

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2014/35



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J3-3624
Naslov projekta	Virulentni dejavniki kot potencialne tarče cepiv
Vodja projekta	7042 Darja Žgur-Bertok
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	8309
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	05.2010 - 04.2013
Nosilna raziskovalna organizacija	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	3 MEDICINA 3.01 Mikrobiologija in imunologija
Družbeno-ekonomski cilj	07. Zdravje
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	3 Medicinske vede 3.05 Druge medicinske vede

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

2. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Strmo narašča prevalenca bakterijskih sevov odpornih proti številnim klinično pomembnim antibiotikom kakor tudi pogostnost zapletenih infektivnih bolezni. Narašča število bolnikov, ki potrebujejo invazivne posege ter število oseb z oslabljenim imunskim sistemom tudi. Patogene seve bakterije *Escherichia coli* uvrščamo v svetovnem merilu med poglavitne povzročitelje bolehnosti in umrljivosti. Poleg tega najnovejše raziskave razkrivajo vpletenost patogenih sevov *E. coli* v

tumorigenezi. Novejši pristopi zaščite pred patogenimi bakterijami so usmerjeni proti njihovim virulentnim dejavnikom npr. toksinom, ki so odgovorni za patogeni učinek. V okviru raziskovalnega projekta smo preučili prevalenco genov za sintezo proteina Usp (uropatogeni specifični protein) in TpcC, (protein, ki veže TLR ang. Toll-like receptor, in omeji odziv prirojene imunosti), kakor tudi drugih dejavnikov virulence pri sevih *E. coli* treh zbirk: i) izoliranih iz bolnikov z bakteriemijo in sepso, ii) okužb urinarnega trakta in iii) komenzalnih sevov izoliranih iz zdravih oseb. Dokazali smo, da sta gena *usp* in *tcpC* statistično značilno bolj prevalentna pri patogenih sevih kot pri komenzalnih in, da sta povezana s filogenetsko skupino B2 ter z geni za virulentne dejavnike *cnf1*, *hlyA*, *papGIII* in *sfaDE*. Klonirali smo gene za Usp in tri proteine Imu1-3, v ekspresijski vektor, proteine izolirali in preverjali njihov učinek na celice linije HUVEC (angl. human umbilical vein endothelial cells). Dokazali smo, da Usp zmanjša viabilnost tretiranih celic, poveča respiracijo in s Kometnim testom, da inducira fragmentacijo genoma. Ker so poškodbe genoma ključne za tumorigenezo in glede na predlog projekta, smo se osredotočili na protein Usp. Dokazali smo, da izolirani protein cepi izolirano DNA in, da ima C terminalna domena Usp katalitično aktivnost. S poskusi okužb celic HUVEC in HEK293 (angl. human kidney embryonic cells) s sevom *E. coli* MG1655 *usp*^{+*imu1-3*⁺ in kontrolnim izogenim sevom MG1655 *usp*⁻*imu1-3*⁻, smo dokazali, da Usp izzove v humanih celicah prerazporeditve citoskeleta in apoptozo. V sodelovanju s prof. dr. Mojco Narat iz Odd. za Zootehniko, BF, UL smo pripravili monoklonska protitelesa proti proteinu Usp ter proteinom Imu1-3. Geni *imu1-3* so kodirani navzdol od gena *usp* in so del skupnega *usp imu* operona. Dokazali smo, da se protein Usp izloča iz bakterijskih celic, medtem ko se proteini Imu1-3 ne izločajo zato sklepamo, da je za patogeni učinek odgovoren le protein Usp. Dokazali smo, da je vloga proteinov Imu zaščita bakterijskega producenta pred nukleolitično aktivnostjo Usp. C terminalna domena proteina Usp v miškah izzove imunski odziv in bi bila primerna za pripravo cepiva.}

ANG

On a global scale we are witnessing a sharp rise in the prevalence of bacterial strains resistant to numerous clinically relevant antibiotics as well as a rise in complicated infectious diseases. In addition increasing is the number of patients requiring invasive procedures as well as immuno-compromised patients. Pathogenic *E. coli* strains are globally key agents of morbidity and mortality. Further, very recent publications have shown that pathogenic *E. coli* strains are involved in tumorigenesis. Novel approaches of protection against bacterial pathogens are aimed at their virulence factors such as toxins that are responsible for the pathogenic effect. Within the framework of the research project we investigated the prevalence of genes for the synthesis of protein Usp (uropathogenic specific protein) and TpcC (Toll/interleukin-1 receptor domain-containing protein), as well as

other virulence factors among *E. coli* strains of three strain collections: i) isolates from patients with bacteremia and sepsis, ii) urinary tract infections, iii) commensal strains isolated from healthy individuals. Our results showed that genes *usp* and *tcpC* are statistically significantly more prevalent among pathogenic strains than among commensal strains and that they are associated with the phylogenetic group B2 as well as with virulence factor genes *cnf1*, *hlyA*, *papGIII* and *sfaDE*. Usp is a key virulence factor of pathogenic *E. coli* isolated from patients with complicated urinary tract infections, bacteremia and sepsis. We cloned the genes for Usp and the three Imu1-3 proteins into an expression vector, isolated the proteins and investigated their effect on the cell line HUVEC (human umbilical vein endothelial cells). We showed that Usp reduces viability of the treated cells, increases respiration and using the Comet test that it induces fragmentation of the genome. Since genome damage is a key step in tumorigenesis we subsequently focused on the Usp protein. We showed that the protein degrades isolated DNA and that the C terminal domain exhibits catalytic activity. Infection assays of HUVEC in HEK293 (human kidney embryonic cells) with *E. coli* MG1655 *usp⁺imu1-3⁺* and the control isogenic strain MG1655 *usp⁻imu1-3⁻* showed that, Usp induces in human cells rearrangement of the cytoskeleton and apoptosis. In collaboration with Prof. Mojca Narat, Dept. of Animal Sciences, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, monoclonal antibodies against Usp and the three Imu1-3 proteins were prepared. Genes *imu1-3* located downstream of gene *usp*, are part of a common *usp imu* operon. We showed that Usp is secreted from bacterial cells while proteins Imu1-3 are not indicating that, only Usp is responsible for the pathogenic effect. We demonstrated that the role of the Imu proteins is to protect the producer against the DNase activity of Usp. The C terminal domain induces an immune response in mice and would be appropriate for vaccine development.

3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

Hipoteze predloga projekta so bile sledeče:
 Prevalenca proteinov Usp (uropatogeni specifični protein) in TcpC je pri patogenih sevih *E. coli* izoliranih iz najtežjih bolnikov statistično značilno večja kot pri komenzalnih. i. Preučiti prevalenco proteinov Usp in TcpC med komenzali in patogenimi sevi bakterije *E. coli*; preučiti prevalenco drugih virulentnih dejavnikov in uvrstiti seve v filogenetske skupine; ii. izolacija čistega proteina Usp; iii. preučiti aktivnost proteina Usp proti izbranim celičnim kulturam; iv. preučiti invazivnost bakterij *e. coli*, ki producirajo Usp; v. ugotoviti katera domena proteina Usp je odgovorna za patogeni učinek; vii. preverjanje indukcije imunskega odziva z osamljeno domeno Usp.

Raziskovalni projekt je potekal v sklopih navedenih v predlogu projekta:

I. Za pripravo alternativnih pristopov preprečevanja/zdravljanja bakterijskih okužb, vključno z učinkovitim cepivom je izrednega pomena pregled prevalence genov dejavnikov virulence med kliničnimi izolati patogenih sevov *E. coli*. V ta namen smo v prvem delu projekta podrobneje karakterizirali tri zbirke sevov *Escherichia coli*: 105 sevov izoliranih iz bolnikov z bakteriemijo in sepso, 212 sevov iz okužb urinarnega trakta in kože ter mehkih tkiv in 90 komenzalnih sevov. Vsi sevi so bili izolirani na Inštitutu za Mikrobiologijo in imunologijo, MF, v Ljubljani.

Seve smo z verižno reakcijo s polimerazo prvo uvrstili v eno od štirih filogenetskih skupin (A, B1, B2 in D) in nato preverili zapise za virulentne dejavnike: fimbrije P (gen *papC*), afimbrialne adhezine (*afa*), fimbrije tipa I (*fimH*), fimbrije S (*sfa/focDE*), *papGIII*; zapise za sintezo sideroforjev: aerobaktin (*iucD*), enterohelin (*iroCD* in *iroN*) in yersiniabaktin (*fyuA*); toksine: citotoksični nekrotizirajoči faktor 1 (*cnf1*), α -hemolizin (*hlyA*), uropatogeni specifični protein (Usp); odpornost proti serumu (*traT*), zapise za sintezo kapsul K1 in K5 ter *tcpC*, ki prepreči TLR (*angl.* Toll-like receptor) signaliziranje.

Dokazali smo, da sta gena *usp* in *tcpC* bolj prevalentna pri patogenih sevih kot pri komenzalnih in, da sta povezana s filogenetsko skupino B2 ter z geni za virulentne dejavnike *cnf1*, *hlyA*, *papGIII* in *sfaDE*. Poleg tega smo dokazali, da je protein Usp ključni virulentni dejavnik patogenih sevov *Escherichia coli* izoliranih iz bolnikov z zapletenimi okužbami sečil, bakteriemijo in sepso.

Primerjava lastnosti patogenih sevov *E. coli* z imunskim stanjem bolnikov je pokazala, da so bili pri imunsko neoslabljenih bolnikih pogosteje izolirani sevi, ki so imeli večji nabor dejavnikov virulence, kot sevi iz imunsko oslabljenih bolnikov (kronična bolezen, imunosupresijsko zdravljenje, operativni poseg, diagnostični invazivni poseg ter urinarni kateter oz. nefrostoma). Sevi, ki so povzročali okužbe pri imunsko neoslabljenih bolnikih, so imeli tudi bistveno večjo pogostnost posameznih dejavnikov virulence, kot so *usp*, *sfa/foc* in *papC* kar je potrdilo njihovo vlogo v patogenezi.

Gen *usp* z zapisom za sintezo proteina Usp je v 4,2 kilobaznih parov (kbp) dolgem otoku patogenosti. Navzdol od gena *usp* so še trije odprti bralni okvirji (*imu1-3*).

II. Po predlaganem poteku raziskav smo se v nadaljevanju osredotočili na izolacijo proteina Usp ter treh manjših proteinov Imu1-3 kodiranih navzdol od gena *usp*. V ta namen smo gene preučevanih proteinov klonirali v plazmidni vektor pT77.

Izražanje genov za sintezo proteina Usp in proteinov Imu1-3 je potekalo v sevu BL21 (DE3). Proteine smo izolirali z afinitetno kromatografijo na izmenjevalcu NiNTA agaroz (Qiagen). Za dodatno čiščenje proteina Usp smo uporabili gelsko izključitveno kromatografijo. Kolono SuperdexT M 200 10/300 GL (GE Healthcare) smo na sistemu tekočinske kromatografije za hitro ločevanje proteinov

(FPLC) uravnatežili s 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 150 M NaCl in 1 mM DTT. Hitrost pretoka je bila 0,5 ml/min. Ustrezne frakcije smo dializirali proti 1xPBS (10 mM fosfatni pufer, 137 mM NaCl, pH 7,4). Čistost proteina smo preverjali z 10 % SDS PAGE, koncentracijo proteina smo določali z BCA Protein assay (Pierce). Zaradi nestabilnosti proteina Usp je bila optimizacija njegove izolacije dolgotrajna in težavna. V ekspresijskem sistemu *E. coli* BL21(DE3)/pLysE pET8c smo izrazili in z Ni-NTA afinitetno kromatografijo očistili tudi proteine Imu1, Imu2 in Imu3.

Ker je analiza nukleotidnega zaporedja gena *usp* razkrila homologijo C terminalnega konca z nukleazno domeno kolicina ColE7 bakterije *Escherichia coli* smo v nadaljevanju opravili Kometni test, ki detektira prelome kromosomov. Test smo opravili z izoliranimi proteini Usp, Imu1-3 na evkariontskih celicah HUVEC. Testirali smo učinek posamičnih izoliranih proteinov ter kombinacije Usp s po enim od treh proteinov Imu ter Usp z vsemi tremi proteini Imu. Dokazali smo, da genotoksično deluje le Usp in kombinacija proteinov Usp in Imu3. Ti rezultati so nakazali, da proteina Imu1 in Imu2 delujeta zaščitno, saj zaradi DNazne aktivnosti proteina Usp bi le-ta lahko razgradil genom producenta. DNazno aktivnost čistega proteina Usp smo potrdili tudi s cepitvijo izolirane DNA plazmida pUC19 in agarozno gelsko elektroforezo.

III. Z namenom potrditve, da je C terminalna domena Usp, odgovorna za patogeni učinek smo nukleotidno zaporedje le-te namnožili s PCR in ustreznimi oligonukleotidnimi začetniki ter jo klonirali v ekspresijski vektor pT7-T in izolirali kot je opisano zgoraj. Potrdili smo DNazno aktivnost domene na izolirani DNA.

Najnovejši izsledki objavljeni v času trajanja projekta kažejo, da bakterijske okužbe lahko izzovejo rakasta obolenja zaradi vnetnega odziva na okužbo in/ali zaradi produkcije genotoksinov. Zaradi zgoraj opisane dokazane genotoksične aktivnosti smo raziskave osredotočili na protein Usp.

IV. Z namenom slediti patogenezi sevov bakterije *E. coli*, ki producirajo Usp smo v sodelovanju z Odd. za Zootehniko, Biotehniške fakultete, UL, HUVEC okužili s sevom bakterije *E. coli* MG1655 s kloniranimi geni *usp*⁺ *imu1-3*⁺ in kontrolnim sevom MG1655 *usp*⁻ *imu1-3*⁻. Predhodno smo v vektorju pRW50 pripravili fuziji promotorske regije gena *usp* dveh dolžin 406 in 603 bp in gena *lacZ* brez lastnega promotorja ter preverili aktivnost na podlagi aktivnosti encima β -galaktozidaze. Naši rezultati so pokazali večjo aktivnost genske fuzije z daljšo (603 bp) promotorsko regijo gena *usp* in večjo aktivnost ob prehodu med logaritemsko in stacionarno fazo rasti. Posledično smo HUVEC okužili z bakterijami pri OD₆₀₀ med 0,9 in 1, saj je bila aktivnost promotorja takrat najvišja in multipliciteto infekcije

1:10. Po okužbi smo HUVEC gojili 4 ure pri 37°C in 5% CO₂, bakterije odstranili z dodatkom antibiotika (gentamicin, kloramfenicol ali kanamicin) ter gojili HUVEC še nadaljnjih 20 ur. Štiriindvajset ur po okužbi z MG1655 *usp*⁺ *imu1-3*⁺, smo ugotavljali: i) citotoksičnost bakterij s testom XTT; ii) viabilnost celic HUVEC s pomočjo barvila Trypan blue in iii) aktivnost kaspaze 3 (aktivacija apoptoze) v celicah HUVEC.

Naši rezultati so pokazali, da okužba evkariontskih celic z bakterijo *E. coli*, ki proizvaja Usp vpliva na viabilnost celic HUVEC, saj je bila viabilnost le med 60 % in 80 % ($p < 0,02$). Dokazali smo tudi višjo respiratorno aktivnost HUVEC (od 10 – 35% višja respiracija) okuženih z MG1655 *usp*⁺ *imu1-3*⁺. Sklepamo, da se v celicah HUVEC po infekciji respiratorna aktivnost poveča zaradi obrambe pred toksično komponento. Z namenom ugotoviti ali lahko Usp aktivira apoptozo celic HUVEC smo določali aktivnost kaspaze 3 s pomočjo kompleta reagentov, Apo-ONE[®] Homogenous Caspase-3/7 Assay (Promega). Dokazali smo 3 kratno povečanje aktivnosti kaspaze 3 v primerjavi s kontrolnim sevom MG1655 *usp*⁻ *imu1-3*⁻. Kaspaze so cisteinske proteaze s ključnimi vlogami v nekrozi, vnetju in apoptozi, programirani celični smrti. Kaspaza 3 cepi specifične proteinske substrate, vključno s pro-kaspazami in posledično amplificira apoptotični signal. Naši izsledki so pokazali, da sevi *E. coli*, ki producirajo Usp in z Usp povezane proteine Imu1-3, inducirajo apoptozo v celicah sesalcev.

Ker so sevi *E. coli* z zapisom za protein Usp povezani tudi z okužbami urinarnega trakta s težjim potekom bolezni, smo raziskavo razširili na celice HEK293 (angl. human kidney embryonic cells) in tudi za te dokazali indukcijo apoptoze po okužbi z *E. coli* MG1655 *usp*⁺ *imu1-3*⁺. S testiranjem viabilnosti smo pokazali, da vse celice obeh celičnih linij (HUVEC in HEK293) propadejo 48 ur po okužbi s sevom MG1655 *usp*⁺ *imu1-3*⁺ (pri 37°C, 5% CO₂).

Z namenom razjasniti ali sevi, ki producirajo Usp in Imu1-3 izzovejo prerazporeditve citoskeleta evkariontskih celic, smo HUVEC okužene za 4 ure s MG1655 *usp*⁺ *imu1-3*⁺, fiksirali 15 min pri sobni temperaturi v PBS/4% paraformaldehidu ter jih permeabilizirali z 10 minutnem izpostavljanjem 0.1% Triton X-100 v PBS/4% paraformaldehidu. Sledilo je barvanje s Phalloidin-FITC (50 µg/ml) preko noči, večkratno spiranje, barvanje jeder z DAPI in analiza celic s fluorescentno mikroskopijo (Nikon TE-2000V). Aktinski filamentni so se obarvali zeleno, jedra modro. Naši izsledki so pokazali, da okužba s sevom MG1655 *usp*⁺ *imu1-3*⁺, izzove izrazite prerazporeditve citoskeleta celic HUVEC.

S proti-Usp protitelesi in poskusom Western blot smo dokazali, da je protein Usp v supernatantu bakterijske kulture seva MG1655 *usp*⁺ *imu1-3*⁺ in sklepamo, da je izločen iz bakterijskih celic.

V. Z namenom nadaljnje razjasnitve delovanja Usp in proteinov Imu smo v sodelovanju s prof. Mojco Narat, Oddelek za Zootehniko, Biotehniške fakultete, UL pripravili monoklonska protitelesa proti Usp in proteinom Imu1, Imu2, Imu3 in eno poliklonsko protitelo, ki prepozna vse tri proteine imunosti (Imu1, Imu2 in Imu3).

Za proizvodnjo protiteles smo v prvem koraku z željenim proteinom imunizirali miške. Po skoraj 90 dneh smo s pomočjo tehnike *dot immuno-binding assay* DIBA preverili imunski odziv mišk. Sledilo je žrtvovanje mišk ter izolacija in gojenje njihovih hibridomov ter s tehniko ELISA preverjanje ali gojeni hibridomi proizvajajo želeno monoklonsko protitelo. Sledilo je kloniranje izbranih hibridomov, gojenje celic in s tehniko ELISA določanje katere proizvajajo specifično protitelo v visokih količinah. Iz supernatantov izbranih celic smo oborili protitelo z amon sulfatom. Protitelesa smo koncentrirali z ultrafiltracijo (filtri velikost por 30 kD, Amicon UltraCentrifugal Filters). Pridobili smo protitelesa za proteine Usp, Imu2, Imu3 in protitelo, ki nalega na vse tri proteine imunosti (Imu1, Imu2 in Imu3). Proces proizvodnje monoklonskih protiteles je bil dolgotrajen in zapleten saj se nam je pogosto zgodilo, da so celice v zadnji fazi tik pred izolacijo protitelesa izgubile zmožnost produkcije protiteles. V tem primeru smo celoten postopek ponovili kot je opisano zgoraj (hibridome hranimo zamrznjene na -196 °C).

Pripravljena protitelesa smo uporabili pri nadaljnjih raziskavah z metodo Western Blot, s katero nismo zaznali proteinov imunosti v supernatantu bakterijskih celic, kar nakazuje, da se proteini imunosti ne izločajo iz bakterijskih celic in, da z Usp ne vstopajo v evkariontske celice. Pridobljena protitelesa so primerna za nadaljnje analize, tudi mikroskopijo, še zlasti konfokalno mikroskopijo, s pomočjo katere lahko natančno sledimo proteinu Usp v evkariontski celici in poteku njegovega prenosa v jedro.

VI. Za pripravo učinkovitega cepiva je ključna sposobnost indukcije imunskega odziva z osamljeno nukleazno domeno Usp proteina/virulentnega dejavnika. V ta namen smo v sodelovanju s prof. dr. Mojco Narat, Odd. za Zootehniko, Biotehniške fakultete, UL, z nukleazno domeno raztopljeno v PBS z 10% glicerolom in dodatkom aluminijevega hidroksida kot adjuvansa, imunizirali miške. Po treh tednih in nato po 90 dneh smo s pomočjo tehnike ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) preverili in potrdili nastanek IgG protiteles proti Usp v serumu mišk.

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

Raziskovalno delo na projektu je potekalo v predvidenem redosledju. Podrobneje smo karakterizirali seve bakterije *E. coli* treh zbirk: i) sevi iz bolnikov z bakteriemijo in sepsa, Inštitut za Mikrobiologijo in imunologijo, MF, v Ljubljani ii) iz bolnikov z okužbami urnarnega

trakta, Inštitut za Mikrobiologijo in imunologijo, MF, v Ljubljani, iii) komenzalni sevov iz zdravih oseb, Slovenija. Seve smo preiskali za filogenetske skupine in genetske zapise za virulentne dejavnike. Potrdili smo hipotezo, da sta gena *usp* in *tcpC* statistično značilno bolj prevalentna pri patogenih sevih kot pri komenzalnih in, da sta povezana s filogenetsko skupino B2 ter z geni za virulentne dejavnike *cnf1*, *hlyA*, *papGIII* in *sfaDE*.

Izolirali smo očiščen protein Usp in tri manjše proteine kodirane v neposredni bližina gena *usp*. Dokazali smo, da protein Usp zmanjša viabilnost celic humanih celičnih linij (HUVEC), poveča respiracijo v humanih celicah in deluje genotoksično. Vzpostavili smo model okužbe humanih celic HUVEC in HEK236 s sevom *E. coli usp⁺imu1-3⁺* ter kontrolnim sevom *E. coli usp⁻imu1-3⁻*. Dokazali smo, da sev, ki producira Usp izzove prerazporeditve citoskeleta in apoptozo. Z omenjenim raziskovalnim delom smo potrdili hipotezo, da je Usp virulentni dejavnik, ki uniči celice evkariontskega gostitelja (človeka) in ne, kot je predhodno veljajo, le bakteriocin pomemben za medbakterijsko tekmovanje.

S poskusi Western blot smo potrdili hipotezo, da je Usp izločen iz bakterijskih celic in, da deluje sam, medtem ko proteini Imu1-3 ščitijo producenta pred delovanjem toksina Usp. Miške smo imunizirali z nukleazno domeno proteina Usp raztopljeno v PBS z 10% glicerolom in dodatkom aluminijevega hidroksida kot adjuvansa. Nastanek IgG protiteles smo potrdili s pomočjo tehnike ELISA. Potrdili smo hipotezo, da nukleazna domena Usp inducira imunski odziv kar je ključno za pripravo učinkovitega cepiva.

Zaradi genotoksične aktivnosti bi Usp lahko bil vpleten nastanku rakastih obolenj.

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

Sprememb v programa raziskovalnega projekta ni bilo.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	2871119	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Uropatogeni specifični protein Usp je bakteriocinu podoben genotoxin
		<i>ANG</i>	The Escherichia coli uropathogenic specific protein Usp, is a bacteriocin-like genotoxin
	Opis	<i>SLO</i>	Protein Usp, je virulentni dejavnik, ki inducira poškodbe genoma, prerazporeditve citoskeleta in apoptozo celic humanih celičnih linij. Usp je izločen iz bakterijskih celic. Zaradi genotoksične aktivnosti bi Usp lahko bil vpleten tudi pri kroničnih vnetnih boleznih prebavnega trakta in nastanku rakastih bolezni.
<i>ANG</i>		Protein Usp is a virulence factor that induces genome damage/fragmentation, rearrangement of the cytoskeleton as well as apoptostit of cells of human cell lines. Due to its genotoxic activity, usp could involved in chronic inflammatory disease of the gastrointestinal tract	

		and in cancer.
	Objavljeno v	University of Chicago Press; The Journal of infectious diseases; 2013; Vol. 208, iss. 10; str. 1545-1552; Impact Factor: 5.848; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.017; A': 1; WoS: NI, NN, QU; Avtorji / Authors: Nipič Damijan, Podlesek Zdravko, Budič Maruška, Črnigoj Miha, Žgur-Bertok Darja
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	3037263 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Protein Imu3 sevov bakterije Escherichia coli, ki producirajo Usp izkazuje sposobnost vezave nukleinskih kislin. <i>ANG</i> The Escherichia coli uropathogenic-specific-protein-associated immunity protein 3 (Imu3) has nucleic acid-binding activity
	Opis	<i>SLO</i> Proteini Imu1-3 bakterije E. coli, ki producirajo Usp ščitijo producenta pred nukleazno aktivnostjo slednjega. Za optimalno zaščito so potrebni vsi trije proteini Imu, vendar nobeden ne tvori kompleksa s proteinom Usp. Imu3 ščiti genom producenta z nespecifično vezavo na DNA. <i>ANG</i> The Imu1-3 proteins of E. coli strains that produce Usp protect the producer against the latter's nuclease activity. Optimal protection is provided when all three Imu proteins are present however, none forms a tight complex with the Usp protein. Imu3 protects the producer via nonspecific binding to DNA.
	Objavljeno v	BioMed Central; BMC microbiology; 2014; Vol. 14, no. 16; str. 1-20; Impact Factor: 3.104; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.384; WoS: QU; Avtorji / Authors: Črnigoj Miha, Podlesek Zdravko, Budič Maruška, Žgur-Bertok Darja
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
3.	COBISS ID	2968911 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Popravljanje poškodb DNA in bakterijski patogeni <i>ANG</i> DNA damage repair and bacterial pathogens
	Opis	<i>SLO</i> Vsi organizmi imajo mehanizme za popravljanje poškodovane DNA. Eden najpomembnejših mehanizmov bakterij je odziv SOS. Kljub temu, da odziv SOS popravlja poškodbe, v kolikor so te obsežne odziv sproži mutagenozo, ki pospeši porajanje in širjenje odpornosti proti antibiotikom in virulentnih dejavnikov. Na drugi strani bakterije z indukcijo vnetnih odziv in produkcijo genotoksinov kot je Usp tudi poškodujejo genom človeka in živali kar lahko privede do rakastih obolenj. <i>ANG</i> All organisms have mechanisms that repair damaged DNA. One of the most significant bacterial mechanisms is the SOS response. Even though the SOS response is involved in DNA damage repair when damage is extensive the response induces mutagenesis to accelerate evolution and dissemination of antibiotic resistances and virulence factors. On the other hand, bacteria by inducing an inflammatory response and production of genotoxins such as Usp, also inflict genome damage in humans and animals that promote cancer.
	Objavljeno v	Public Library of Science; PLOS pathogens; 2013; Vol. 9, iss. 11; str. e1003711-1-e1003711-4; Impact Factor: 8.136; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.423; A'': 1; A': 1; Avtorji / Authors: Žgur-Bertok Darja
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
4.	COBISS ID	2164303 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Prevalenca in povezave tcpC, z zapisom za protein z domeno vezave Toll/Interlevkina-1 med sevi Escherichia coli izoiranih iz okužb urinarnega

		trakta, okužb kože in mehkih tkiv ter komenzalnimi izolati.
	ANG	Prevalence and associations of tcpC, a gene encoding a Toll/Interleukin-1 receptor domain-containing protein, among Escherichia coli urinary tract infection, skin and soft tissue infection, and commensal isolates.
Opis	SLO	TcpC, novo odkriti protein z domeno vezave Toll/Interleukina-1 uropatogenih sevov Escherichia coli je vpleten pri supresiji naravne imunosti. Prevalenca tcpC in njegova povezanost z dejavniki virulence ter filogenetskimi skupinami je bila preučena med 212 sevov E. coli iz okužb urinarnega trakta (UTI) ter okužb kože ter mehkih tkiv (SSTI) kakor tudi med 90. komenzalnimi sevi. Prevalenca tcpC je bila pri sevih UTI 21% pri sevih SSTI 25%, medtem ko je bila pri komenzalnih sevih 8%. Statistično značilne asociacije so bile ugotovljene med tcpC ter cnf, hlyA in usp.
	ANG	TcpC, a new Toll/interleukin-1 receptor domain-containing protein of uropathogenic Escherichia coli is involved in the suppression of innate immunity. The prevalence of tcpC and its association with virulence factors and phylogenetic groups was investigated among strains from a collection of 212 E. coli isolates from urinary tract and skin and soft tissue infections and 90 commensal E. coli strains. Prevalence of tcpC sequences among UTI and SSTI isoaltes was 21 and 25%, respectively, while among SSTI it was 8%. Statistically significant associations were found between the presence of tcpC and cnf1, hlyA and usp.
Objavljeno v		American Society for Microbiology.; Journal of clinical microbiology; 2010; Vol. 48, no. 3; str. 966-968; Impact Factor: 4.220;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.177; A': 1; WoS: QU; Avtorji / Authors: Starčič Erjavec Marjanca, Jesenko Blaž, Petkovšek Živa, Žgur-Bertok Darja
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
5.	COBISS ID	2368847 Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Interkonverzija med vezano in prosto konformacijo proteina LexA uravnava SOS odziv bakterij
	ANG	Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response
Opis	SLO	Fleksibilnost konformacije nevezanega proteina LexA je ključni element vzpostavitve usklajenega odziva SOS. medtem ko LexA izkazuje različne hitrosti disociacije iz operatorjev genov, interagira izredno hitro z DNA tarčnih zaporedij. Modifikacije aktivnosti LexA vpliva na pojav perzisterjev, ki tolerirajo antibiotike v populacijah bakterij.
	ANG	The conformational flexibility of unbound LexA is the key element in establishing a co-ordinated SOS response. While LexA exhibits diverse dissociation rates from operators, it interacts extremely rapidly with DNA target sites. Modulation of LexA activity changes the occurrence of persister cells that tolerate antibiotics in bacterial populations.
Objavljeno v		Oxford University Press; Nucleic acids research; 2011; Vol. 39, issue 15; str. 6546-6557; Impact Factor: 8.026;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.739; A': 1; WoS: CQ; Avtorji / Authors: Butala Matej, Klose Daniel, Hodnik Vesna, Rems Ana, Podlesek Zdravko, Klare Johann P., Anderluh Gregor, Busby Steve J. W., Steinhoff Heinz-Jürgen, Žgur-Bertok Darja
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

7.Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

Družbeno-ekonomski dosežek

1.	COBISS ID	773239	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Vloga kolicinov bakterije Escherichia coli in izražanje genov za njihovo sintezo	
	ANG	The role of Escherichia coli colicins and expression of colicin activity genes.	
Opis	SLO	Z namenom pridobiti vpogled v odziv občutljivih bakterijskih populacij na kolicin M v naravnem okolju, kakor tudi ob uporabi kolicina kot protimikrobnega sredstva, smo preučevali odziv seva E. coli na subinhibitorne koncentracije ColM s transkriptomsko analizo celotnega genoma z DNA mikromrežami in z uporabo fizioloških testov. Transkriptomsko analiza je pokazala povečanje izražanja genov stresnih odzivov ovojnice, osmotskih in drugih vključno z geni dvokomponentnega sistema CreBC, geni za sintezo zunajceličnih polisaharidov in zmanjšano izražanje genov za gibljivost. Preučeno je bilo tudi izražanje gena cka za kolicin K in ugotovljeno, da pri uravnavanju izražanja, protein IscR stabilizira protein LexA na promotor in skupaj s kooperativnostjo vezave dveh LexA dimerov povzroči zamik v transkripciji po indukciji odziva SOS.	
	ANG	To gain insight into the responses of sensitive bacterial populations to colicin M in the natural environment and when applied as an antimicrobial agent we studied the response of an E. coli strain to ColM subinhibitory concentrations on a global gene expression scale using DNA microarrays and physiological tests. Transcriptomic analysis showed increased expression of envelope, osmotic and other stress responses, including the two-component system CreBC genes, genes for extracellular polysaccharides and decreased expression of genes for motility. In addition, expression of the colicin K, cka gene was studied and found that protein IscR stabilizes protein LexA at the promoter and by cooperative binding of two LexA dimers induces a lag in transcription following induction of the SOS response.	
Šifra	D.09 Mentorstvo doktorandom		
Objavljeno v	[S. Kamenšek]; 2013; XVIII f., 172, [30] str.; Avtorji / Authors: Kamenšek Simona		
Tipologija	2.08 Doktorska disertacija		
2.	COBISS ID	739959	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Dejavniki virulence uroseptičnih sevov Escherichia coli ter možnost uporabe kolicinov - novih protimikrobnih snovi v boju proti okužbam urinarnega trakta	
	ANG	Virulence factors of uroseptic Escherichia coli strains and possibility of their application - new antimicrobial agents in the battle against infections of the urinary tract	
Opis	SLO	Izolati, ki so bili uvrščeni v filogenetsko skupino B2 so imeli bistveno večji nabor dejavnikov virulence, vključno z genom usp, kot izolati iz ostalih skupin. Kolicini E6, E7, K in M so učinkovito inhibirali rast uroseptičnih izolatov E. coli. Najučinkovitejši je bil kolicin E7, saj je inhibiral rast kar 87% preiskovanih izolatov. Z ustrežno kombinacijo kolicinov je bilo mogoče preprečiti rast kar 98% preiskovanih izolatov.	
	ANG	Isolates assigned to the phylogenetic group B2 encoded a higher number of virulence factors, including usp than isolates of other groups. colicins E6, E7, K and M efficiently inhibited growth of uroseptic E. coli isolates. the most efficient was colicin E7 as it inhibited growth of 87% of the tested isolates. Employing an appropriate combination of colicins it was possible to inhibit growth of 98% of the investigated strains.	
Šifra	D.09 Mentorstvo doktorandom		
Objavljeno v	[M. Rijavec]; 2010; XII, 100 f., [1] f. pril.; Avtorji / Authors: Rijavec Matija		
	2.08		

Tipologija		Doktorska disertacija	
3.	COBISS ID	2853455	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Sev ŽP bakterije Escherichia coli in nov mehanizem protimikrobnega delovanja	
	ANG	Strain ŽP Escherichia coli and a new mechanism of antimicrobial activity	
Opis	SLO	Sev ŽP je modificiran probiotični sev Nissle z zapisom za sintezo bakteriocina E7 na konjugativnem plazmidu in zapisom za imunost proti bakteriocinu E7 v kromosomu. Kolicin uniči patogene seve bakterije E. coli po konjugativnem prenosu plazmida. Opisani sev se izogne odpornosti proti protimikrobni učinkovini.	
	ANG	Strain ŽP is a modified probiotic strain Nissle coding for synthesis of the E7 bacteriocin on a conjugative plasmid and immunity against the E7 bacteriocin on the chromosome. The colicin destroys pathogenic E. coli strains following conjugal transfer of the plasmid. The described strain bypasses resistance against the antimicrobial agent.	
Šifra		F.33	Patent v Sloveniji
Objavljeno v		Urad RS za intelektualno lastnino; 2013; 8 f.; Avtorji / Authors: Starčič Erjavec Marjanca, Petkovšek Živa, Žgur-Bertok Darja	
Tipologija		2.24	Patent
4.	COBISS ID	258514176	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Bakterij ne bomo prelisičili, pojavljali se bodo novi izbruhi	
	ANG	We cannot outsmart bacteria, new outbreaks will arise	
Opis	SLO	Leta 2011 je v Nemčiji in drugih državah Evrope umrlo 40 oseb zaradi izbruha enterohemoragične Escherichia coli. Vir okužbe so bili kalčki uvoženi iz Egipta. Sev so uvrstili v patotip enteroagregativne E. coli, ki je horizontalnim prenosom DNA pridobil zapis za sintezo Šiga toksina.	
	ANG	In the year 2011 in Germany and several other European countries 40 people died due to an outbreak of enterohemorrhagic E. coli. The strain provoking the outbreak was identified as enteroaggregative E. coli that had acquired via horizontal gene transfer DNA for the production of the Shiga-like toxin.	
Šifra		F.35	Drugo
Objavljeno v		Delo; Delo; 2011; Leto 53, št. 167; str. 18; Avtorji / Authors: Žgur-Bertok Darja	
Tipologija		1.04	Strokovni članek
5.	COBISS ID	2965583	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Mikrob in patogeneza	
	ANG	Microbial pathogenesis	
Opis	SLO	Učbenik za predmet Mikrob in patogeneza	
	ANG	Textbook for microbial pathogenesis	
Šifra		D.10	Pedagoško delo
Objavljeno v		s. n.]; 2013; 12 f.; Avtorji / Authors: Petkovšek Živa, Žgur-Bertok Darja	
Tipologija		2.05	Drugo učno gradivo

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine^Z

V pripravi je objava sledečih pomembnih znanstvenih rezultatov:
Struktura otoka patogenosti PAI_{usp} z genetskim zapisom za Usp in proteini imunosti Imu, je

mozaična. Sevi se razlikujejo po številu in vrstnem redu genov imu1-3. Dokazali smo razlike v virulenci omenjenih sevov, tisti z manjšim številom genov imunosti so bolj virulentni. Analiza nukleotidnih zaporedij genomov je razkrila, da so geni usp imu1-3 v vseh sekvenciranih sevih vedno na enakem mestu, med geni aroP in pdhR, ter da ima poleg E. coli omenjene gene le Salmonella bongori. Sevi slednje vrste so opurtonisti in morda je prav produkcija Usp ključna v patogenezi. Dokazali smo, da izolirani protein Usp zmanjša viabilnost monocitov (celična linija MM6), kar kaže, da Usp zmanjša učinkovitost imunskega sistema.

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

9.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Kljub temu, da pogostnost bakteriemij in sepse narašča so do sedaj le maloštevilne raziskave preučevale lastnosti bakterijskih sevov, ki jih povzročajo. Narašča tudi pogostnost bakterij odpornih proti številnim klinično pomembnim antibiotikom. Poleg tega novejša raziskava razkrivajo, da so bakterijske okužbe lahko tudi vzrok nekaterih rakastih obolenj bodisi zaradi vnetnega odziva na okužbo ali zaradi genotoksinov, ki jih bakterije producirajo. Slednji poškodujejo genom gostitelja. Glede na podobnost C terminalne domene Usp in kolicina E7 je veljalo, da je Usp bakteriocin, vpleten pri med-bakterijskem tekmovanju. Prvi smo izdelali protokol za uspešno izolacijo proteina Usp. Naša raziskava je prva pokazala, da je protein Usp pravi virulentni dejavnik, ki v humanih celicah izzove poškodbe genoma, prerazporeditve citoskeleta in apoptozo ter, da je izločen iz bakterijskih celic. Poškodbe genoma humanih celic je prvi korak, ki izzove nenadzorovano rast in tumorigenezo. Vsi preiskovani sevi bakterije E. coli, z genetskim zapisom za usp, sodijo v filogenetsko skupino B2 in so statistično značilno povezani z genetskimi zapisi za cnf1, hlyA, papGIII, tcpC in sfaDE. Kljub temu, da je bila statistično značilna višja prevalenca gena usp pri patogenih sevih E. coli, smo genetski zapis zanj zasledili tudi pri komenzalnih sevih izoliranih iz zdravih oseb. Ker protein Usp poškoduje genome bi lahko bil vpleten pri razvoju rakastih obolenj. Zaradi odpornosti bakterij proti antibiotikom so nujno potrebni novi pristopi v boju proti bakterijskim okužbam. S cepljenjem preprečimo okužbe in se posledično izognemo potrebi po zdravljenju. Ključno za pripravo cepiva je vzpodbujanje imunskega odziva. Dokazali smo, da katalitična podenota proteina Usp izzove imunski odziv in je torej primerna za pričetek priprave cepiva, ki bi ščitilo proti okužbam urinarnega trakta s težjim potekom, bakteriemijo povzročeno z E. coli in tudi proti nekaterimi rakastimi obolenji. Dokazali smo novi mehanizem zaščite bakterij pred delovanjem lastnega toksina – prekritje genoma z nespecifično vezavo proteina Imu3 na DNA.

ANG

Even though the prevalence of bacteriemia and sepsis is increasing only a small number of investigations have characterized bacterial strains that provoke such infections. Increasing is also the prevalence of bacteria resistant against clinically significant antibiotics. Further, recent studies have shown that bacterial infections can provoke tumorigenesis due to inflammation or due to production of genotoxins that damage the host genome. In light of the similarity of the C terminal domain of Usp and colicin E7, it was previously presumed that it acts as a bacteriocin involved in bacterial competition. We were first to prepare a protocol for the successful isolation of protein Usp. Our study was also the first to show that Usp is a bona fide virulence factor that in human cells provokes genome damage, rearrangement of the cytoskeleton, apoptosis and that it is secreted from the bacterial cell. DNA damage is the first step that provokes uncontrolled growth and tumorigenesis. All investigated E. coli strains encoding usp, were assigned to the phylogenetic group B2 and were statistically significantly associated with genes cnf1, hlyA, papGIII, tcpC and sfaDE. Even though usp was statistically significantly more frequently associated with pathogenic strains, we also detected usp among commensal strains from healthy individuals. Since Usp damages the genome it could be involved in tumorigenesis. Due to the high prevalence of antibiotic resistant bacteria, new approaches are urgently needed to successfully battle infectious diseases. Vaccination prevents infection to avoid the use of antibiotics. A key aspect of vaccine development is induction of an immune response. We demonstrated that the catalytic domain of Usp induces an immune response and would therefore be appropriate for vaccine development that would protect against severe urinary

tract infection, bacteriemia provoked by E. coli and possibly some cancers. We also demonstrated a new mechanism of bacterial protection against their own toxins – nonspecific genome masking by protein Imu3.

9.2.Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Zaradi vse večje pogostnosti determinant odpornosti proti antibiotikom se povečuje in se bo še povečevala umrljivost zaradi infektivnih obolenj. Bolj pogosto bo potrebno zaporedno zdravljenje z več antibiotiki ali s kombinacijami več antibiotikov in bolj pogosto bo potrebno zdravljenje v bolnišnicah, kar izjemno poveča stroške zdravljenja. Lahko pričakujemo, da bodo danes še preprosti kirurški posegi ter invazivni a vendar nujni medicinski postopki, katere spremlja protimikrobna terapija, v bodoče zelo tvegani. Poleg tega najnovejše raziskave povezujejo nekatere bakterijske okužbe z rakastimi obolenji. Nujni so novi pristopi kot so karakterizacija in osamitev virulentnih dejavnikov patogenih bakterij, razumevanje njihovega delovanja in poskusi izdelave cepiv. Sevi bakterije E. coli so močno razširjeni in povzročajo tudi v Sloveniji številne okužbe vključno z bakteriemijo in sepsom. Slednja je v razvitem svetu deseti, na oddelkih intenzivne medicine pa drugi najpogostejši vzrok smrti. Pogostnost okužb s težjim potekom narašča tudi zaradi naraščanja števila oseb z oslabljenim imunskim odzivom (starostniki, kronični bolniki, onkološki bolniki, bolniki po kirurških posegih) kakor tudi zaradi odpornosti bakterij proti antibiotikom. Z ustreznim cepivom bi lahko pred tovrstnimi okužbami zaščitili najbolj ogrožene skupine: onkološke bolnike, starostnike, bolnike s sladkorno boleznijo in ranami, bolniki pred presaditvijo, bolnike pred kirurškimi posegi. Zmanjšali bi stroške zdravljenja oz. preprečili potrebe po zdravljenju. Vpletenost bakterij v tumorigenezi je predmet intenzivnih raziskav najuglednejših raziskovalnih skupin v svetovnem merilu. Odkritje, da Usp deluje kot genotoksin in, da ga producirajo tako patogeni kakor tudi komenzalni sevi bakterije E. coli, postavlja Slovenijo ob bok držav z najvidnejšimi raziskovalnimi dosežki. Odkritje, da se protein imunosti Imu3, ki ščiti producenta proti delovanjem Usp, nespecifično veže na DNA ima velik biotehnološki potencial – npr. izolacija DNA iz naravnih vzorcev.

ANG

Due to the rapid evolution and spread of antibiotic resistances consecutive treatment with different antibiotics or with combinations of antibiotics is often required, increasing medical costs. Treatment in hospitals will be required more frequently, additionally increasing health care expenses and influencing the quality of life. Simple surgical procedures and invasive medical treatments which rely upon concomitant antimicrobial therapy will, in the near future, pose high risks. Further, recent publications indicate that certain bacterial infections are associated with cancer. Urgently needed are new approaches, such as the isolation of virulence factors of pathogenic bacteria for the development of vaccines. E. coli strains are widespread and are the causative agents of numerous infections including sepsis. The latter is, in developed countries the tenth and in units of intensive medical care the second most frequent cause of death. The prevalence of sepsis is increasing also due to a higher prevalence of immune-compromised individuals (elderly population, patients with diabetes and wounds, transplant patients, patients requiring surgery, oncology patients) as well as due to bacterial resistance against antibiotics. An appropriate vaccine could protect vulnerable individuals and others, against the most severe infections drastically reducing health care costs. The role of bacteria in tumorigenesis is the subject of intense research performed by top research groups on a global scale. The discovery that Usp acts as a genotoxin and that it is produced by pathogenic and, to a lesser degree by commensal E. coli strains, places Slovenia among nations with the highest scientific impact. The discovery that immunity protein Imu3, protects the producer against Usp activity by nonspecifically DNA binding has great biotechnological potential – for example, DNA isolation from highly dilute environmental samples.

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

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

Cilj	
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin

	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

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

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

Komentar

11. Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!
Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.02.	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="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

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

Komentar

--

12.Pomen raziskovanja za sofinancerje¹¹

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

13.Izjemni dosežek v letu 2013¹²**13.1. Izjemni znanstveni dosežek**

Izjemni znanstveni dosežek je objava članka:

Nipič Damijan, Podlessek Zdravko, Budič Maruška, Črnigoj Miha, Žgur-Bertok Darja. 2013. The Escherichia coli uropathogenic specific protein Usp, is a bacteriocin-like genotoxin
University of Chicago Press; The Journal of infectious diseases; 2013; Vol. 208, iss. 10; str. 1545-1552; Impact Factor: 5.848.

Revija je peta iz prodročja.

Protein Usp, je virulentni dejavnik, bakterije Escherichia coli, ki inducira poškodbe genoma,

prerazporeditve citoskeleta in apoptozo celic humanih celičnih linij. Usp je izločen iz bakterijskih celic. Zaradi genotoksične aktivnosti bi Usp lahko bil vpleten pri nastanku rakastih bolezni.

13.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Sourednica zbornika predstavitev Slavnostne akademije ob "20 letnici študija mikrobiologije na Univerzi v Ljubljani" v tednu Univerze v decembru leta 2013.

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

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

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza v Ljubljani, Biotehniška
fakulteta

Darja Žgur-Bertok

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana	7.4.2014
-----------	----------

Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2014/35

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

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

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

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

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

⁶ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

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

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

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

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

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

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

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

¹² Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2013 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2014 v1.03
AE-72-B1-5C-68-39-70-7B-5F-EB-08-F3-14-12-E1-A7-12-F7-80-F4