

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/192



## ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

## A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

## 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	J4-4149
<b>Naslov projekta</b>	Preučevanje hom(e)olognih rekombinacij v evoluciji poliketidnih sintaz
<b>Vodja projekta</b>	21392 Štefan Fujs
<b>Tip projekta</b>	J Temeljni projekt
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	7560
<b>Cenovni razred</b>	C
<b>Trajanje projekta</b>	07.2011 - 06.2014
<b>Nosilna raziskovalna organizacija</b>	2592 ACIES BIO, biotehnoške raziskave in razvoj, d.o.o.
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	106 Institut "Jožef Stefan" 481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
<b>Raziskovalno področje po šifrantu ARRS</b>	4 BIOTEHNIKA 4.06 Biotehnologija 4.06.01 Tehnologija rekombinantne DNA
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	06. Industrijska proizvodnja in tehnologija
<b>Raziskovalno področje po šifrantu FOS</b>	2 Tehniške in tehnološke vede 2.09 Industrijska biotehnologija

## B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

2. Povzetek raziskovalnega projekta<sup>1</sup>

SLO

**Naravne bioaktivne spojine, ki jih producirajo aktinomicete, se pogosto uporabljajo v različnih kliničnih aplikacijah, npr. kot protibakterijske (makrolidi), protitumorske (antraciklini, epotilon) in**

poliketidnih spojin se sintetizirajo na velikih in kompleksnih multiencimskih sistemih, imenovanih modularne poliketid sintaze tipa I (PKS). Z namenom ustvarjanja novih analogov zdravil so za manipulacijo teh biosinteznih genskih skupin PKS uporabili različne pristope biosinteznega inženirstva. Večina teh pristopov temelji na procesu hom(e)ologne rekombinacije (HR). Čeprav je ta pristop v določenih primerih uspešen, se je velikokrat izkazal kot zelo zahteven in zamuden zaradi običajno nizke frekvence HR pri aktinomicetnih (streptomicetnih) sevih, ki so producenti teh sekundarnih metabolitov. Danes je na voljo vedno večje število genomskih zaporedij aktinomicetnih sevov (*Streptomyces* sp.), ki predstavljajo dragocene podatke za pridobitev boljšega vpogleda v mehanizme rekombinacije in s tem omogočajo pripravo učinkovitejših genetskih orodij za manipulacijo biosinteznih poti. Tako je bil glavni cilj tega projekta podrobno raziskati dejavnike, ki vplivajo na učinkovitost HR tako na nivoju DNA kot tudi na nivoju proteinov v aktinomicetnih sevih. V nadaljevanju smo razvili učinkovita genska orodja za ciljno manipulacijo tarčnih genskih skupin v izbranih sevih ter identificirali nove analoge bioaktivnih spojin, ki smo jih proizvedli s tako spremenjeni sevi.

Projekt je bil razdeljen v več raziskovalnih aktivnosti. Začetno delo je vključevalo bioinformatiko identifikacijo naravno prisotnih ponovitev DNA zaporedij v PKS skupinah številnih izbranih sevov (vključno z genomskim zaporedjem *Streptomyces rapamycinicus* seva NRRL 5491, ki smo ga sekvencirali tekom tega projekta), ki bi jih lahko uporabili za določanje minimalnih segmentov učinkovitega procesiranja (MEPS) v aktinomicetnih sevih. Med številnimi potencialnimi DNA ponovitvami v obstoječih genomskih zaporedjih, smo izbrali 575 bp popolno ponovitev nukleotidnega zaporedja iz genoma *Streptomyces rapamycinicus*, iz PKS genske skupine za biosintezo rapamicina. To zaporedje smo tako uporabili za postavitve eksperimentalnega sistema za določevanje učinkovitosti HR – merjenja MEPSov, ki smo ga podrobno testirali v različnih aktinomicetnih sevih. Za končno določanje MEPSov in potencialne vloge rekombinacijskih genov pa je bil izbran sev *S. rapamycinicus*. Na osnovi podatkov, pridobljenih s testiranjem MEPSov, smo pripravili specifične plazmidne konstrukte za manipulacijo genske skupine za biosintezo rapamicina in tako razvili gensko spremenjene seve *S. rapamycinicus*, ki so proizvajali nove analoge (rapaloge, rapamicinske analoge), katerim smo testirali biološko aktivnost. Preliminarni rezultati so pokazali, da bi te spojine lahko imele

ANG

Bioactive natural polyketide compounds produced by actinomycetes are widely used in different clinical applications such as antibacterials (macrolides), anticancer drugs (anthracyclines, epothilone), immunosuppressants (rapamycin, FK506), etc. Many of these compounds are synthesised by large and complex multi-enzyme systems called type I modular polyketide synthases (PKSs) encoded by relatively large PKS gene clusters that can be genetically modified in order to generate novel drug analogues. Different approaches were applied for targeted genetic manipulation of PKS gene clusters, mostly relying on the process of hom(e)ologous recombination (HR), but were frequently found to be very difficult and time consuming due to a generally poor understanding of HR mechanisms in actinomycetes. In depth mining of today's ever increasing number of *actinomycete* (*Streptomyces*) sp. genomic DNA sequences, represents

a valuable asset to gain better insight in their recombination mechanisms and to use this knowledge for development of more efficient genetic tools for their targeted manipulation. Based on this approach the main goals of this project were to investigate in detail the factors which influence the HR efficiency, either at DNA and protein level, in various *actinomyces* strains, develop efficient genetic tools for targeted manipulation of chosen PKS gene clusters in selected microbial strains. Finally, we used genetically modified microbial strains for production of novel analogues of as bioactive compounds.

The project was divided into several overlapping research activities. Firstly this included the bioinformatic identification of the naturally occurring DNA repeats in the PKS clusters of numerous investigated strains (including the genomic sequence of the *Streptomyces rapamycinicus* strain NRRL 5491, sequenced during this project) that could be used as potential DNA sequences for determination of the minimal efficient processing segments (MEPS) in *actinomyces* strains. Among numerous potential repeats in investigated available genomic DNA sequences, the 575 bp perfect repeat from the *S. rapamycinicus* PKS cluster encoding rapamycin biosynthesis was chosen as the DNA segment for setting up the plasmid based experimental system for determination of MEPS. This experimental system has been thoroughly tested in various *actinomyces* strains and we finally focused on the determination of MEPS in *S. rapamycinicus* and possible role of recombination genes. Based on the data obtained from this MEPS study the specific plasmid constructs for rapamycin gene cluster manipulation were developed and genetically modified *S. rapamycinicus* strains were obtained which were found to produce novel compounds (rapalogs, rapamycin analogues). Furthermore, results of first preliminary tests of biological activity of the obtained rapalogs indicate that they could have potential use as novel drug candidates.

### 3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu<sup>2</sup>

Izvedba tega projekta je potekala na treh institucijah, in sicer na Acies Bio, Biotehniški fakulteti in na Institutu Jožef Stefan. Začetni cilj projekta je bil podrobno raziskati proces hom(e)ologne rekombinacije (HR) v različnih aktinomicetnih vrstah in dejavnike, ki vplivajo na njegovo učinkovitost tako na proteinskem kot na DNA nivoju. Raziskovalne dejavnosti v začetnem obdobju projekta so bile usmerjene v raziskovanje frekvence hom(e)ologne rekombinacije z uporabo eksperimentalnih sistemov na podlagi plazmidov v različnih aktinomicetnih sevih: *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces rapamycinicus* in *Streptomyces tsukubaensis*. Za postavitve eksperimentalnega sistema za merjenje frekvence HR smo v okviru WP1 izvedli prvi del bioinformatične analize za identifikacijo naravno prisotnih identičnih DNA zaporedij v genskih skupinah za poliketid-sintaz (PKS) preučevanih sevov. Med številnimi potencialnimi DNA ponovitvami, ki smo jih raziskovali, v obstoječih genomskih zaporedjih DNA, smo izbrali eno 575 bp dolgo popolno ponovitev nukleotidnega zaporedja iz genoma *Streptomyces rapamycinicus*. To zaporedje smo kasneje uporabili tudi za postavitve eksperimentalnega sistema za določitev učinkovitosti hom(e)ologne rekombinacije – merjenja minimalnih segmentov učinkovitega procesiranja (minimal efficient processing segment – MEPS). V drugem delu bioinformatične analize (WP1) smo identificirali več različnih genov, katerih inaktivacija oziroma modifikacija bi lahko imela vpliv na učinkovitost HR z fokusom na gene iz seva *Streptomyces rapamycinicus*, za katerega smo tudi genom sekvencirali v okviru tega projekta. Rezultati bioinformatične analize so pokazali, da so v genomu *S. rapamycinicus* prisotni homologji vseh pomembnejših genov, ki so udeleženi pri HR v *E. coli* (npr. *recA-recX*) in štirje homologji gena *Ku70*, ki tudi sodeluje pri rekombinacijskem procesu nehomolognega združevanja koncev (NHEJ), ki je kompetitiven HR. Podobno kot pri drugih aktinomicetah nismo našli homologov genov, udeleženih v popravljanju napačno sparjenih baznih parov (angl. mismatch repair).

V okviru WP2 smo postavili ustrezen eksperimentalni sistem, ki temelji na konstrukcih "rec plazmida", ki vsebujejo dve istosmerni kopiji 575 bp dolge ponovitve iz gena rapamicinske PKS, pri čemer smo lahko eno od kopij spreminjali tako, da je vsebovala želeno število točkastih razlik ali pa dolžino homologije (merjenje MEPS – WP3). Povsem na koncu ene od ponovitev smo vstavili tudi unikatno DNA zaporedje, ki ga prepozna meganukleaza I-SceI in ki predstavlja mesto dvoverižnega loma (DSB) po indukciji izražanja I-SceI. Inducibilno izražanje

meganukleaze I-SceI in s tem nadzorovano sprožitve DSB smo omogočili tako, da smo sintetizirali in v isti »rec plazmid« vstavili zaporedje represorja TetR. Ta omogoča optimizirano izražanje v *Streptomyces sp.* in pod nadzorom promotorja ST14 ter gena za I-SceI endonukleazo pod nadzorom *tet* promotorja. Poleg navedenih elementov so ti plazmidi vsebovali še pozitivni (apramicinska rezistenca) in negativni (občutljivost na streptomycin – *rpsL*) selekcijski marker med istosmernima ponovitvama, kar je omogočilo hitro selekcijo rekombinacijskih dogodkov (»pop-out«). Plazmidi so vsebovali tudi integrazo iz faga  $\phi$ C31 ter *att* mesto, ki ga ta integrira prepozna, za vstavitve »rec plazmida« v genom. Istosmerni kopiji iz rapamicinske PKS smo za uporabo v našem eksperimentalnem sistemu izbrali na podlagi obsežnejše analize genskih skupin, ki vsebujejo gene za modularne PKS, v katerih se pogosto pojavljajo homologne regije z relativno dolgimi identičnimi ponovitvami in s tem uspešno zaključili aktivnosti v okviru WP2. Izsledke te analize smo v letu 2012 objavili tudi v znanstvenem članku z visokim faktorjem vpliva.

V okviru WP3 smo testirali začetni rec-plazmidni konstrukt, ki vsebuje vse zgoraj navedene genske elemente v sevih *S. erythraea*, *S. coelicolor*, *S. rapamycinicus* in *S. tsukubaensis*, ki smo jih prej selekcionirali kot rezistentne na visoke koncentracije streptomocina (kot negativnega selekcijskega markerja). Ko smo v te seve vstavili testni rec-plazmid, smo ugotovili, da se je učinek negativne selekcije *rpsL* gena na plazmidu pokazal samo pri *S. rapamycinicus*, ki je ponovno postal občutljiv na streptomycin, medtem ko pri drugih sevih povrnitve občutljivosti po vnosu *rpsL* nismo opazili. Poskušali smo uporabiti tudi druge negativne selekcijske markerje, ki bi bili učinkoviti tudi v drugih aktinomicetnih sevih. Na primer poskusi z uporabo gena, ki kodira zapis za encim citidin deaminazo, v istem plazmidnem konstrukt so bili neuspešni tudi v drugih aktinomicetnih sevih. Zato smo opustili vse nadaljnje študije s temi sevi in se osredotočili na že razvit funkcionalen eksperimentalen sistem v *S. rapamycinicus*. Na začetku smo pripravili serijo različnih »rec-plazmidov«, ki so se razlikovali v stopnji homologije dveh ponovitev, ter jih vstavili v sev *S. rapamycinicus*. Največje preizkušeno neujemanje med 575 bp dolgima ponovitvama je bilo v 12 mestih, kar ustreza eni od naravnih ponovitev, ki so bili najdeni v rapamicinskem PKS genu iz *S. rapamycinicus*. Ugotovili smo, da se je frekvenca pogostosti rekombinacijskih dogodkov signifikantno razlikuje (za dva velikostna razreda) med konstrukti z dvema ponovitvama in s konstrukti, ki v enem od dveh ponovitev vsebujejo 12 točkastih razlik. Glede na porazdelitev teh 12 neujemanj smo ugotovili, da je najdaljša homologija, ki se nahaja med dvema neujemanjema 130 bp, kar nakazuje, da je MEPS v *S. rapamycinicus* ocenjen vsaj na dolžino 130 bp DNA homologije. Potencialno, pa je lahko še nižji. Te prve ocene za MEPS v *S. rapamycinicus*, smo v nadaljevanju projekta natančneje potrdili in določili z uporabo »rec-plazmidov«, kjer je ena od ponovitev postopoma zmanjševana s 5' ali 3' konca (280, 140, 70 in 40 bp). Z tistim rec-plazmidnim konstruktima smo ugotovili, da se je frekvenca pogostosti rekombinacijskih dogodkov signifikantno zmanjšala, če se je ena ponovitev skrajšala na 70 in 40 bp, kar je dodatno nakazovalo, da je MEPS v *S. rapamycinicus* ocenjen na dolžino cca. 100 bp DNA homologije.

V okviru WP4 smo na podlagi predhodno pridobljenih podatkov podrobne bioinformacijske analize sekvence genoma *S. rapamycinicus*, pripravili plazmide, ki so omogočali inaktivacijo ključnih genov vpletenih v HR (*recA*) oziroma NHEJ (homolog *Ku70*). Razen potrebne homologije za inaktivacijo teh tarčnih genov, so ti plazmidi vsebovali tudi endonukleazo I-SceI in negativni selekcijski marker. Skupaj z mestom, ki jo prepozna endonukleaza in negativnim selekcijskim markerjem *rpsL* smo dosegli veliko bolj učinkovito inaktivacijo genov zaradi večje frekvence dogodka »pop-out« in veliko lažje selekcije pridobljenih mutantov zaradi rezistence na streptomycin (izguba negativnega selekcijskega markerja *rpsL*). Tako smo uspeli razviti nove in učinkovitejše pristope za tarčno inaktivacijo genov v *S. rapamycinicus*. S pomočjo teh novih plazmidov smo uspešno pripravili mutante seva *S. rapamycinicus* in tako uspešno zaključili WP4.

V okviru WP5 smo uporabili seve pripravljene v okviru WP4 (*recA* in homolog *Ku70*) v podrobni študiji z že zgoraj opisanem eksperimentalnem sistemu. Ugotovili smo, da se frekvenca pogostosti rekombinacijskih dogodkov ne razlikuje signifikantno med sevi s funkcionalnima oz. inaktiviranimi genoma, ker nakazuje, da produkti izbranih genov niso ključni v procesu homologne rekombinacije med istosmernim DNA ponovitvi ali pa nakazuje na morebitno prisotnost drugih genskih produktov v *S. rapamycinicus*, ki lahko komplementirajo funkcijo za izbrana inaktivirana gena.

V sklopu WP6, smo glede na rezultate iz WP5 se odločili uporabiti divji sev *S. rapamycinicus*, v katerem smo na osnovi podatkov pridobljenih v WP3 (velikost MEPSov v *S. rapamycinicus*) in na podlagi razvoja učinkovitejšega pristopa za tarčno inaktivacijo genov v *S. rapamycinicus* (sistem razvit v WP4), smo se osredotočili na spreminjanje PKS modulov. Tukaj smo s pomočjo rekombinacije določenih modulov v biosintezni genski skupini za rapamicin

uspešno pripravili gensko spremenjen sev *S. rapamycinicus*, ki proizvaja nov analog rapamicina (rapalog) s popolnoma novim ogrodjem. V sklopu WP6 smo tudi optimizirali produkcijski proces v laboratorijskih bioreaktorjih (sporulacijsko, vegetativno in produkcijsko gojišče) in uspešno pripravili ter izolirali nove rapamicinske analoge. Te analoge smo identificirali in tudi testirali njihovo biološko aktivnost, kjer smo se osredotočili predvsem na proliferacijo človeške monocitne celične linije U937. Testiranje novih rapamicinskih analogov (CAB903) je pokazalo, da pri višjih koncentracijah vpliva na proliferacijo celic U937, ne kaže pa citotoksičnosti. Pridobljeni novi rapamicinski analogi tekom tega projekta imajo potencialno zanimive biotehnološke aplikacije (npr. kot imunosupresivne spojine, proti-staranju, proti-rakaste učinkovine, itd.) kot tudi predstavljajo nove vodnice za nadaljnje polysintezne modifikacije in tako potencialno nove kandidate v razvoju novih zdravil.

#### 4. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>3</sup>

Večina raziskovalnih aktivnosti v projektu je potekala uspešno in v skladu s predvidenimi načrti. Prve uspešno opravljene raziskovalne aktivnosti vključujejo postavitve »rekperimentalnega« sistema za spremljanje rekombinacije v *S. rapamycinicus* in oceno dolžine MEPS v tem organizmu (~100 bp). Zaradi težav pri uporabi prvotnega sistema z »rec plazmidi« v proučevanih sevih (*S. erythraea*, *S. coelicolor* in *S. tsukubaensis*), ter neuporabnosti alternativnega negativnega selekcijskega markerja (citidin deaminaza) uporabljenega eksperimentalnega sistema na drugih aktinomicetnih sevih ni bilo mogoče uporabiti. Naslednja uspešno opravljena raziskovalna aktivnost vključuje razvoj novih in učinkovitejših pristopov za tarčno inaktivacijo genov v *S. rapamycinicus* na podlagi eksperimentalnega sistema za oceno dolžine MEPSov. Tako pridobljeni rezultati so nam omogočili boljše razumevanje hom(e)ologne rekombinacije (HR) v *S. rapamycinicus*. S pomočjo genskih orodij in razumevanjem HR smo na koncu projekta lahko pridobili gensko spremenjene seve *S. rapamycinicus*, ki so proizvajali nove analoge rapamicina (rapaloge). Kot smo že omenili, imajo lahko novi analogi zanimive biotehnološke in zato pripravljamo patentno prijavo, ki bo omogočila patentno zaščito novih analogov.

#### 5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine<sup>4</sup>

Tekom izvedbe projekta ni prišlo do bistvenih sprememb programa in sestave projektne skupine.

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

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	4142456	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Anotacija modularnih PKS in NRPS genskih skupin v genomu <i>Streptomyces tsukubaensis</i> NRRL 18488
		ANG	Annotation of modular PKS and NRPS gene clusters in the genome of <i>Streptomyces tsukubaensis</i> NRRL18488
	Opis	SLO	V članku je opisana anotacija genskih skupin za biosintezo naravnih spojin, pri katerih sodelujejo modularni biosintezni enicimi poliketid sintaze (PKS) in neribosomske peptid sintetaze (NRPS), v genomu <i>S. tsukubaensis</i> , ki ga je pred kratkim sekvenciral Acies Bio. Analiza teh zelo velikih genov v genomih, pridobljenih s tehniko pirosekvenciranja, je zelo težavna, saj so genske skupine razporejene na več kontigih, napake v sekvenciranju povzročajo navidezne prekinitve bralnih okvirjev, ti geni pa pogosto vsebujejo tudi zelo dolge ponavljajoče regije. Članek opisuje analizo genoma s filogenetskim pristopom in programom ClustScan, ki sta omogočila identifikacijo 4 PKS genskih skupin in 6 NRPS genskih skupin v genomu <i>S. tsukubaensis</i> . Z reakcijo PCR in sekvenciranjem smo popravili navidezne zamike bralnih okvirjev, z RT-PCR pa smo potrdili aktivno transkripcijo ene od identificiranih genskih skupin.

		<p>This article describes the annotation of gene clusters for biosynthesis of natural products, containing modular biosynthetic enzymes polyketide synthases (PKS) and nonribosomal peptide synthetases (NRPS) in the genome of <i>S. tsukubaensis</i>, recently sequenced by Acies Bio. The analysis of these very large genes in genomes obtained by pyrosequencing is demanding as gene clusters are distributed among several contigs, sequencing errors can introduce apparent frame-shifts and in addition, these genes often contain very long repetitive regions. The article describes the analysis of the genome by phylogenetic approach and the ClustScan program, which enabled the identification of 4 PKS gene clusters and 6 NRPS gene clusters in the genome of <i>S. tsukubaensis</i>. In addition, PCR and sequencing enabled us to correct apparent frame-shifts and RT-PCR approach was used to demonstrate active transcription of one of the identified gene clusters.</p>
	Objavljeno v	American Society for Microbiology; Applied and environmental microbiology; 2012; Vol. 78, no. 23; str. 8183-8190; Impact Factor: 3.678; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.864; A': 1; WoS: DB, QU; Avtorji / Authors: Blažič Marko, Starcevic Antonio, Lisfi Mohamed, Baranasic Damir, Goranovič Dušan, Fujs Štefan, Kuščer Enej, Kosec Gregor, Petković Hrvoje, Cullum John, Hranueli Daslav, Zucko Jurica
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	4278904 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<p><i>SLO</i> Osnutek nukleotidnega zaporedja seva <i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL 5491, producenta imunosupresanta rapamicina</p> <p><i>ANG</i> Draft genome sequence of <i>Streptomyces rapamycinicus</i> strain NRRL 5491, the producer of the immunosuppressant rapamycin</p>
	Opis	<p><i>SLO</i> Sev <i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL 5491 proizvaja pomembno učinkovino rapamicin in ima 12.7 Mb velik genom, kateri vsebuje čez 3 Mb genskih biosinteznih skupin za 48 sekundarnih metabolitov. Po pregledu glavnega ogrodja genoma smo ugotovili 10425 potencialnih proteinkodirajočih genov. Program ClustScan je našel 25 modularnih genskih skupin za sekundarne metabolite, od tega 13 tip I PKS genskih skupin, 5 NRPS genskih skupin in 7 mešanih PKS/NRPS genskih skupin, vključujoč tudi gensko skupino za biosintezo rapamicina. S programom antiSmash smo potrdili teh 25 modularnih skupin in hkrati odkrili še dodatnih 23 genskih skupin drugih tipov za biosintezo sekundarnih metabolitov. Pridobljeno zaporedje genoma je omogočilo bistveno izboljšalo razumevanje rekombinacijskih mehanizmov v sevu <i>Streptomyces rapamycinicus</i> in z njimi povezanih genskih homologov in tako olajšalo izvedbo aktivnosti pri izvedbi projekta.</p> <p><i>ANG</i> <i>Streptomyces rapamycinicus</i> strain NRRL 5491 produces the important drug rapamycin. It has a large genome of 12.7 Mb, of which over 3 Mb consists of 48 secondary metabolite biosynthesis clusters. The major scaffold was scanned for potential protein coding regions and 10,425 protein coding genes were predicted. The ClustScan program found 25 modular secondary metabolite clusters: 13 type I modular polyketide synthases (PKS), 5 nonribosomal peptide synthetases (NRPS), and 7 mixed PKS/NRPS clusters, including the rapamycin biosynthesis cluster. The antiSmash program also found these modular clusters as well as 23 further secondary metabolite clusters of other types. Obtained genome sequence enables significantly improvement of understanding of recombination mechanisms in strain <i>Streptomyces rapamycinicus</i> and related gene homologues and thus facilitates the implementation of the project.</p>
		American Society for Microbiology; Genome announcements; 2013; Vol. 1,

	Objavljeno v	no. 4; str. 1-2, e00581-13; Avtorji / Authors: Baranasic Damir, Gacesa Ranko, Starcevic Antonio, Zucko Jurica, Blažič Marko, Horvat Marinka, Gjuračić Krešimir, Fujs Štefan, Hranueli Daslav, Kosec Gregor, Cullum John, Petković Hrvoje	
	Tipologija	1.03 Kratki znanstveni prispevek	
3.	COBISS ID	3005775	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Domnevni regulatorni protein SACE_5599 je vključen v morfološko diferenciacijo in produkcijo eritromicina pri bakteriji <i>Saccharopolyspora erythraea</i>
		ANG	SACE_5599, a putative regulatory protein, is involved in morphological differentiation and erythromycin production in <i>Saccharopolyspora erythraea</i>
	Opis	SLO	Članek opisuje pripravo mutantov naravnega in industrijskega visokodonosnega seva <i>Saccharopolyspora erythraea</i> z inaktiviranim oziroma čezmerno izraženim regulatornim genom SACE_5599, ki smo jih pripravili na podlagi rezultatov WP3 in boljšega razumevanja homologne rekombinacije, ki smo ga pridobili v okviru tega projekta. Inaktivacija SACE_5599 v industrijskem sevu je zelo znižala donos eritromicina in intenziteto sporulacije. Nasprotno pa je čezmerno izražanje gena SACE_5599 v divjem tipu NRRL23338 povzročilo povečanje donosa eritromicina za 32%. Po odkritju regulatorja bldD je SACE_5599 je drugi domnevni regulatorni gen, ki je bil odkrit v <i>S. erythraea</i> in ima pozitiven učinek na donos eritromicina. Podobno kot bldD je tudi SACE_5599 vpleten v morfološki razvoj <i>S. erythraea</i> , kar nakazuje zelo tesno povezavo med biosintezo sekundarnih metabolitov in morfološko diferenciacijo pri tem organizmu.
		ANG	This article describes mutants of the native and industrial high producing strain of <i>Saccharopolyspora erythraea</i> with inactivated and overexpressed regulatory gene SACE_5599, which have been generated based on the results obtained in WP3 and better understanding of homologous recombination. Inactivation of SACE_5599 in the highproducing strain significantly reduced erythromycin yield, in addition to drastically decreasing sporulation intensity. In contrast, overexpression of SACE_5599 in the wild type NRRL23338 strain resulted in an increase of erythromycin yield by 32%. After identifying the regulatory gene bldD, SACE_5599 is the second putative regulatory gene to be identified in <i>S. erythraea</i> , which has a positive influence on erythromycin yield. Similarly to bldD, SACE_5599 is involved in morphological development of <i>S. erythraea</i> , suggesting a very close relationship between secondary metabolite biosynthesis and morphological differentiation in this organism.
	Objavljeno v	BioMed Central; Microbial cell factories; 2013; Vol. 12; str. 126-1-126-15; Impact Factor: 4.250; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.947; A': 1; WoS: DB; Avtorji / Authors: Kirm Benjamin, Magdevska Vasilka, Tome Miha, Horvat Marinka, Karničar Katarina, Petek Marko, Vidmar Robert, Baebler Špela, Jamnik Polona, Fujs Štefan, Horvat Jaka, Fonović Marko, Turk Boris, Gruden Kristina, Petković Hrvoje, Kosec Gregor	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	

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

	Družbeno-ekonomski dosežek		
1.			

	COBISS ID	4171384	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Priprava novih analogov kelokardina in FK506 z biosinteznim inženirstvom in kemobiosintezo	
	ANG	Preparation of novel analogues of chelocardin and FK506 using biosynthetic engineering and chemobiosynthesis	
Opis	SLO	Na mednarodni konferenci v organizaciji Centra odličnosti CIPKEBIP je imel raziskovalec Acies Bio dr. Gregor Kosec predavanje, v katerem je predstavil pristope, ki jih uporablja podjetje za pridobivanje novih analogov medicinsko pomembnih poliketidnih spojin in za optimizacijo aktinomicetnih sevov, ki te spojine proizvajajo. Pristopi biosinteznega inženirstva imajo izreden potencial, saj omogočajo pripravo derivatov naravnih spojin, ki jih ni možno pridobiti s klasičnimi polysintezni pristopi. V okviru predavanja smo predstavili tudi potek in rezultate študij rekombinacijskih mehanizmov, ki potekajo v okviru tega projekta. Predstavljeni rezultati so poželi veliko zanimanja prisotnih akademskih in industrijskih raziskovalcev in so predstavljali dobro osnovo za nadaljnje sodelovanje podjetja v industrijskih in bazičnih raziskovalnih projektih.	
	ANG	During the international conference organized by CIPKEBIP Centre of Excellence, Acies Bio researcher Gregor Kosec gave an lecture, describing approaches used by the company for production of novel analogues of medicinally important polyketide compounds and for optimization of the producing organisms from the actinomycete group. Biosynthetic engineering approaches are extremely valuable for generating derivatives of natural products that cannot be obtained by classical semisynthetic methods. In the scope of the lecture, current activities and results of this project related to recombination mechanisms were also presented. The presented results attracted a lot of attention from the academic and industrial researchers, participating at the conference and represent a good basis for future collaborations of Acies Bio in industrial and basic research projects.	
Šifra	B.04 Vabljen predavanje		
Objavljeno v	Centre of Excellence for Integrated Approaches in Chemistry and Biology of Proteins; Immune response and host microbiota in disease development; 2012; Str. 22-23; Avtorji / Authors: Lukežič Tadeja, Podgoršek Ajda, Kosec Gregor, Blažič Marko, Goranovič Dušan, Polak Tomaž, Fujs Štefan, Horvat Jaka, Kuščer Enej, Jenko Branko, Stavber Stojan, Petković Hrvoje		
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci		
2.	COBISS ID	4288888	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Primarne metabolne poti za oskrbo z gradniki pri biosintezi FK506/520	
	ANG	Primary metabolic pathways providing building blocks in FK506/520 biosynthesis	
Opis	SLO	V letu 2013 je imel prof. dr. Hrvoje Petković vabljen predavanje na enem od najpomembnejših svetovnih kongresov na področju industrijske mikrobiologije "Genetics of Industrial Microorganisms GIM2013, ki se ga udeležujejo tako vrhunski akademski raziskovalci s tega področja kot tudi najpomembnejša biotehnoška podjetja. V predavanju je predstavil zelo uspešno delo projektne skupine na področju biosinteze FK506." Glavna tema so bili novi rezultati na področju oskrbe s substrati. V okviru predavanja smo predstavili tudi del rezultatov študije rekombinacijskih mehanizmov, ki potekajo v okviru tega projekta.	
	ANG	In 2013 dr. Hrvoje Petković held an invited lecture at one of the most important congresses in the field of industrial microbiology "Genetics of Industrial Microorganisms GIM2013, which gathers most prominent academic researchers from this field as well as most important companies	



		in the field of biotechnology. In his lecture dr. Petković presented new results in the field of FK506 biosynthesis, focusing on supply of different substrates. In the scope of the lecture, partially results of this project related to recombination mechanisms were also presented.
Šifra	B.04 Vabljen predavanje	
Objavljeno v	[Mexican Society for Biotechnology and Bioengineering]; XV National Congress of Biotechnology and Bioengineering & the 12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms [also] GIM-2013, June 23-28, 2013, Cancun, México; 2013; str. [1]; Avtorji / Authors: Petković Hrvoje, Kosec Gregor, Goranovič Dušan, Fujs Štefan, Blažič Marko, Horvat Jaka, Kuščer Enej	
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
3.	COBISS ID	3211343 Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Identifikacija domnevnega regulatornega proteina, ki je udeležen pri biosintezi eritromicina in diferenciaciji <i>Saccharopolyspora erythraea</i> , z omskimi pristopi
	ANG	Identification of putative regulatory protein, which is involved in the biosynthesis and differentiation in <i>Saccharopolyspora erythraea</i> , using proteomic approaches
Opis	SLO	V letu 2014 je imel prof. dr. Hrvoje Petković vabljen predavanje na 6. Kongresu Slovenskega mikrobiološkega društva, ki se ga udeležujejo slovenski raziskovalci s tega področja. V predavanju je predstavil delo projektne skupine na pripravi mutantov naravnega in industrijskega visokodonosnega seva <i>Saccharopolyspora erythraea</i> z inaktiviranim oziroma čezmerno izraženim regulatornim genom SACE_5599, ki smo jih pripravili na podlagi rezultatov WP3 in boljšega razumevanja homologne rekombinacije, ki smo ga pridobili v okviru tega projekta. Inaktivacija SACE_5599 v industrijskem sevu je zelo znižala donos eritromicina in intenziteto sporulacije. Nasprotno pa je čezmerno izražanje gena SACE_5599 v divjem tipu NRRL23338 povzročilo povečanje donosa eritromicina za 32%, kar nakazuje zelo tesno povezavo med biosintezo sekundarnih metabolitov in morfološko diferenciacijo pri tem organizmu.
	ANG	In 2014 dr. Hrvoje Petković held an invited lecture at 6. Congress of Slovenia microbiological society, which gathers all Slovenian academic researchers from this field. In his lecture dr. Petković presented work of project group on preparation of mutants of the native and industrial high producing strain of <i>Saccharopolyspora erythraea</i> with inactivated and overexpressed regulatory gene SACE_5599, which have been generated based on the results obtained in WP3 and better understanding of homologous recombination. Inactivation of SACE_5599 in the high-producing strain significantly reduced erythromycin yield, in addition to drastically decreasing sporulation intensity. In contrast, overexpression of SACE_5599 in the wild type NRRL23338 strain resulted in an increase of erythromycin yield by 32%, suggesting a very close relationship between secondary metabolite biosynthesis and morphological differentiation in this organism.
Šifra	B.04 Vabljen predavanje	
Objavljeno v	Veterinarska fakulteta; Knjiga povzetkov; 2014; Str. 60, Pr-21; Avtorji / Authors: Petković Hrvoje, Magdevska Vasilka, Kirm Benjamin, Tome Miha, Horvat Marinka, Karničar Katarina, Petek Marko, Vidmar Robert, Baebler Špela, Jamnik Polona, Fujs Štefan, Horvat Jaka, Fonovič Marko, Turk Boris, Gruden Kristina, Kosec Gregor	
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	

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

Acies Bio sodeluje tudi pri pedagoškem delu v sodelovanju z Biotehniško fakulteto. Metodološki pristopi, ki so bili razviti v tem raziskovalnem projektu, se koristijo tudi v pedagoškem procesu, in sicer v okviru laboratorijskih vaj za študente 2. bolonjske stopnje študija biotehnologije, in sicer pri predmetih Metabolni inženiring in Design bioproizvodov.

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

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

SLO

Primarni cilj tega projekta je bil bolje preučiti mehanizme genetske rekombinacije pri aktinomycetah, ki so slabo poznani in drugačni od večine poznanih bakterijskih rekombinacijskih in popravljalnih sistemov. Glede na življenjski cikel bakterij iz skupine aktinomycet in njihovega naravnega okolja ni tako nepričakovano, da so te vrste razvile različen rekombinacijski in DNA popravljalni sistem v primerjavi z ostalimi proteobakterijami. V tem projektu smo se osredotočili na sev *S. rapamycinicus*, ki proizvaja industrijsko pomemben immunosupresiv rapamicin, kjer smo podrobno preučili minimalni segment učinkovitega procesiranja (MEPS) in vlogo nekaterih rekombinacijskih genov. Tako pridobljeni podatki so nam bili v pomoč pri pripravi specifičnih genskih konstruktov za manipulacijo genske skupine za biosintezo rapamicina in pripravi gensko spremenjenih sevov *S. rapamycinicus*, ki proizvajajo nove analoge. Boljše razumevanje rekombinacijskih procesov bo imelo tudi doprinos področju biosinteznega inženiringa in aplikacij sintezne biologije v aktinomycetah, omogočilo pa bo tudi učinkovitejše manipulacije industrijskih in medicinsko pomembnih aktinomycet za proizvodnjo novih bioaktivnih spojin. V tem projektu smo preučevali zelo bazično biološko vprašanje tega edinstvenega rekombinacijskega mehanizma, ki so nam prinesli nova spoznanja in orodja s katerimi smo lahko razvili nove učinkovine s pomočjo t.i. sintezne biologije oziroma kombinatornega biosinteznega inženiringa.

ANG

The main goal of this project was to study in detail genetic recombination systems in actinomycetes, which are poorly understood and unlike most other known bacterial recombination and repair systems. Considering the actinomycete life cycles and their natural environment, it is not so unexpected that these species evolved recombination and DNA repair systems that are different compared to the ones in proteobacteria. In this project we focused on *S. rapamycinicus* strain, which produces industrially important immunosuppressant rapamycin. In this strain we studied in detail minimal efficient processing segments (MEPS) and the role of selected recombination genes. Based on the obtained results we prepared specific plasmid constructs for the rapamycin gene cluster manipulation and genetically modified *S. rapamycinicus* strains were obtained producing novel analogs. Better understanding of recombination processes will also be of great importance for advancing the field of synthetic biology and biosynthetic engineering in actinomycetes and will allow a more efficient manipulation of industrially and medically important strains for generation of novel bioactive compounds. In this project an investigation of a very basic biological subject of unique recombination mechanisms was performed, which bring us new powerful knowledge and tools, to generate novel drugs through »synthetic biology« or combinatorial biosynthetic engineering approaches.

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

SLO

Aktinomycete so industrijsko pomemben vir biološko aktivnih spojin, ki se uporabljajo v današnji medicini. Desetletja dolgi intenzivni programi odkrivanja novih učinkovin, ki so jih izvajale velike farmacevtske družbe, so te naravne vire bioaktivnih spojin že močno izčrpale, v veliki meri pa so izčrpani tudi pristopi pol-sintezne kemije za derivatizacijo naravnih/izoliranih spojin za razvoj novih analogov. Pristopa, kot sta sintezna biologija in biosintezni inženiring, predstavljata velik potencial za razvoj novih spojin. Vendar pa je ravno biosintezne genske skupine, ki vsebujejo gene za poliketid sintaze in ki za tovrstne pristope predstavljajo še največji potencial, izredno težko gensko manipulirati. Izboljšano razumevanje rekombinacijskih

mehanizmov teh biosinteznih genskih skupin je zato ključnega pomena za razvoj novih učinkovin in je pripeljalo do razvoja novih analogov bioaktivnih spojin že tekom tega projekta.

Tako so pridobljeni rezultati projekta neposredno uporabni za prijavitelja, biotehnoško podjetje Acies Bio. Ena izmed pomembnejših aktivnosti podjetja Acies Bio je razvoj novih bioaktivnih spojin s pomočjo biosinteznih in pol-sinteznih pristopov. Širša uporaba spoznanj in mehanizmov, pridobljenih tekom projekta, pa bo koristila tudi pri razvoju izboljšanih tehnologij za proizvodnjo sekundarnih metabolitov, ki jih Acies Bio razvija za domača in tuja farmacevtska podjetja. Izvedba projekta je potekala v biotehnološkem razvojno-raziskovalnem podjetju Acies Bio, na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani in Institutu Jožef Stefan ter drugimi mednarodnimi akademskimi partnerji. Tovrstno sodelovanje med akademijo in industrijo spodbuja izmenjavo izkušenj, znanja in dobre prakse, kar pa je izjemnega pomena za povečanje konkurenčnosti slovenske znanosti kot tudi podjetij. Sodelovanje na tem projektu je tako vključevalo tako domače kot tudi tuje raziskovalce in strokovnjake. Pridobljeno znanje tekom projekta pa se bo prenašalo tudi na študente univerzitetnih programov biotehnologije in mikrobiologije Biotehniške fakultete ter študente Instituta Jožef Stefan.

ANG

Actinomycetes are industrially important source of biological active compounds used in medicine today. However, decade-long intensive drug discovery programs by pharmaceutical corporations have largely exhausted accessible natural resources of bioactive compounds, and also the chemistry used in semi-synthetic derivatization of these compounds to produce novel analogs has been greatly exploited. Approaches such as synthetic biology and biosynthetic engineering present possibilities for development of novel compounds. However, biosynthetic gene clusters containing polyketide synthases, that present the greatest potential, are at the same time extremely difficult to manipulate genetically. Improved understanding of the mechanisms of recombination of these biosynthetic gene clusters is of crucial importance for generation of novel drug candidates, which allowed us to generate new analogues of bioactive compounds already in the course of this project.

The results obtained in this project are directly applicable to the applicant, biotechnology company Acies Bio. One of the important R&D activities of Acies Bio is development of novel bioactive compounds using biosynthetic and semi-synthetic approaches. The more widely applicable findings and mechanisms that were discovered in the course of this project will also be used in new approaches for development of improved production technologies for secondary metabolites, which are being developed by Acies Bio for Slovenian and foreign pharmaceutical companies. The execution of project was carried out in Acies Bio, Biotechnical faculty of the University of Ljubljana and Jožef Stefan Institute as well as in cooperation with international academic partners. Through such inter-sectorial collaboration with academia and industry we promoted the exchange of experiences, know-how and best practice flow, which is of utmost importance in order to increase the competitiveness of Slovenian science as well as the business sector. Collaborative work on this project engaged experts from local and foreign universities. Moreover, the knowledge gained by this project will also be transferred to the students of university programs of biotechnology and microbiology at the Biotechnical Faculty of the University of Ljubljana and Jožef Stefan Institute.

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

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

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.12</b>	<b>Izboljšanje obstoječe storitve</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.13</b>	<b>Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.14</b>	<b>Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.15</b>	<b>Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.16</b>	<b>Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.17</b>	<b>Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.18</b>	<b>Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.19</b>	<b>Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.20</b>	<b>Ustanovitev novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

<b>F.21</b>	<b>Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.22</b>	<b>Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.23</b>	<b>Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.24</b>	<b>Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.25</b>	<b>Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.26</b>	<b>Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.27</b>	<b>Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.28</b>	<b>Priprava/organizacija razstave</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.29</b>	<b>Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.30</b>	<b>Strokovna ocena stanja</b>	

	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.31</b>	<b>Razvoj standardov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.32</b>	<b>Mednarodni patent</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.33</b>	<b>Patent v Sloveniji</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.34</b>	<b>Svetovalna dejavnost</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.35</b>	<b>Drugo</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

**Komentar**

--

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

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
<b>G.01</b>	<b>Razvoj visokošolskega izobraževanja</b>					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.02</b>	<b>Gospodarski razvoj</b>					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.03</b>	<b>Tehnološki razvoj</b>					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.04</b>	<b>Družbeni razvoj</b>					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.06.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.05.</b>	<b>Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete</b>					
<b>G.06.</b>	<b>Varovanje okolja in trajnostni razvoj</b>					
<b>G.07</b>	<b>Razvoj družbene infrastrukture</b>					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.08.</b>	<b>Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva</b>					
<b>G.09.</b>	<b>Drugo:</b>					

**Komentar**

--

**12.Pomen raziskovanja za sofinancerje<sup>11</sup>**

--	--



	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 2014<sup>12</sup>

#### 13.1. Izjemni znanstveni dosežek

/

#### 13.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

/

## C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

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

### Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba  
raziskovalne organizacije:*

in

*vodja raziskovalnega projekta:*

ACIES BIO, biotehnoške raziskave  
in razvoj, d.o.o.

Štefan Fujs

**ŽIG**

Kraj in datum:

Ljubljana,

15.3.2015

**Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2015/192**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<sup>11</sup> Rubrike izpolnite / 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](#)

<sup>12</sup> Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2014 (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/2015 v1.00a

56-76-2F-09-01-C1-83-25-17-58-AA-D7-6E-A9-DE-E0-98-48-B6-60