

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2010-1/141

## ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	J1-9591
<b>Naslov projekta</b>	Molekularni mehanizmi toksičnosti listeriolizina
<b>Vodja projekta</b>	15686 Gregor Anderluh
<b>Tip projekta</b>	J Temeljni projekt
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	4.245
<b>Cenovni razred</b>	D
<b>Trajanje projekta</b>	01.2007 - 12.2009
<b>Nosilna raziskovalna organizacija</b>	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	2334 UNIVERZA V MARIBORU, Medicinska fakulteta
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	13. Splošni napredek znanja - RiR financiran iz drugih virov (ne iz splošnih univerzitetnih fondov - SUF)

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

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

### B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

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

Glavnino okužb pri človeku povzročajo po Gramu negativne bakterije. Le šest rodov Gram-pozitivnih bakterij je patogenih za človeka. Predstavnike po obliki uvrščamo med koke (*Streptococcus* in *Staphylococcus*) ter sporogene (*Bacillus* in *Clostridium*) in nesporogene (*Listeria* in *Corynebacterium*) palčke. Njihovi glavni virulenčni dejavniki so od holesterola odvisni citolizini (ang. cholesterol dependent cytolysins, CDC) (1). Bakterija *Listeria monocytogenes* je splošno prisotna in se nahaja v zemlji, vodi, človeških in živalskih iztrebkih, krmi za živino in različnih vrstah hrane. Infekcija se z okužene živali hitro prenese na celotno čredo goveda ali ovac in povzroča veliko gospodarsko škodo. V človeško telo se listerija največkrat vnese s hrano, najpogosteje preko mlečnih izdelkov, solat, paštet in dimljenih rib. *L. monocytogenes* je odporna na različne postopke konzerviranja hrane. Odporna je na visoke koncentracije soli, relativno nizke pH-vrednosti okolja, poleg tega pa se je sposobna razmnoževati tudi v zamrznjeni hrani. Uspešno

se razmnožuje tudi pri nizkih temperaturah med  $-18$  in  $10$  °C, zato je listerija eden od patogenih mikroorganizmov, ki povzročajo največ skrbi prehrabeni industriji (2,3). Listerioza je zelo resna bolezen in *L. monocytogenes* je danes eden izmed mikroorganizmov, katerih okužba se konča z visoko smrtnostjo, saj navkljub zgodnji diagnostiki in zdravljenju z antibiotiki umre 20-30 % pacientov. Listerija prehaja placentalno bariero in lahko pride v zarodek, kjer povzroči abortus ali pa sproži prezgodnje rojstvo. Pri odraslih se listerioza v 55–70 % primerov kaže kot vnetje centralnega živčnega sistema, kjer povzroča meningoencefalitis. *L. monocytogenes* je fakultativno intracelularna bakterija, ki se lahko razmnožuje v celicah vretenčarjev (2). Ob vstopu v gostiteljsko celico se bakterija znajde v fagolizosomu, kjer je kisel pH, prisotni pa so tudi hidrolitični encimi. Bakteriji preživetje omogoči citolitični protein listeriolizin (LLO), ki v membrani fagolizosoma ustvari pore, ki povzročijo izhajanje protonov in hidrolitičnih encimov v citosol. V citosolu se listerija začne razmnoževati in zatem okuži sosednje celice, ne da bi pri tem prišla v stik z imunsko obrambo gostitelja. LLO je ključen za pobeg listerije iz fagolizosoma v citosol in je njen najbolj pomemben virulenčni faktor. LLO je član CDC proteinske družine, ki jo najdemo predvsem pri Gram-pozitivnih bakterijah. LLO je posebej v družini CDC, ker ima optimum aktivnosti v kislem pH območju (1,4,5). Pomembnost LLO za patogenost listerije se je pokazala, ko so ugotovili, da mutirani sevi, ki so bili brez LLO, niso bili virulenčni in sposobni inducirati zaščitne imunosti pri miših (6).

Razumevanje patogenih mehanizmov *L. monocytogenes* je torej ena od prioritet v biomedicinskih raziskavah. *L. monocytogenes* je tudi modelni sistem za študije znotrajceličnega parazitizma, saj je dobro proučena in omogoča enostavne laboratorijske manipulacije. **Glavni cilj tega projekta je bil razložiti nenavadna obnašanja LLO na molekularni ravni.** Predvsem smo želeli opisati dele LLO, ki so odgovorni za njegove funkcionalne posebnosti, npr. specifičnost za holesterol ali pH odvisnost. Delo je potekalo na Katedri za biokemijo, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, UL in na Zavodu za transfuzijsko medicino v Mariboru. Del študij smo opravili z obiski laboratorijev kolegov v tujini, kot je predstavljeno spodaj. En od pomembnih metodoloških pristopov, ki smo ga uporabili je površinska plazmonska resonanca (ang. surface plasmon resonance; SPR), ki je poglobljena eksperimentalna tehnika v skupini prijavitelja (delo je potekalo v okviru Infrastrukturnega centra za površinsko plazmonske resonanco; IC-SPR). Tekom projekta nam je uspelo pridobiti veliko izkušenj pri študiju molekularnih interakcij, npr. proteini-membrane, in to znanje smo uporabili kasneje tudi pri drugih študijah. Glavni rezultati projekta so prikazani v naslednjih sklopih:

1. Izražanje LLO v heterolognem ekspresijskem sistemu
2. Opredelitev funkcionalnih in strukturnih lastnosti LLO
3. Agregacija LLO
4. Mutageneza LLO
5. Lastnosti LLO iz izolatov *L. monocytogenes* humanih vzorcev
6. Uporaba CDC v biofizikalnih in biokemijskih študijah

### 1. Izražanje LLO v heterolognem ekspresijskem sistemu

Pričeli smo s pripravo heterolognega ekspresijskega sistema za pripravo funkcionalnega LLO v bakteriji *Escherichia coli*. LLO smo uspeli izraziti kot fuzijski protein z glutation-S-transferazo. Uspelo nam je pripraviti znatne količine čistega LLO, ki je ohranil visoko litično aktivnost in od holesterola odvisno vezavo na lipidne membrane. V istem sistemu smo pripravili tudi skrajšane različice LLO (domene 1-3, D1-3, in domeno 4, D4), katere smo uporabili pri raziskavah in so tudi služile kot kontrolni proteini. Z delno očiščenimi proteini smo v laboratoriju prof. Siegfried-a Weissa, z Molecular Immunology, The Helmholtz Centre for Infection Research, Nemčija, ugotovili, da se D1-3 veže na membrane makrofagov (celična linija J774), ni pa ta konstrukt izkazoval litične aktivnosti, niti ni inhibiral vezave nativnega LLO. Zaradi tega kasneje s temi konstrukti nismo več delali poskusov. Zaradi zapletenega postopka pridobivanja rekombinantnega LLO (postopek je vključeval cepitev fuzijskega proteina in dodatne kromatografske pristope) smo pripravili alternativni ekspresijski sistem, ki je omogočal izražanje LLO, ki je imel na N-terminalnem koncu histidinski repek. Tudi to varianto smo uspeli očistiti, pri tem pa smo uporabili bolj enostaven postopek čiščenja. V istem ekspresijskem sistemu smo pripravili tudi perfringolizin O (PFO), homolog LLO iz bakterije *Clostridium perfringens*. PFO je en od najbolj študiranih CDC in nam je služil kot kontrolni protein za pH-odvisno stabilnost, aktivnost in druge efekte, ki smo jih opazili pri LLO, saj naj bi bil stabilen pri pogojih, pri katerih smo izvajali poskuse.

### 2. Opredelitev funkcionalnih in strukturnih lastnosti LLO

Zgradbo in stabilnost očiščenega listeriolizina (LLO) smo opredelili s spektroskopskimi metodami, predvsem z merjenjem fluorescence triptofanov in CD-spektroskopijo. CD spektroskopijo smo izvedli v laboratoriju prof. Jeremy-ja H. Lakey-a (University of Newcastle upon Tyne, Newcastle, Velika Britanija). Primerjali smo, tudi v spodaj opisanih študijah, obnašanje LLO pri pH vrednosti, ki jo najdemo v fagolizosomih in je optimalna za delovanje toksina (pH 5.5) in pri fizioloških pH vrednostih (pH 7.4). Ugotovili smo, da se struktura LLO pri sobni temperaturi bistveno ne spreminja v pufrih z različnimi pH-vrednostmi. To je bilo presenetljivo odkritje, saj je znano, da je delovanje LLO odvisno od pH vrednosti in je bolje v kislem pH. Preverili smo tudi hemolitsko aktivnost LLO in pokazali, da je pri višjem pH (pH 7.4) le malenkost nižja kot pri pH optimalnem za

delovanje proteina (pH 5.5). Z metodo planarnih lipidnih membran smo preverili tudi sposobnost tvorbe pore LLO pri različnih pH vrednostih. Te poskuse smo opravili v laboratoriju dr. Maura Dalla Serra (CNR-Istituto di Biofisica, Trento, Italija). Uporabili smo membrane iz lipida fosfatidilholina, ki smo mu dodali 20 molskih % holesterola. V nasprotju s pričakovanji se je izkazalo, da LLO lahko tvori pore pri obeh pH vrednostih, čeprav je bilo por pri nižjem pH več. Glede na elektrofiziološke lastnosti so bile pore podobne pri pH 5.5 ali 7.5. S študijami s planarnimi lipidnimi membranami nadaljujemo v okviru dvostranskega sodelovanja, kjer primerjamo tvorbo por različnih CDC in drugih sorodnih proteinov, npr. človeškega perforina.

Preliminarne študije interakcije LLO z lipidnimi membranami so pokazale, da sta za vezavo na membrano pomembna pH in koncentracija holesterola (7). Te študije smo nadgradili z eksperimentom, kjer smo pokazali, da se pri pH vrednosti 8.5 LLO stabilno veže na membrane šele pri 40 molskih % holesterola. Pokazali smo tudi, da monoklonsko protitelo M344, ki se veže na domeno 1 v LLO, prepreči agregacijo LLO na lipidni membrani. Ta eksperiment je lep primer uporabe metode SPR pri študiju funkcionalnih lastnosti proteinov, ki reagirajo z membranami.

Strukturo LLO smo spremljali tudi z analitskim ultracentrifugiranjem v laboratoriju dr. Roberta Gilberta (Univerza v Oxfordu, Velika Britanija) in elektronsko mikroskopijo. Z obema pristopoma smo pokazali, da je LLO pri obeh pH vrednostih v topni obliki, t.j. neagregiran. Opazili pa smo prisotnost dimerov pri nižji pH vrednosti. V sodelovanju z dr. Gilbertom smo iz slik elektronske mikroskopije analizirali strukturo dimerov LLO pri pH 5.5 in ugotovili, da do povezovanja pride preko C-terminalne domene 4. To je presenetljivo odkritje, saj so do zdaj takšna oblika tvorbe agregatov pri LLO ni bila opisana. Iz tega sklopa študij smo pripravili članek, ki ga nameravamo poslati v objavo v naslednjih nekaj mesecih.

### 3. Agregacija LLO

Z različnimi spektroskopskimi pristopi smo tudi preverili stabilnost LLO in ugotovili, da je nestabilen protein in da pri višjih temperaturah agregira. Preverili smo tudi različne faktorje, ki vplivajo na agregacijo LLO in ugotovili, da je odvisna od pH-vrednosti raztopine. Tako pri fizioloških vrednostih (npr. pH 7.5) LLO agregira že pri 37 °C. Agregacija je ireverzibilna, saj protein izgubi vso hemolitsko aktivnost. Z metodo SPR smo pokazali, da agregati niso sposobni vezave na lipidne membrane. Elektronska mikroskopija je pokazala, da so agregati LLO veliki 0,5–5 µm in da so nestrukturirani. S tem smo ovrgli hipotezo Viala in sod. (7), ki so z uporabo fluorescenčno označenih protiteles *in vivo* opazovali agregate LLO-ubikvitin velikosti ~2 µm in predpostavili, da so agregati LLO podobni proteinskemu agregatom stefina, α-sinukleina, β-amiloida ali Tau-proteina, ki nastajajo pri nevrodegenerativnih boleznih. Določili smo tudi kinetiko agregacije in ugotovili, da je zelo hitra in poteče v nekaj minutah. To je vsekakor hitreje kot proteolitska cepitev LLO, ki je bila predlagana kot glavna pot inaktivacije v citoplazmi evkariontske celice (8).

Po sprostitvi iz fagolizosoma LLO v citoplazmi gostiteljske celice hitro agregira, kar je ključno za preživetje listerije. Celico bi namreč lahko poškodoval tako, da bi tvoril pore v različnih celičnih membranah. Ko so LLO zamenjali z drugimi člani CDC je prišlo do pobega bakterij iz fagosomov, bakterije so preživele v citoplazmi makrofagov *in vitro*, niso bile pa sposobne preživetja *in vivo*. (9). Preprečitev agregacije LLO bi tako lahko predstavljal možen način za preprečitev razmnoževanja listerij v gostiteljskih celicah. Naš naslednji cilj je bil poiskati morebitne inhibitorje agregacije LLO, ki bi omogočili stabilnost in aktivnost LLO v razmerah, ki vladajo v citosolu sesalskih celic (temperatura 37 °C, pH 7.4). LLO smo inkubirali v prisotnosti kaotropov, kozmotropov, polietilenglikolov, glicerola, ogljikovih hidratov in detergentov. Polietilenglikoli (PEG) različnih molekularnih mas in glicerol, ki se navadno uporabljajo za stabilizacijo proteinov *in vivo*, niso pokazali bistvenega prispevka k stabilizaciji in ohranitvi hemolitične aktivnosti LLO. Tudi kozmotropi in kaotropi z izjemo NaCl niso omogočili stabilizacije LLO. Kot najučinkovitejši inhibitorji agregacije, ki so omogočili stabilnost LLO pri višjih temperaturah, so bili ogljikovi hidrati. Opazili smo, da inhibicija agregacije pada v vrstnem redu: rafinoza>saharoz>fruktoza>glukoza, inhibicija agregacije pa narašča z višanjem koncentracije saharida. Ugotovili smo, da so ogljikovi hidrati pri zaviranju agregacije LLO zelo učinkoviti, celo do 100-odstotno. Vendar pa tako visoke koncentracije sladkorjev ne moremo doseči v organizmu sesalcev in zato fiziološko niso relevantne. Možna aplikacija bi bila pri shranjevanju pripravkov LLO in njegovih nutrijnih različic za funkcionalne in druge študije. Metodologijo, ki smo jo razvili bi bilo sorazmerno enostavno prilagoditi za presejanje drugih potencialno uporabnih majhnih molekul, npr. knjižnic organskih molekul, kar nameravamo raziskati v prihodnosti.

### 4. Mutageneza LLO

Na podlagi 3D struktur homologov (PFO in intermedilizin) smo pripravili model strukture LLO. Na podlagi modela strukture in poravnave vseh znanih CDC smo določili nekatere aminokisliline, ki bi lahko imele pomembno vlogo pri vezavi na membrane in na holesterol. Predvsem smo se omejili na aminokisliline histidine, ki imajo pKa v rahlo kislem (pKa ~ 6) in bi lahko bili pomembni za opisano pH odvisnost LLO. Na mestu 311 v molekuli LLO imajo samo trije predstavniki CDC

histidin. Vsi trije so predstavniki listerij in tudi edini z odvisnostjo od nizkega pH. Tako smo želeli preveriti hipotezo, da je His311 pomemben za učinkovito vezavo na lipidne membrane. Pri tem nas je na vlogo histidinov napotila tudi študija, kjer smo histidine v LLO kemijsko modificirali z dietil pirokarbonatom in pokazali, da po modifikaciji močno pade hemolitska aktivnost in da se zniža temperatura pri kateri nastajajo agregati LLO.

V bakteriji *E. coli* smo zato izrazili in očistili šest izogenih mutiranih različic bakterijskega toksina, kjer je imela vsaka eno zamenjavo histidina v alanin (na mestih 57, 79, 311, 423, 450 in 463 peptidnega zaporedja LLO). Poleg tega smo pripravili tudi mutanto, ki je imela na mestu 311 lizin namesto histidina. Vse mutante smo pripravili v čisti obliki in jim opredelili hemolitsko aktivnost, preverili specifičnost za lipid holesterol in preverili, kako mutacija vpliva na agregacijo. Rezultati so pokazali, da so mutacije vplivale na hemolitsko aktivnost in sposobnost proteina za vezavo na lipidne membrane. Vse mutirane variante so izkazale holesterolno specifičnost, razen mutante H423A, ki se je na membrane vezala veliko slabše kot ostale mutante ali divji tip proteina, kar nakazuje na njeno pomembno vlogo za interakcije proteina z membranami ali celo s holesterolom. Izkazalo se je, da je bila mutanta H311A še najmanj aktivna in ni kazala posebne afinitete do lipidnih membran. Rezultati nakazujejo na pomembno vlogo ostanka na mestu 311, ki je v neposredni bližini funkcionalnega mesta molekule in da regija okoli ostanka na mestu 423 vpliva na vezavo na lipidne membrane.

### 5. Lastnosti LLO iz izolatov *L. monocytogenes* humanih vzorcev

Zbrali smo izolate *L. monocytogenes* iz humanih vzorcev in vzorcev hrane iz Slovenije in tujine ter optimizirali reakcijo pomnoževanja gena za LLO pri izoliranih sevih. Pomnoženim genom smo določili nukleotidno zaporedje in določili mesta mutacij, kjer se razlikujejo od LLO. Na podlagi bioinformatične analize smo zaključili, da mutacije pri izoliranih sevih ne bi bistveno spremenile delovanja LLO. Zbirko bomo v prihodnosti uporabili za testiranje variabilnosti v genu za LLO pri naravni populaciji listerij z namenom ugotavljanja ali so v genu za LLO predeli, ki so bolj podvrženi mutacijam ter ali so prisotne mutacije v predelih molekule, ki so funkcionalno povezani z vključevanjem v membrano in tvorbo por.

### 6. Uporaba CDC v biofizikalnih in biokemijskih študijah

Ker je holesterol edini membranski receptor za CDC, bi bilo moč te proteine uporabiti kot sonde za zaznavanje holesterola in urejenih lipidnih domen z visoko vsebnostjo holesterola v membranah živalskih celic. V naši raziskavi smo želeli razviti občutljivo metodo za zaznavanje holesterola v membranah na osnovi metode SPR, ki smo jo razvili tekom projekta. Pokazali smo, da se homolog LLO streptolizin O, iz bakterije *Streptococcus pyogenes*, ne veže na membrane, ki ne vsebujejo holesterola. Popolna ekstrakcija holesterola iz membrane je onemogočila vezavo streptolizina. Predvidevamo, da lahko od holesterola odvisne citolizine uporabimo kot sonde za zaznavanje holesterola v lipidnih membranah. Z metodo SPR lahko natančneje opišemo parametre vezave in ovrednotimo vsebnost holesterola v membrani, podobno kot so to naredili v dosedanjih študijah z elektronsko in fluorescenčno mikroskopijo.

### Reference

1. Tweten, R. K. 2005. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infect. Immun.* 73: 6199-6209.
2. Vazquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft. 2001. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 584-640.
3. Ramaswamy, V., V. M. Cresence, J. S. Rejitha, M. U. Lekshmi, K. S. Dharsana, S. P. Prasad, and H. M. Vijila. 2007. Listeria--review of epidemiology and pathogenesis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 40: 4-13.
4. Beauregard, K. E., K. D. Lee, R. J. Collier, and J. A. Swanson. 1997. pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 186: 1159-1163.
5. Glomski, I. J., M. M. Gedde, A. W. Tsang, J. A. Swanson, and D. A. Portnoy. 2002. The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J. Cell Biol.* 156: 1029-1038.
6. Jones, S., K. Preiter, and D. A. Portnoy. 1996. Conversion of an extracellular cytolysin into a phagosome-specific lysin which supports the growth of an intracellular pathogen. *Mol. Microbiol.* 21: 1219-1225.
7. Bavdek, A. 2005. Vezava listeriolizina na podprte lipidne membrane : diplomska naloga : univerzitetni študij. Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.
8. Viala, J. P., S. N. Mochevova, N. Meyer-Morse, and D. A. Portnoy. 2008. A bacterial pore-forming toxin forms aggregates in cells that resemble those associated with neurodegenerative diseases. *Cell Microbiol.* 10: 985-993.
9. Schnupf, P., D. A. Portnoy, and A. L. Decatur. 2006. Phosphorylation, ubiquitination and degradation of listeriolysin O in mammalian cells: role of the PEST-like sequence. *Cell Microbiol.* 8: 353-364.

10. Jones, S., K. Preiter, and D. A. Portnoy. 1996. Conversion of an extracellular cytolysin into a phagosome-specific lysin which supports the growth of an intracellular pathogen. *Mol. Microbiol.* 21: 1219-1225.

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

Ocenjujemo, da smo raziskovalne cilje izpolnili. Uspelo nam je razviti ekspresijski sistem za produkcijo funkcionalnih predstavnikov družine CDC, ker nam bo v prihodnosti olajšalo delo pri študiju njihovega mehanizma delovanja. V tem sistemu pripravljena LLO in PFO sta ohranila svoje funkcionalne posebnosti (npr. pH specifičnost, vezavo na lipidne membrane v prisotnosti holesterola). Opredelili smo funkcionalne lastnosti rekombinatnega LLO in opisali njegovo hemolitsko aktivnost in aktivnost na planarnih lipidnih membranah. Pokazali smo tudi, kateri aminokislinski ostanki so odgovorni za vezavo na lipidne membrane.

Posebej natančno smo opredelili, kateri faktorji vplivajo na stabilnost LLO in nato študijo razširili po nepričakovano ugotovitvi, da je kinetika agregacija LLO hitra, ireverzibilna in verjetno poglaviti razlog za inaktivacijo toksina v celici. To je verjetno najbolj pomemben rezultat cele študije. Na tej osnovi bi v prihodnosti radi razvili aplikacije v smeri iskanja inhibitorjev agregacije. Tekom tega projekta pa smo razvili tudi sistem, ki nam omogoča hitre presejalne teste in s katerim smo pokazali, da na agregacijo vplivajo sladkorji v visokih koncentracijah. Isti sistem bomo uporabili tudi v prihodnjih študijah. Pokazali smo tudi, da se predstavnike CDC lahko uporabi pri študiju strukture lipidnih membran, ki vsebujejo holesterol. Ekspresijski sistem, ki smo ga razvili in poznavanje delovanja in strukture predstavnikov CDC omogočata pripravo različice CDC, ki bi jo lahko uporabili kot molekulska orodje v celični biologiji.

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

Tekom izvajanja raziskovalnega projekta ni bilo večjih sprememb. V raziskovanje smo dodatno vključili raziskovanje lastnosti agregiranih oblik listeriolizina in kako agregacijo molekul listeriolizina preprečiti z majhnimi molekulami. Predstavnika CDC smo tudi uporabili za določanje holesterola v lipidni membrani.

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

		Znanstveni rezultat	
1.	Naslov	SLO	Vloga koncentracije holesterola in pH pri vezavi LLO na lipidne membrane
		ANG	Role of cholesterol and pH on the binding of LLO to lipid membranes
	Opis	SLO	Opisali smo preliminarne študije vezave LLO na lipidne membrane in preverili kateri faktorji omogočajo stabilno vezavo. Uporabili smo različne eksperimentalne pristope, metodo površinske plazmonske resonance, vgradnjo v lipidne monosloje, izhajanje fluorescenčnih markerjev iz lipidnih veziklov, itn. Pokazali smo, da je za stabilno vezavo v membrane potrebna prazna vrednost holesterola in da se LLO na membrane veže tudi pri suboptimalnem fiziološkem pH.
		ANG	We published a preliminary study, which describes binding of LLO to lipid membranes. We also assessed factors that influence the binding. We employed various biophysical approaches such as surface plasmon resonance, lipid monolayers, fluorescence spectroscopy etc. We show that there is a limiting concentration of cholesterol that allows stable binding to the lipid membranes and that LLO can bind to lipid membranes even at suboptimal but physiological pH.
	Objavljeno v	BAVDEK, Andrej, GEKARA, Nelson O., PRISELAC, Dragan, GUTIERREZ-AGUIRRE, Ion, DARJI, Ayub, CHAKRABORTY, Trinad, MAČEK, Peter, LAKEY, Jeremy H., WEISS, Siegfried, ANDERLUH, Gregor. Sterol and pH interdependence in the binding, oligomerization, and pore formation of listeriolysin O. <i>Biochemistry</i> (Easton). [Print ed.], 2007, letn. 46, št. 14, str. 4425-4437. [COBISS.SI-ID 22569689]	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
COBISS.SI-ID	22569689		
2.	Naslov	SLO	Uporaba metode površinske plazmonske resonance za spremljanje ekstrakcije holesterola iz lipidnih membran
		ANG	Use of surface plasmon resonance to study extraction of cholesterol from the

		lipid membranes
Opis	SLO	Metodo površinske plazmonske resonance smo uporabili za spremljanje kinetike ekstrakcije holesterola iz membran s pomočjo molekule ciklodekstrina. V članku smo razvili metodološki pristop in uporabili vezavo CDC streptolizina O kot dokaz, da je membrana po delovanju ciklodekstrina brez holesterola.
	ANG	The method of surface plasmon resonance was used to monitor kinetics of cholesterol extraction by cyclodextrin. In this paper we developed the methods and used CDC streptolysin O as a proof that the membrane is devoid of cholesterol after treatment with cyclodextrin.
Objavljeno v		PODLESNIK BESENIČAR, Mojca, BAVDEK, Andrej, KLADNIK, Aleš, MAČEK, Peter, ANDERLUH, Gregor. Kinetics of cholesterol extraction from lipid membranes by methyl-beta-cyclodextrin : a surface plasmon resonance approach. Biochim. biophys. acta, Biomembr.. [Print ed.], 2008, vol. 1778, str. 175-184. [COBISS.SI-ID 1826895]
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
COBISS.SI-ID		1826895
3. Naslov	SLO	Primerjava strukture in delovanja različnih proteinov, ki v membranah celic tvorijo pore
	ANG	Comparison of structure and mode of action of proteins that form pores in cell membranes
Opis	SLO	V prestižni biokemijski reviji Trends in Biochemical Sciences smo opisali strukturne vzorce in način delovanja proteinov, ki tvorijo pore. Listeriolizin je od holesterola odvisen citolizin, za katere se je izkazalo, da imajo strukturo podobno nekaterim pomembnim proteinom imunskega sistema, npr. proteinom komplementa ali perforinu. Razumevanje delovanja LLO bo tako prispevalo tudi k razumevanju delovanja teh proteinov.
	ANG	We published a comparison of structure and mode of action of proteins that form pores in cellular membranes. Listeriolysin is a cholesterol dependent cytolysin, which share similar structure with MACPF domains from complement and perforin. Understanding of LLO and CDC mechanism of pore formation will contribute to understanding of pore formation by important proteins from the immune system.
Objavljeno v		ANDERLUH, Gregor, LAKEY, Jeremy H. Disparate proteins use similar architectures to damage membranes. Trends biochem. sci. (Regul. ed.). [Regular ed.], 2008, issue 10, vol. 33, str. 482-490. [COBISS.SI-ID 1893967]
Tipologija		1.02 Pregledni znanstveni članek
COBISS.SI-ID		1893967
4. Naslov	SLO	Pregled metod za spremljanje ekstrakcije holesterola iz lipidnih membran s poudarkom na metodi površinske plazmonske resonance
	ANG	Overview of methods for monitoring extraction of cholesterol from the lipid membranes with an emphasis on surface plasmon resonance methodology
Opis	SLO	Holesterol ima pomembno strukturno vlogo v lipidnih membranah. V tem poglavju opišemo, kako lahko spremljamo ekstrakcijo holesterola iz lipidnih membran z različnimi biofizikalnimi pristopi. Še posebej opišemo pristop površinske plazmonske resonance, ki smo ga razvili tekom tega projekta.
	ANG	Cholesterol has an important structural role in lipid membranes. Here we describe how it is possible to monitor its extraction from lipid membranes by various biophysical methods. In particular we describe surface plasmon resonance approach, which was developed during this project.
Objavljeno v		BAVDEK, A., BESENIČAR, M., MAČEK, P., ANDERLUH, G. (2010): Extraction of cholesterol from lipid membranes by methyl-beta-cyclodextrin: A surface plasmon resonance approach. V: JIE, H. (ur.). Cyclodextrins: Chemistry and Physics. Transworld Research Network, Kerala, India. ISBN: 978-81-7895, in press.
Tipologija		1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji
COBISS.SI-ID		0
5. Naslov	SLO	Pregled uporabe metode površinske plazmonske resonance
	ANG	Overview of surface plasmon resonance methodology
Opis	SLO	V tem poglavju opišemo uporabo površinske plazmonske resonance v bazičnih znanostih in analitskih pristopih. Podamo kratke teoretične osnove, na kakšen način potekajo meritve in kako se metodo uporablja za spremljanje makromolekulskih interakcij.

	ANG	Here we describe the use of surface plasmon resonance in basic sciences and various analytical approaches. We provide brief theoretical basis, how measurements are performed and can this method be used to study molecular interactions.
Objavljeno v		BAVDEK, Andrej, ANDERLUH, Gregor. Uporaba površinske plazmonske resonance v bazičnih znanostih in analitiki. V: BERDEN ZRIMEC, Maja (ur.), BARLIČ-MAGANJA, Darja (ur.). Biološki detekcijski sistemi v veterini in mikrobiologiji. 1. izd. Grosuplje: Inštitut za fizikalno biologijo, 2007, str. 87-94. [COBISS.SI-ID 23308761]
Tipologija		1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji
COBISS.SI-ID		23308761

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

Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat		
1.	Naslov	SLO Vabljen predavanje o merjenju interakcij proteinov z metodo površinske plazmonske resonance
		ANG Invited lecture on measurements of protein-membrane interactions by surface plasmon resonance
Opis	SLO	Proizvajalec aparatov Biacore nas je povabil, da predstavimo naše delo v okviru Infrastrukturnega centra za površinsko plazmonske resonanco. V delu smo predstavili tudi študije z listeriolizinom.
	ANG	The most important manufacturer of surface plasmon resonance apparatuses invited us to present our approaches in studies of protein-membrane interactions. We presented also work done with listeriolysin.
Šifra		B.04 Vabljen predavanje
Objavljeno v		ANDERLUH, Gregor. Sensor Chip L1: Beyond protein-membrane interactions. V: Biacore Interaction Days: France 2008, Nov. 20-21, Bordeaux, France : Abstract booklet. Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2008, str. 12.
Tipologija		1.13 Objavljeni povzetek strokovnega prispevka na konferenci
COBISS.SI-ID		25301209
2.	Naslov	SLO Članstvo v uredniških odborih revij Analytical Biochemistry
		ANG Membership in the Editorial Boards of Analytical Biochemistry
Opis	SLO	Dr. Gregor Anderluh je član uredniškega odbora mednarodne znanstvene revije Analytical Biochemistry (ISSN: 0003-2697). Faktor vpliva revije (2008) je 3.088. Je med vodilnimi revijami na področju analize kemije (14/70) in biokemijske metodike (21/65).
	ANG	Dr. Gregor Anderluh is a member of the Editorial Board of Analytical Biochemistry (ISSN: 0003-2697) which impact factor (2008) is 3.088. AB is one of the leading journals in the fields of analytical chemistry (14/70) and biochemical methodology (21/65).
Šifra		C.04 Uredništvo mednarodne revije
Objavljeno v		Analytical Biochemistry. Gregor Anderluh (član uredniškega odbora). [Print ed.]. : Elsevier: ACADEMIC PRESS, 1960-. ISSN: 0003-2697. ( <a href="http://www.elsevier.com/wps/find/journaleditorialboard.cws_home/622781/editorialboard">http://www.elsevier.com/wps/find/journaleditorialboard.cws_home/622781/editorialboard</a> )
Tipologija		4.00 Sekundarno avtorstvo
COBISS.SI-ID		0
3.	Naslov	SLO Infastrukturalni center za površinsko plazmonske resonanco
		ANG Infrastructural centre for surface plasmon resonance
Opis	SLO	Organizacija in vodenje nacionalnega infastrukturalnega centra za površinsko plazmonske resonanco za študij kinetike medmolekulskih interakcij v realnem času. Center je sestavni del Mreže raziskovalnih infastrukturalnih centrov Univerze v Ljubljani-MRIC UL (več o centru na: <a href="http://www.bf.uni-lj.si/bi/biokemija/SPR/SPR.html">http://www.bf.uni-lj.si/bi/biokemija/SPR/SPR.html</a> ).
	ANG	Organization and leading of the national infrastructural centre for surface plasmon resonance aimed to study the kinetics of molecular interactions ( <a href="http://web.bf.uni-lj.si/bi/sprcenter/indexeng.html">http://web.bf.uni-lj.si/bi/sprcenter/indexeng.html</a> ). The centre is an integral part of the network of infrastructural centres at the University of Ljubljana.
Šifra		D.07 Vodenje centra/laboratorija

	Objavljeno v	<a href="http://www.bf.uni-lj.si/bi/biokemija/SPR/SPR.html">http://www.bf.uni-lj.si/bi/biokemija/SPR/SPR.html</a>
	Tipologija	3.25 Druga izvedena dela
	COBISS.SI-ID	0
4.	Naslov	SLO Organizacija uporabniških dnevov Biacore
		ANG Organization of Biacore user meeting
	Opis	SLO 25. in 26. 11.2009 smo v sodelovanju z General Electrics Healthcare in podjetjem HVD organizirali uporabniške dneve Biacore in MicroCal in GE dneve inovacij sistema Åkta. Strokovnjaki različnih področij so predstavili nekatere nove pristope na področju merjenja makromolekularnih interakcij in kromatografskih in drugih pristopov. Prvega tovrstnega dogodka pri nas se je v obeh dneh udeležilo preko 80 raziskovalcev iz Slovenije, Italije, Hrvaške, Madžarske, Poljske in Grčije.
		ANG We organised Biacore and MicroCal user meetings, together with companies General Electrics Healthcare and HVD (25., 26. 11. 2009 in Ljubljana). New approaches on measurements macromolecular interactions were presented, but also chromatographic and other biochemical approaches. This was first such event in Slovenia and more than 80 researchers from Slovenia, Italy, Croatia, Hungary, Poland and Greece participated.
	Šifra	B.01 Organizator znanstvenega srečanja
	Objavljeno v	<a href="http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/lifesciencedayslovenia2009">http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/lifesciencedayslovenia2009</a>
Tipologija	3.25 Druga izvedena dela	
	COBISS.SI-ID	0
5.	Naslov	SLO Upravljanje in razvoj raziskovalnega dela
		ANG Managing and development of research work
	Opis	SLO Član projektne skupine je bil več let predstojnik Katedre za biokemijo, vodja raziskovalne skupine na Katedri za biokemijo, bil je dekan Biotehniške fakultete v letih 2002-2004, od leta 2005-2009 pa prorektor Univerze v Ljubljani zadolžen za znanstveno raziskovalno dejavnost.
		ANG Member of a project group has been a head of a Chair for Biochemistry and head of a research group at the same chair for many years. He was also a dean of Biotechnical faculty in years 2002-2004 and since 2005 is a vice-chancellor of University of Ljubljana.
	Šifra	D.08 Upravljanje in razvoj raziskovalnega dela
	Objavljeno v	<a href="http://www.uni-lj.si/medijsko_sredisce/vodstvo_univerze/prorektor_prof_dr_peter_macek.aspx">http://www.uni-lj.si/medijsko_sredisce/vodstvo_univerze/prorektor_prof_dr_peter_macek.aspx</a>
Tipologija	3.25 Druga izvedena dela	
	COBISS.SI-ID	0

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

Sodelovali smo pri študiju interakcije proteaznega inhibitorja stefina B in amiloidnega peptida beta. Uporabili smo metodo površinske plazmonske resonance in opisali pri katerih pogojih se vežeta. Rezultati so objavljeni v prestižni biokemijski reviji Journal of Biological Chemistry (ŠKERGET, Katja, TALER-VERČIČ, Ajda, BAVDEK, Andrej, HODNIK, Vesna, ČERU, Slavko, TUŠEK-ŽNIDARIČ, Magda, POMPE NOVAK, Maruša, KOPITAR-JERALA, Nataša, TURK, Vito, ANDERLUH, Gregor, ŽEROVNIK, Eva. Interaction between oligomers of stefin B and amyloid-beta in vitro and in cells. J Biol Chem, 2010, vol. 285, no. 5, str. 3201-3210. [COBISS.SI-ID 2152783])

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

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

SLO

Listeriolizin je glavni virulenčni dejavnik patogene bakterije *Listeria monocytogenes*, ki



povzroča resno bolezen listeriozo. Listeriolizin je član proteinske družine od holesterola odvisnih citolizinov, ki v membranah tarčnih celic tvorijo velike pore. Listeriolizin se od drugih članov družine razlikuje po tem, da bolje deluje v kislem pH območju, kar omogoča pobeg bakterije iz fagolizosoma v citosol, kjer se lahko razmnožuje in širi v sosednje celice. Raziskovalni projekt nam je omogočil opis odvisnosti listeriolizina od pH in kako je delovanje listeriolizina kontrolirano v citosolu gostiteljske celice. Pokazali smo, da pH ne vpliva bistveno na aktivnost proteina, saj je hemolitska aktivnost in sposobnost tvorbe por ohranjena pri fiziološkem pH. Listeriolizin postane neaktiven šele po nekajminutni inkubaciji pri višji temperaturi, nad 37 °C, medtem ko pri nižjem pH ne agregira. Agregacija listeriolizina, ki smo jo opisali v projektu je najpomembnejši mehanizem njegove inaktivacije, ki poteče ob prehodu v citosol celice. S strukturnimi metodami smo pokazali, da je listeriolizin pri nižjem pH v obliki dimera, kar ima verjetno pomembno vlogo pri preprečevanju agregacije. V projektu smo tudi razvili presejalni test za inhibitorje agregacije, ki ga bomo uporabili pri iskanju majhnih molekul, ki bi lahko specifično preprečevale agregacijo listeriolizina. Projekt nam je tudi omogočil opisati dele molekule, ki so pomembni za funkcijo proteina, predvsem tiste, ki vplivajo na vezavo na lipidne membrane in hemolitsko aktivnost. Naša študija je dala tudi dobra izhodišča za uporabo bakterijskih toksinov v celični biologiji, saj smo pokazali, da se da družino bakterijskih toksinov, kamor uvrščamo listeriolizin, uporabiti kot orodja v celični biologiji. Z metodo površinske plazmonske resonance smo pokazali, da se predstavnike teh toksinov da uporabiti za detekcijo holesterola v membranah. V prihodnosti bo tako možno študirati ali se proteini, ki specifično prepoznavajo lipide prisotne v lipidnih raftih, tudi porazdeljujejo v te domene na površini celic in kako sestava lipidnih membran vpliva na prisotnost holesterola in njegovo izpostavljenost za vezavo s proteini.

ANG

Listeriolysin is the main virulence factor of *Listeria monocytogenes*, a pathogenic bacteria, which causes listeriosis. Listeriolysin belongs to a big protein family of cholesterol dependant cytolysins. These are powerfull toxins that are able to generate large pores in the membranes of target cells. Listeriolysin is different from other cholesterol dependant cytolysins as it works the best at low pH, which enable bacteria to escape from phagolysosome to the cytosol of the cell, where it can multiply and escape to other cells. This research project enabled us to describe pH dependence of listeriolysin and how is its activity regulated in the cytosol of the host cell. We show that pH is not affecting much the ability to form transmembrane pores, since hemolytic activity and pore formation in planar lipid membranes is retained at physiological pH of 7.4. Listeriolysin inactivates only when it is incubated at higher temperatures, above 37 °C, while at low pH it does not aggregate. Aggregation of listeriolysin as described in this project is the main mechanism for inactivation in the cytosol of the host cell. With structural methods we show that listeriolysin is a dimer at low pH, which has probably an important role in preventing aggregation at this pH. We did not observe dimers at high pH. We also developed a screening test for inhibitors of listeriolysin aggregation, which will be used in future studies. We plan to search for small molecules that will be able to block listeriolysin aggregation specifically. The research project also enabled us to describe parts of the listeriolysin molecule important for the protein function, particularly some amino acids that participate in membrane binding and hemolytic activity were determined. This study also shows that it is possible to use members of cholesterol dependant cytolysins as molecular tools in cell biology. By the surface plasmon resonance approach we show that they can be used to sense the amount of cholesterol in membranes. It will be possible to study the distribution of proteins that participate in raft binding and how the lipid composition of membranes affect the exposure of cholesterol and its binding by proteins.

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

SLO

Za Republiko Slovenijo so rezultati projekt koristni zaradi več nivojev. Tekom projekta smo omogočili šolanje in trening raziskovalcev, ki uporabljajo moderne tehnologije in metode. V projektu so sodelovali tako dodiplomski kot podiplomski študenti, ki so uporabljali vrhunsko tehnologijo, ki je na razpolago v laboratorijih glavnega raziskovalca projektne skupine in sodelavcev v tujini, kjer se je projekt tudi izvajal. Znanje, ki so ga pridobili jim bo nedvomno koristilo na njihovi bodoči poklicni poti. Projekt nam je tudi omogočil razvoj novih raziskovalnih metod in pristopov v biokemiji lipidnih membran. V projektu smo razvili metodo površinske plazmonske resonance za spremljanje interakcije proteinov in membran in tako omogočili boljše kompetitivne prednosti slovenske znanosti. Pristop je relativno nov v znanosti in samo nekaj skupin je, ki ga v popolnosti izkorišča. Skupina za biokemijo in vodja projekta postajata vedno bolj izkušena pri študijah interakcij proteini-membrane z metodo površinske plazmonske resonance, kar se izkazuje tudi z vabili na konference in k pripravi preglednih člankov. Z objavami v visoko citiranih mednarodnih znanstvenih revijah, s predavanji na mednarodnih kongresih in akademskih institucijah in z organizacijo mednarodnih znanstvenih srečanj je projektna skupina pomembno prispevala k uveljavitvi slovenske znanosti v svetu, predvsem na področju biofizikalnih pristopov v bazičnih znanostih.

Raziskave, ki so potekale tekom projekta so bazičnega značaja, vendar imajo določeno aplikativno vrednost. Znanje, ki smo ga pridobili tekom projekta, bo koristilo pri načrtovanju novih terapevtikov, saj je listeriolizin glavni virulenčni dejavnik bakterije *Listeria monocytogenes*. Z opisom vezavnega mesta za holesterol bomo lahko lažje načrtovali označevalce za lipidne domene, ki bi jih lahko uporabili v celični biologiji. Metodologija in eksperimentalni pristopi, ki jih bomo razvili tekom projekta bodo takoj na voljo uporabnikom iz akademskih inštitucij in industrije. Še posebej velja to za pristop površinske plazmonske resonance, ki bo zanimiv za širšo znanstveno javnost v Sloveniji in tudi v sosednjih državah.

ANG

The applicative value of this research project for Republic of Slovenia was multiple. It enabled us to educate and train researchers, which employed modern biophysical and biochemical methodology. Both undergraduate and postgraduate students participate in the project, which employed the technology that is available in the laboratory of the principal investigator and collaborators from other laboratories. We were also able to develop some new approaches in the biochemistry of the lipid membranes. Particularly, we have developed the surface plasmon resonance as a method for monitoring interaction of proteins with lipid membranes, which render Slovenian science more competitive. The approach is relatively new to the science and not many groups explore it fully. The group of principal investigator is becoming very experienced in protein-lipid interaction studies by using SPR, which is also highlighted by invitations to meetings and preparation of review papers and book chapters. With publications in highly cited international scientific journals and with lectures at academic institutions and research conferences the research group definitely participate in making slovanian science more visible, particularly in the field of biophysical approaches in basic sciences.

This was a basic research projects, but it has some practical applications. It is possible that knowledge obtained within this project will be used to design and develop novel therapeutic approaches, as LLO is a major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. The description of the membrane binding site will enable to design markers for cholesterol that may be used in cell biology to label lipid rafts. Traditionally cholera toxin is used, but it has certain deficiencies that may be overcome by engineered cholesterol binding domain. The methodology and procedures that were developed within the project may be immediately used by other researchers in academia and pharmaceutical companies. Particularly, surface plasmon resonance methodology is interesting for a wider scientific community in Slovenia and in other neighbouring countries.

#### 10. Samo za aplikativne projekte!

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

Cilj		
<b>F.01</b>	<b>Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.02</b>	<b>Pridobitev novih znanstvenih spoznanj</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.03</b>	<b>Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.04</b>	<b>Dvig tehnološke ravni</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

<b>F.05</b>	<b>Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.06</b>	<b>Razvoj novega izdelka</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.07</b>	<b>Izboljšanje obstoječega izdelka</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.08</b>	<b>Razvoj in izdelava prototipa</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.09</b>	<b>Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.10</b>	<b>Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.11</b>	<b>Razvoj nove storitve</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.12</b>	<b>Izboljšanje obstoječe storitve</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.13</b>	<b>Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.14</b>	<b>Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

<b>F.15</b>	<b>Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.16</b>	<b>Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.17</b>	<b>Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.18</b>	<b>Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.19</b>	<b>Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.20</b>	<b>Ustanovitev novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.21</b>	<b>Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.22</b>	<b>Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.23</b>	<b>Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.24</b>	<b>Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.25</b>	<b>Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.26</b>	<b>Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.27</b>	<b>Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.28</b>	<b>Priprava/organizacija razstave</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.29</b>	<b>Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.30</b>	<b>Strokovna ocena stanja</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.31</b>	<b>Razvoj standardov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.32</b>	<b>Mednarodni patent</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.33</b>	<b>Patent v Sloveniji</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.34</b>	<b>Svetovalna dejavnost</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
<b>F.35</b>	<b>Drugo</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

**Komentar**

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

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
<b>G.01</b>	<b>Razvoj visoko-šolskega izobraževanja</b>					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.02</b>	<b>Gospodarski razvoj</b>					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo: <input type="text"/>	<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="text"/>	<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>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.06.</b>	<b>Varovanje okolja in trajnostni razvoj</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<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>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.09.</b>	<b>Drugo:</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

**Komentar**

--

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

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

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

### C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

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

#### Podpisi:

Gregor Anderluh	in	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseba RO

Kraj in datum:

Ljubljana

15.4.2010

**Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2010-1/141**

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

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

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



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

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

**PRIMER** (v slovenskem jeziku):

**Naslov:** Regulacija delovanja beta-2 integrinskih receptorjev s katepsinom X;

**Opis:** Cisteinske proteaze imajo pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju raka. Zadnje študije kažejo njihovo povezanost s procesi celičnega signaliziranja in imunskega odziva. V tem znanstvenem članku smo prvi dokazali...(največ 600 znakov vključno s presledki)

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

**Tipologija:** 1.01 - Izvirni znanstveni članek

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

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

<sup>7</sup> Navedite rezultate raziskovalnega projekta v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

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

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

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

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

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2010 v1.00a

C9-88-00-A9-1B-9D-1E-2C-E2-17-01-04-0B-C1-CC-1B-5A-30-45-E4