujejo skupino, ki je reaktivna s prosto –SH skupino cisteina v hidrofobnem žepu (Cys133) in lahko tvorita kovalentno vez. Možno kovalentno vezavo spojine auranofin (vsebuje zlato) na cistein v hidrofobnem žepu smo poskusili dokazati z masno spektroskopijo, vendar smo imeli težave zaradi občutljivosti proteina. Kljub optimizaciji nam na ta način kovalentne vezave ni uspelo dokazati.

Kovalentno vezavo smo poskusili dokazati tudi tako, da smo kompleks MD-2/spojina denaturirali, z organskim topilom odstranili nekovalentno vezano spojino, ter z merjenjem fluorescence detektirali kovalentno vezano spojino. Poskusi so pokazali, da se kurkumin ne veže kovalentno, kovalentno pa sta se vezala N-piren maleimid ter IAANS. Kontrolno vezave smo izvedli tudi z MD-2, ki je imel modificirano prosto –SH skupino v hidrofobnem žepu (mutanta Cys133Phe ali z jodacetamidom zaščitena –SH skupina). Pokazali smo, da je ob odsotnosti

proste –SH skupine v hidrofobnem žepu vezava spojine na MD-2 precej manjša (pokazali za auranofin, IAANS, N-piren maleimid).

5. Testiranje inhibicije signalizacije z LPS na celičnih linijah in identifikacija tarče inhibitorjev

Inhibicijo signalizacije preko kompleksa TLR4/MD-2 smo spremljali na HEK293 celicah, ki smo jih (i) predhodno transfecirali v vektorji za izražanje TLR4, MD-2 in z reporterskima plazmidoma za merjenje z luciferaznim testom. Celice smo inkubirali z različnimi koncentracijami testne spojine, nato pa jih aktivirali z LPS. V drugi varianti poskusa (ii) pa smo celice transfecirali le z vektorjem za izražanje TLR4 in z reporterskima plazmidoma. Rekombinantno pridobljeni MD-2 smo predhodno inkubirali s testno spojino, mešanico nato dodali celicam, ter po dodatku LPS merili inhibicijo signalizacije. Rezultati so pokazali zelo uspešno koncentracijsko odvisno inhibicijo LPS-odvisne signalizacije za auranofin in JTT-705, nekoliko manj za kurkumin, akrolein, taxol in taxoter. Pokazali smo tudi, da je inhibicija precej manj uspešna, če uporabimo mutanto Cys133Phe, kar potrjuje pomembnost proste –SH skupine cisteina. Sklepamo, da je tarča inhibicije protein MD-2.

Izmerili smo tudi odgovor makrofagov RAW264.7 na LPS in inhibicijo odgovora z najbolj obetavnimi spojinami auranofinom, JTT-705, N-piren maleimidom ter IAANS. Vse štiri spojine so inhibirale LPS-inducirano produkcijo NO v koncentracijski odvisnosti, konstante so bile v mikromolarnem območju.

6. Poskusi na miših

V sodelovanju s špansko raziskovalno skupino (Guillermo Martinez de Tejada, Oddelek za mikrobiologijo in parazitologijo, Univerza v Navarri, Pamplona, Španija) smo obetavno spojino JTT-705 testirali tudi na miših. Miši so bile predhodno hranjene s testno spojino, nato so jim injicirali LPS ter po 1h merili koncentracijo citokina $TNF\alpha$, katerega velike vrednosti so pokazatelj vnetnega odgovora. Miši, predhodno tretirane z JTT-705 niso pokazale porasta nivoja citokina $TNF\alpha$, v nasprotju z mišmi, ki niso bile predhodno tretirane z JTT-705. Tudi kontrolne miši, ki so namesto testne spojine prejemale polimiksin B (poznana spojina, ki uspešno veže LPS in prepreči signalizacijo), niso pokazale povišanega nivoja citokina. Sklepamo, da je prisotnost JTT-705 v organizmu preprečila vnetni odgovor.

Ključne ugotovitve

- na podlagi naše hipoteze smo izbrali širok nabor testnih spojin (35), naravnega in sintetičnega izvora, ki imajo visoko afiniteto za vezavo v hidrofobni žep proteina MD-2 in večina jih poseduje tudi tiol-reaktivno skupino
- spojine, ki so se vezale na MD-2, so se vezale v hidrofobni žep proteina in zasedle LPS-vezavno mesto
- dokazali smo kovalentno vezavo na MD-2 za spojinami N-piren maleimid in IAANS
- z uporabo mutante Cys133Phe, ki nima prostega cisteina, in z uporabo MD-2, ki ima prosto –SH skupino zaščiteno, smo pokazali na pomembnost proste –SH skupine Cys133 za uspešno inhibicijo LPS-inducirane signalne poti
- na celičnih linijah smo pokazali, da je MD-2 tarča vezave testnih spojin, ki so delovale kot antagonisti LPS

- za najbolj obetavni spojini za nadaljnje raziskave sta se pokazali auranofin in JTT-705
- poskusi na živalskem sistemu so pokazali, da prisotnost JTT-705 inhibira produkcijo citokina TNF α
- MD-2 predstavlja zelo primerno tarčo za farmakološko inhibicijo signalizacije preko receptorskega kompleksa TLR4/MD-2
- dokazali smo mehanizem za nov tip inhibicije signalne poti preko receptorskega kompleksa, ki temelji na vezavi v hidrofobni žep MD-2

Znanstvena spoznanja

V publikacijah v uglednih znanstvenih revijah smo identificirali naravne in sintetične spojine, ki se vežejo na MD-2 in delujejo kot antagonisti LPS, kar je zelo pomembno za terapijo v zgodnjih fazah bakterijske infekcije in za preprečevanja razvoja sepse, kakor tudi za zdravljenje nekaterih kroničnih bolezni. MD-2 predstavlja odlično tarčo za farmakološko inhibicijo signalizacije preko receptorskega kompleksa TLR4/MD-2. Pravilno smo predvidevali, da prosti cisteinski preostanek v hidrofobnem žepu MD-2 predstavlja možnost za načrtovanje ireverzibilnih inhibitorjev novega tipa, ki so kombinacija skupine, ki usmeri vezavo spojine v hidrofobni žep, in skupine, ki reagira s prosto –SH skupino Cys133. Poleg nekaterih modelnih sintetičnih spojin smo odkrili, da se nekatera zdravila, uporabljena za druge namene, vežejo na MD-2 in inhibirajo vezavo LPS in s tem aktivacijo celic. Primera takšnih spojin sta auranofin in JTT-705, ki se sicer uporabljata kot protivnetno zdravilo za zdravljenje artritisa oz kot antihiperholesterolemik.

Rezultati in učinki raziskovalnega projekta

Rezultati raziskovalnega projekta so že objavljeni v treh uglednih znanstvenih revijah, četrti članek je v pripravi. Če bodo nadaljnje raziskave z izbranimi spojinama obetavne, bomo pripravili patent.

4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev³

Ključni protein na začetku signalne poti pri imunskem odzivu okuženega organizma je protein MD-2. Predpostavili smo, da MD-2 predstavlja odlično tarčo za farmakološko inhibicijo prekomernega vnetnega odgovora, ki lahko vodi do sepse. V projektu smo **načrtovali identifikacijo in vrednotenje spojin, ki se vežejo na MD-2**, in z antagonističnim delovanjem preprečijo nadaljnjo signalizacijo v imunskih celicah. MD-2 s tega stališča doslej skoraj ni bil proučevan.

Naša hipoteza je predvidevala, da bodo spojine, ki se bodo vezale v hidrofobni žep proteina MD-2, preprečile vezavo bakterijskega endotoksina (LPS) v žep in s tem preprečile nadaljnjo signalizacijo v imunskih celicah. Na podlagi strukturne analize našega modela strukture MD-2 smo sklepali na tipe spojin, ki bi se z veliko verjetnostjo vezale v hidrofobni žep. Predpostavili smo tudi možnost kovalentne vezave spojin na prosto –SH skupino cisteina v hidrofobnem žepu MD-2. Kandidate za testiranje smo izbrali med spojinami, katerih imunosupresivno delovanje je opisano v znanstveni literaturi. Testirali smo 35

naravnih in sintetičnih spojin. Med njimi so fitospojine, spojine, ki se že uporabljajo v medicini za zdravljenje drugih indikacij, in spojine s tiol-reaktivnimi skupinami. Izmed izbranih kandidatov smo z različnimi *in vitro* metodami identificirali spojine, ki se vežejo v hidrofobni žep MD-2 in tako preprečijo vezavo LPS v žep. Pokazali smo pomembnost –SH skupine prostega cisteina v hidrofobnem žepu in dokazali kovalentno vezavo dveh spojin. Na humanih celičnih linijah smo pokazali, da vezava spojin v hidrofobni žep MD-2 povzroči inhibicijo LPS-inducirane signalne poti. V sodelovanju s španskimi kolegi smo na miših pokazali, da eden izmed obetavnih inhibitorjev v celoti zavre LPS-odvisno signalizacijo.

Ocenjujemo, da smo testirali in ovrednotili široko množico spojin, izmed katerih smo identificirali štiri inhibitorje aktivacije LPS-odvisne signalne poti, ki so obetavni za nadaljnje raziskave. Pokazali smo, da protein MD-2 res predstavlja primerno tarčo za razvoj potencialnih zdravil proti sepsi oz. proti raznim kroničnim boleznim, pri katerih tudi sodeluje receptorski kompleks TLR4/MD-2. Dokazali smo mehanizem za nov tip inhibicije signalne poti preko TLR4/MD-2 na osnovi kovalentne vezave spojin v hidrofobni žep proteina MD-2. Svoja znanstvena dognanja smo objavili v treh člankih, pripravljamo četrtega. Menimo, da so **cilji projekta v celoti realizirani**.

5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta⁴

V izvajanju programa raziskovalnega projekta ni prišlo do sprememb.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni rezultat			
1.	Naslov	<i>SLO</i>	MD-2 kot tarča za kurkumin pri inhibiciji odgovora na LPS
		<i>ANG</i>	MD-2 as the target of curcumin in the inhibition of response to LPS
	Opis	<i>SLO</i>	Protein MD-2 predstavlja odlično tarčo za farmakološko inhibicijo LPS-induciranega prekomernega vnetnega odgovora. S tega stališča proteina MD-2 še niso proučevali. Pokazali smo, da se kurkumin veže na protein v hidrofobni žep, kjer je vezavno mesto za LPS (endotoksin). Vezava kurkumina prepreči vezavo LPS na MD-2, s čimer je inhibirana signalna pot vnetnega odgovora organizma na bakterijsko okužbo. Hkrati smo določili MD-2 kot eno izmed tarč, ki so odgovorne za že poznano protivnetno delovanje kurkumina, glavne komponente začimbe kurkuma, ki se uporablja v tradicionalni medicini in prehrani.
		<i>ANG</i>	MD-2 protein represents an excellent target for pharmacological inhibition of LPS-induced excessive immune response. From this point of view the protein MD-2 has not been studied yet. We demonstrated that curcumin binds into the hydrophobic pocket of MD-2. Binding of curcumin prevents the binding of LPS to MD-2, therefore, a signaling pathway of inflammatory response is inhibited. We also defined MD-2 as the target responsible for the already-known anti-inflammatory effect of curcumin, the main component of curcuma spices that are used in traditional medicine and nutrition.
	Objavljeno v		GRADIŠAR, Helena, MANČEK KEBER, Mateja, PRISTOVŠEK, Primož, JERALA, Roman. MD-2 as the target of curcumin in the inhibition of response to LPS. J. leukoc. biol., 2007, vol. 82, no. 4, str. 968-974. JCR IF (2006) 4,572
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		3732762
2.	Naslov	<i>SLO</i>	Taksani z vezavo na MD-2 inhibirajo signaliziranje preko humanega TLR4
		<i>ANG</i>	Taxanes inhibit human TLR4 signaling by binding to MD-2

	Opis	SLO	Taksani, predvsem paclitaxel (taxol) in docetaxel (taxotere) so zanimivi za študij signalizacije pri imunskem odzivu organizma na bakterijsko okužbo. Poznano je, da paclitaxel, ki se sicer uporablja pri kemoterapevtskem zdravljenju, signalizira le preko mišjega receptorskega kompleksa MD-2/TLR4, preko človeškega pa ne. Pokazali smo, da se paclitaxel in docetaxel vežeta v hidrofobni žep človeškega MD-2, kjer je vezavno mesto za bakterijski endotoksin (LPS). Vezava taksana na MD-2 je inhibirala aktivacijo človeških celic z LPS.
		ANG	Taxanes, particularly paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere) are interesting to study signaling in the immune response of the organism to bacterial infection. It is known that paclitaxel, which is used in chemotherapy treatment, activates cells only through mouse receptor complex MD-2/TLR4 but not through human complex. We showed that the paclitaxel and docetaxel bind into the hydrophobic pocket of MD-2, where is the binding site of bacterial endotoxin LPS. Binding of taxanes to MD-2 inhibited the activation of human cells with LPS.
	Objavljeno v		RESMAN, Nuša, GRADIŠAR, Helena, VAŠL, Jožica, MANČEK KEBER, Mateja, PRISTOVŠEK, Primož, JERALA, Roman. Taxanes inhibit human TLR4 signaling by binding to MD-2. FEBS lett.. [Print ed.], 2008, vol. 582, no. 28, str. 3929-3934. JCR IF (2007) 3,263
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		4065818
3.	Naslov	SLO	Prosta tiolna skupina proteina MD-2 predstavlja tarčo za inhibicijo z LPS spodbujene celične aktivacije
		ANG	Free thiol group of MD-2 as target for inhibition of the LPS-induced cell activation
	Opis	SLO	Protein MD-2 predstavlja odlično tarčo za farmakološko inhibicijo LPS-induciranega prekomernega vnetnega odgovora. MD-2 ima hidrofobni žep, v katerem je cistein s prosto -SH skupino. Testirali smo spojine z afiniteto do hidrofobnega žepa in s tiol-reaktivno skupino, ki bi lahko s kovalentno vezavo na -SH skupino ireverzibilno inhibirale LPS-odvisno signalno pot. Dokazali smo kovalentno vezavo za fluorescentno spojino N-piren maleimid. Učinkovini JTT-705 in auranofin, ki se že uporabljata v medicini pri drugih indikacijah, sta se vezali na MD-2 in učinkovito inhibirali LPS signalno pot.
		ANG	The hydrophobic pocket of MD-2 with internal free cysteine represents an excellent target for pharmacological inhibition of LPS-induced excessive inflammatory response. We tested compounds with high affinity to the hydrophobic pocket and with thiol-reactive group that could irreversibly inhibit LPS-dependent signaling pathway by binding to -SH group of free cysteine inside the pocket. We demonstrated a covalent binding of fluorescent compound N-pyrene maleimide. Drugs JTT-705 and auranofin which are already used in medicine for other indications efficiently inhibited LPS signaling pathway.
	Objavljeno v		Aprila 2009 je bil članek sprejet v ugledno revijo: MANČEK KEBER, Mateja, GRADIŠAR, Helena, JERALA, Roman. Free thiol group of MD-2 as target for inhibition of the LPS-induced cell activation. J Biol Chem, 2008, JCR IF (2007) 5,581
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		0000000
4.	Naslov	SLO	
		ANG	
	Opis	SLO	
		ANG	
	Objavljeno v		
	Tipologija		
	COBISS.SI-ID		
5.	Naslov	SLO	
		ANG	

Opis	SLO	
	ANG	
Objavljeno v		
Tipologija		
COBISS.SI-ID		

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine⁶

Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat		
1.	Naslov	SLO Interakcije med taksoidi in humanim MD-2
		ANG Interactions of taxoids with human MD-2
	Opis	SLO S postrom smo sodelovali na mednarodni konferenci s področja receptorjev, ki prepoznajo značilne vzorce patogenov, in sodelujejo pri razvoju bolezni. Predstavili smo rezultate proučevanja vezave paclitaxela in docetaxela v hidrofobni žep človeškega endotoksinskega receptorja MD-2. Z različnimi metodami smo pokazali, da se paclitaxel, antitumorni agens, in njegov analog docetaxel vežeta na MD-2 na isto mesto kot endotoksin LPS, ter s tem inhibirata aktivacijo pri HEK293 celicah.
		ANG We participated at an international conference of pattern-recognition receptors in human disease. We presented the results of study of paclitaxel and docetaxel binding into the hydrophobic pocket on human endotoxin receptor MD-2. We showed that paclitaxel, antitumor agent, and its analogue docetaxel bind to MD-2 and overlap with the binding site for bacterial endotoxin LPS, and thereby inhibit activation in HEK293 cells.
	Šifra	F.02 Pridobitev novih znanstvenih spoznanj
	Objavljeno v	GRADIŠAR, Helena, VAŠL, Jožica, JERALA, Roman. Interactions of taxoids with human MD-2 : [poster]. V: Biochemical Society focused meeting, Cambridge, UK, 8-10 August 2007. Pattern-recognition receptors in human disease : [programme & abstracts]. London: Biochemical Society, 2007, str. 8.
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
	COBISS.SI-ID	3765018
2.	Naslov	SLO Novi inhibitorji MD-2, receptorja bakterijskega endotoksina
		ANG New inhibitors of bacterial endotoxin receptor MD-2
	Opis	SLO S postrom smo sodelovali na mednarodni konferenci in prikazali rezultate študija novih inhibitorjev endotoksinskega receptorja MD-2. Potencialne inhibitorje smo izbirali med spojinami z veliko afiniteto do vezave v hidrofobni žep MD-2 in s tiol-reaktivno skupino, ki bi s kovalentno vezavo na SH- skupino prostega cisteina v žepu ireverzibilno inhibirale LPS-odvisno signalno pot.
		ANG We participated with poster at an international conference. We showed the results of the investigation for new endotoxin receptor MD-2 inhibitors. Potential inhibitors were selected among the compounds with a high affinity to the MD-2 hydrophobic binding pocket and with thiol-reactive group that would covalently bind to the -SH group of free cysteine inside the pocket and thus irreversibly inhibit LPS-dependent signaling pathway.
	Šifra	F.02 Pridobitev novih znanstvenih spoznanj
	Objavljeno v	GRADIŠAR, Helena, MANČEK KEBER, Mateja, KLEMENČIČ, Nina, JERALA, Roman. New inhibitors of bacterial endotoxin receptor MD-2. V: The 10th biennial meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (IEIIS), Edinburgh, Scotland, 30th July - 2nd August 2008. Abstracts and proceedings. [S.l.: s.n.], 2008, str. 27.
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
	COBISS.SI-ID	4037914
3.	Naslov	SLO
		ANG

	Opis	SLO	
		ANG	
	Šifra		
	Objavljeno v		
	Tipologija		
4.	COBISS.SI-ID		
	Naslov	SLO	
		ANG	
	Opis	SLO	
		ANG	
	Šifra		
	Objavljeno v		
	Tipologija		
	COBISS.SI-ID		
5.	Naslov	SLO	
		ANG	
	Opis	SLO	
		ANG	
	Šifra		
	Objavljeno v		
	Tipologija		
	COBISS.SI-ID		

8. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁷

8.1. Pomen za razvoj znanosti⁸

SLO

Znanstvena dognanja raziskovalnega projekta so pomembna za boljše razumevanje molekularnega mehanizma procesa vnetnega odgovora pri bakterijski infekciji, kjer sodeluje receptorski kompleks TLR4/MD-2. Raziskali smo malo poznano vlogo ligandov, ki se vežejo na MD-2 in inhibirajo signalno pot preko omenjenega kompleksa. Pokazali smo, da je protein MD-2 s svojim hidrofobnim žepom pogosto tarča za vezavo spojin, ki so v znanstveni literaturi opisane kot imunosupresivne. Z inovativnim pristopom pri selekciji potencialnih kandidatov smo identificirali nove inhibitorje, ki z vezavo v hidrofobni žep MD-2 zavrejo signalizacijo preko LPS-odvisne poti. Rezultate študija novega tipa inhibicije smo objavili v priznanih znanstvenih revijah. Spoznanja so medicinskega in biotehnološkega pomena, saj lahko identificirani inhibitorji, ki se kovalentno vežejo na LPS-vezavno mesto proteina MD-2, predstavljajo spojine vodnice za razvoj spojin, ki bi bile uporabne za zdravljenje sepse in kroničnih bolezni, kjer je udeležen receptorski kompleks TLR4/MD-2.

ANG

The results of the research project contribute to better understanding of inflammation disease molecular mechanisms where receptor complex TLR4/MD-2 is included. We established not well-investigated role of ligands which bind to MD-2 and inhibit the signaling pathway through the TLR4/MD-2 complex. We have shown that protein MD-2 with its hydrophobic pocket is a frequent target for the binding of compounds that are described as an immunosuppressive in the scientific publications. With an innovative approach in the selection of potential ligands, we identified new inhibitors which bind to the hydrophobic pocket of MD-2 and inhibit signaling through LPS-dependent pathway. The results of a new type inhibitor investigation were published in renowned scientific journals. The findings of the project are of medical and biotechnological importance. The identified inhibitors, which overlap with the LPS-binding site on protein MD-2, might represent leading compounds for drug development useful for sepsis treatment and cure of chronic diseases, where receptor complex TLR4 / MD-2 is involved.

8.2. Pomen za razvoj Slovenije⁹

SLO

Izrabljanje in bogatenje lastnega znanja je najboljši način trajnega razvoja ter zagotavlja visoko dodano vrednost in večjo konkurenčnost. Projekt je tudi medicinskega pomena, saj lahko vodi k izboljšanju zdravja in k zmanjšanju ekonomske in družbeno-socialne škode zaradi bolezni. Rezultati projekta so zanimivi za farmacevtsko industrijo. Raziskava je interdisciplinarna, temelji na odkrivanju osnovnih spoznanj s področja biotehnologije in medicine s potencialno možnostjo uporabe do aplikativnih raziskav z industrijsko uporabnostjo.

ANG

The use and enrichment of our own knowledge is the best way for sustainable development and ensures a high added value and a competitive position. The project is also of medical importance, as it may lead to the improvement of human health and reduction of economic and social damage due to the disease. The results of the project are also interesting for pharmaceutical industry. The research is interdisciplinary, based on the unraveling of basic knowledge from the biotechnological and medicine area, with a potential use for applicative researches within industry.

9. Samo za aplikativne projekte!

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

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanju naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

Komentar

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

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visoko-šolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☐	☐	☐	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☐	☐	☐	☐	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☐	☐	☐	☐	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☐	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	☐	☐	☐	☐	
G.02.07.	Večji delež izvoza	☐	☐	☐	☐	
G.02.08.	Povečanje dobička	☐	☐	☐	☐	
G.02.09.	Nova delovna mesta	☐	☐	☐	☐	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	☐	☐	☐	☐	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	☐	☐	☐	☐	
G.02.12.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	☐	☐	☐	☐	

Zaključno poročilo o rezultatih raziskovalnega projekta

G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	☐	☐	☐	☐	
G.03.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	☐	☐	☐	☐	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	☐	☐	☐	☐	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	☐	☐	☐	☐	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	☐	☐	☐	☐	
G.04.06.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete	☐	☐	☐	☐	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj	☐	☐	☐	☐	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	☐	☐	☐	☐	
G.09.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	

Komentar

--

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

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

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

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja, za objavo 6., 7. in 8. točke na spletni strani <http://sicris.izum.si/> ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki

Zaključno poročilo o rezultatih raziskovalnega projekta

Podpisi:

Helena Gradišar	in/ali	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseba RO

Kraj in datum:

Ljubljana

20.4.2009

Oznaka poročila: ARRS_ZV_RPROJ_ZP_2008/65

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

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

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

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

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

PRIMER (v slovenskem jeziku):

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

Tipologija: 1.01 - Izvirni znanstveni članek

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

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

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

⁷ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

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

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

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

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