

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2014/74



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	Z3-3660
Naslov projekta	Vloga citokromov P450 v biosintezi mikotoksinov in virulenci pri patogeni glivi <i>Aspergillus fumigatus</i>
Vodja projekta	21507 Branka Korošec
Tip projekta	Z Podoktorski projekt
Obseg raziskovalnih ur	3400
Cenovni razred	A
Trajanje projekta	01.2012 - 04.2013
Nosilna raziskovalna organizacija	104 Kemijski inštitut
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	3 MEDICINA 3.01 Mikrobiologija in imunologija
Družbeno-ekonomski cilj	07. Zdravje
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	3 Medicinske vede 3.01 Temeljna medicina

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

2. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Gliva *Aspergillus fumigatus* je oportunistični patogen, ki v odvisnosti od imunskega statusa gostitelja povzroča širok spekter resnih bolezni pri človeku. V virulenco glive *A. fumigatus* so vključeni številni sekundarni metaboliti. Izražanje 40% biosintetskih genov glavnih razredov sekundarnih metabolitov pa pozitivno uravnava transkripcijski regulator, LaeA, med njimi tudi 38% vseh genov, ki kodirajo citokrome P450. Ti zajemajo gruče, udeležene v produkcijo številnih mikotoksinov. Številni nedavno odkriti in sekvencirani geni citokromov P450 so »sirote« (angl. orphan genes) v smislu, da njihovo uravnavanje in funkcija še nista znani. Namen projekta je bil identificirati in funkcijsko opredeliti izbrane citokrome P450, produkte genov, uravnanih z LaeA,

ki so verjetno vključeni v virulenco glive.

Citokrome P450 smo izbrali na podlagi podatkov, dobljenih iz raziskav z mikromrežami in/ali iz bioinformatičnih podatkov. Izbrali smo tri citokrome P450 (CYP) z neznano funkcijo in dve citokrom P450 reduktaze (CPR). Gene smo bodisi pomnožili iz cDNA knjižnice ali pa naročili sintezo ustreznih sintetičnih genov z optimiranim kodom in jih izrazili v dveh različnih ekspresijskih sistemih. Citokrome P450 in citokrom P450 reduktaze smo očistili in pripravili CYP-CPR rekonstitucijske sisteme. Aktivnost očiščenih CYP smo izmerili z pomočjo CO diferenčnega spektra, aktivnost membransko vezanih CPR pa smo določili s citokrom c reduktaznim testom. Za iskanje potencialnih substratov in inhibitorjev izraženih CYP smo izdelali 3D homologne modele izraženih citokromov in s pomočjo virtualnega rešetanja izdelane knjižnice malih molekul določili spojine, ki se najbolj vežejo v aktivna mesta proteinov. Za pregledovanje izbranih potencialnih substratov in inhibitorjev smo uporabili dve različni visoko zmogljivi metodi. Vezavo potencialnih substratov in inhibitorjev v aktivna mesta izbranih citokromov smo potrdili s spektralno vezavno titracijo. S pomočjo HPLC, LC-MS in GC-MS analiz, pa smo pokazali pretvorbo ali inhibicijo omenjenih spojin.

Z omenjenimi metodami smo uspeli izraziti in očistiti vse tri izbrane citokrome P450 in obe citokrom P450 reduktaze ter določiti funkcijo dvema citokromoma. Ker je zadostno znanje o molekulah, vključenih v patogenost gliv, primarni pogoj za razvoj učinkovitih diagnostičnih in terapevtskih orodij, je določitev in funkcijska opredelitev domnevnih genov za citokrome P450 in njihovih produktov ključna. Zaradi vse večjega števila infekcij s patogenimi glivami in razvoja dovzetnosti za azolna zdravila, lahko citokromi P450 predstavljajo zanimive tarče za razvoj novih, bolj specifičnih in učinkovitih protiglivnih zdravil. Za ugotavljanje vloge omenjenih citokromov pri patogenosti glive in protiglivnega delovanja inhibitorjev na patogenih sevih *A. fumigatus* smo navezali stike z ustanovo Manchester Academic Health Science Center (Univerza Manchester, Velika Britanija), ki se ukvarja z biološkimi analizami na omenjeni glivi.

ANG

Aspergillus fumigatus is an opportunistic pathogen, which could, depending on the immune status of the host lead to a wide range of serious human diseases. Number of secondary metabolites are involved in the virulence of *A. fumigatus*. Expression of 40% biosynthetic genes of the main classes of secondary metabolites are positively regulated by transcriptional regulator, LaeA, including 38% of all genes encoding cytochrome P450 monooxygenases. These include clusters involved in the production of many mycotoxins. A number of recently sequenced cytochrome P450 genes, are "orphans" in the sense that their regulation and function are still unknown. The purpose of our project was to identify and functionally characterize selected P450 gene products, regulated by LaeA, that are possibly involved in fungal virulence.

Three cytochromes P450 (CYP) with unknown function and two cytochrome P450 reductases (CPR) were chosen based on microarray studies and/or bioinformatic data. Genes were either amplified from cDNA library or the syntheses of the codon-optimized synthetic genes were ordered. They were expressed in two different expression systems. Activities of purified CYPs as well as CPRs were determined and CYP-CPR reconstitution systems were prepared. To search for substrates and inhibitors of expressed CYPs 3D models of homologous expressed cytochromes were created and the method of virtual screening of chemical libraries of small molecules was used to determine, compounds which preferably bounds into the active site of the selected CYPs. For screening of potential substrates and inhibitors of selected CYPs, we used two high-throughput screening methods. Binding of potential substrates/inhibitors in the active sites of selected CYPs was confirmed by spectral binding titration. Using HPLC, LC-MS and GC-MS analysis, we have demonstrated the conversion or the inhibition of selected compounds.

With these methods, we managed to express and purify all three selected cytochrome P450s and both cytochrome P450 reductases and functionally characterize two of the three selected cytochromes. As sufficient knowledge of the molecules involved in fungal pathogenicity is a prerequisite for the development of diagnostic and therapeutic tools, characterisation and functional determination of the putative cytochrome P450 genes and their products is crucial. Because of the increasing number of aspergillus infections and the development of azole drug resistance in pathogenic fungi identified P450s could represent interesting targets for the development of new, more specific and efficient anti-fungal drugs. To determine the role of these cytochromes in the pathogenicity of the fungus and antifungal operation inhibitors found in

pathogenic strains of *A. fumigatus* the collaboration with the institution Manchester Academic Health Science Centre (University of Manchester, UK), which deals with biological analysis of *A. fumigatus* was established.

3. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

Uvod: Patogena nitasta askomicetna gliva *Aspergillus fumigatus* povzroča širok spekter resnih bolezni, kot so alergijske reakcije, mikotoksikoze in invazivna aspergiloza (IA). Kot kaže, je v patogenost vključenih več virulenčnih dejavnikov, ki delujejo aditivno oz. sinergistično proti gostiteljskemu organizmu. V virulenco glive *A. fumigatus* so vključeni številni sekundarni metaboliti. Številne raziskave so potrdile, da en sam transkripcijski regulator, LaeA, pozitivno uravnava izražanje do 40% biosintetskih genov glavnih razredov sekundarnih metabolitov, ki so v genomu večinoma organizirani v zaporedne gruče. Petnajst od 23 genov, ki kodirajo P450 monoksigenaze, uravnanih z LaeA, najdemo v gručah genov, ki so udeleženi v biosintezi sekundarnih metabolitov. Ti zajemajo gruče, udeležene v produkcijo mikotoksinov, kot so fumitremorgeni, ergot alkaloidi (npr. fumigaklavini), ETP toksin (epipolitiidioksopiperazin) in gliotoksin. Citokromi P450, ki so posebno številni pri nitastih glivah, delujejo v endogenem metabolizmu in pretvorbi tujih snovi. Sterolna 14 α -demetilaza (CYP51), udeležena pri biosintezi ergosterola, je celična tarča za azolna protiglivična zdravila, ki kljub številnim stranskim učinkom, predstavljajo glavno terapijo proti aspergilozam. Ker je CYP51 prisotna pri vseh evkariontih, je težko razviti selektivna zdravila. Glavno težavo pa predstavlja vse pogostejša odpornost glive *A. fumigatus* na azolna zdravila.

Namen raziskave: Velika večina citokromov P450 odkritih v nedavno določenih glivnih genomih, vključno s tistimi najdenimi v gručah genov za sekundarni metabolizem, so t. i. sirote (angl. orphans), v smislu da ne sodijo v nobeno že znano družino P450. Kot takim, njihova funkcija v organizmu ostaja uganka. Razmeroma počasen napredek določevanja funkcije specifičnim P450 zato predstavlja velik izziv za znanost. Namen projekta je bil identificirati in funkcijsko opredeliti izbrane citokrome P450, produkte genov, uravnanih z LaeA, ki so verjetno vključeni v virulenco glive. Študije virulenčnih dejavnikov so pomembne zaradi dveh razlogov, omogočajo zgodnjo diagnostiko okužb z glivo *A. fumigatus* in uporabo teh dejavnikov za tarčo pri izdelavi zdravil, cepiv in/ali specifičnih protiglivičnih terapij.

Izbor citokromov P450 potencialno vključenih v virulenco glive *A. fumigatus*.

Gene, ki kodirajo citokrome P450 potencialno vključene v virulenco glive *A. fumigatus* smo izbrali s pomočjo dveh različnih pristopov: Prvi pristop je vključeval metode molekularne biologije za osamitev genov, ki kodirajo citokrome P450 s knjižnice cDNA glive *A. fumigatus*. Drugi pristop pa je vključeval bioinformatične metode za določanje verjetne vloge kandidatnih genov glede na podobnost aminokislinskega zaporedja in/ali položaj v genomu, ter primerjavo CYPoma z drugimi sorodnimi in/ali patogenimi glivnimi. Na ta način smo izbrali tri citokrome P450 (CYP) z neznano funkcijo (CPY540B8, CYP540B7 in CYP5076C2) in dve citokrom P450 reduktaze (CPRA1 in CPRA2), kot njihova redoks partnerja. Citokrom cyp5076C2 se nahaja v gruči genov, ki kodirajo proteine vključene v biosintezo fumitremorgina B, medtem ko druga dva citokroma pripadata družini citokromov CYP540B in sta potencilano (glede na specifične aminokislinske domene) vključena v biosintezo steroidov in/ali maščobnih kislin.

Rekombinantno izražanje genov za citokrome P450.

Gen (potencialni CYP540B8) smo pomnožili iz knjižnice Uni-ZAP XR cDNA (Stratagene). Za ostale štiri gene smo naročili sintezo ustreznih sintetičnih genov z optimiziranim kodom pri podjetju GenScript (USA). Vsi geni so bili konstruirani tako, da so imeli na C-terminalnem koncu proteina dodan označevalec His6, ki nam je kasneje služil za lažje čiščenje proteina. Vse tri gene za citokrome P450 smo izrazili v dveh različnih sistemih za izražanje genov: v pET 17b (Novagen) in pCWori, ki je optimiziran za izražanje citokromov P450. Za izražanje genov CPR pa smo uporabili ekspresijski sistem pET17b. Gene smo prvotno izrazili v kompetentnih celicah *E. coli* BL21(DE) in C43(DE), ki po podatkih iz literature prispevajo k izboljššanemu izražanju membranskih proteinov in zmanjšajo toksične stranske učinke zaradi prekomernega izražanja. Pri genih kjer smo naleteli na težave pri izražanju smo uporabili kompetentne celice BL21(DE), ki imajo vključene plazmide z različnimi molekulskimi spremljevalci kot so: pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16 (Takara), ki pomagajo pri pravilnem zvijanju proteinov. Za optimizacijo izražanja omenjenih proteinov smo spreminjali pogoje gojenja bakterijskih celic (čas indukcije, temperatura gojenja, čas gojenja).

Čiščenje rekombinantno izraženih P450 in določitev aktivnosti.

Citokrome P450 smo očistili iz membranske frakcije s pomočjo Ni-NTA afinitetne kromatografije in gelske filtracije, medtem ko smo citokrom P450 reduktaze očistili le do membranske frakcije, ki nam je kasneje služila za pripravo različnih CYP-CPR rekonstitucijskih sistemov. Aktivnost očiščenih CYP smo izmerili z pomočjo CO diferenčnega spektra, kvaliteto in aktivnost membransko vezanih CPR pa smo določili s citokrom c reduktaznim (NADPH) testom (Sigma-Aldrich). Na ta način smo uspeli izraziti in očistiti vse tri aktivne citokrome in obe aktivni citokrom P450 reduktazi iz patogene glive *A. fumigatus*. Katalitične lastnosti očiščenih citokromov P450 smo preverili v rekonstitucijskem sistemu z različnimi redoks partnerji (CPR).

Izbor potencialnih substratov in inhibitorjev izbranih citokromov P450

Do sedaj še ni bila določena nobena kristalna struktura glivnih citokromov. Zato smo za iskanje potencialnih substratov in inhibitorjev izraženih citokromov P450 izdelali 3D homologi model dveh izraženih citokromov iz družine CYP540, na podlagi strukturnega ujemanja aminokislinskih ostankov z aktivnim mestom že znanih človeških citokromov, ki pretvarjajo zdravila (2C8 (PDB koda 1PQ2) in 2A6(PDB koda 1Z10)). Kljub nizki aminokislinski identiteti smo z izpopolnjevanjem in dinamično simulacijo dobili zelo stabilne in, glede na PROCHECK, stereokemijsko visoko kakovostne proteinske strukture. Predpostavljeno aktivno mesto modelov je bilo tako primerno za nadaljnje študije namestitve majhnih molekul v aktivno mesto.

Da bi določili potencialne substrate in inhibitorje smo z metodo virtualnega rešetanja izdelane knjižnice 143.000 malih molekul določili za vsak citokrom 40 spojin, ki se najbolj vežejo v aktivno mesto izbranih proteinov. Potencialne substrate pa smo iskali tudi s pomočjo baz podatkov o že znanih strukturno podobnih citokromih P450 na podlagi katerih smo izbrali še dodatnih 20 spojin. 10 potencialne substrate za citokrom cyp5076C2 pa smo določili s pomočjo baz podatkov o pretvorbah fumitremorgina.

Analiza potencialnih substratov in inhibitorjev.

Za pregledovanje izbranih potencialnih substratov in inhibitorjev smo uporabili dve različni visoko zmogljivi t.i. »high-throughput« metode: spektrofotometrično metodo, ki temelji na porabi kisika pri pretvorbi substrata v P450 monooksigenaznih sistemih in metodo presejevalne diferencialne fluorimetrije. Vezavo potencialnih substratov in inhibitorjev smo potrdili s spektralno vezavno titracijo. Z omenjenimi metodami smo uspeli potrditi vezavo dveh steroidov in petih maščobnih kislin v aktivno mesto citokroma CYP540B8. Dve maščobni kislini sta dali reverzni tip II vezavnega spektra, ki nakazuje na inhibitorno vlogo teh spojin. V aktivno mesto citokroma CYP540B7 sta se šibko vezala le androstendion in arahidonska kislina. V nadaljevanju smo s pomočjo HPLC, LC-MS in GC-MS analiz, pokazali pretvorbo omenjenih spojin. GC-MS analiza je potrdila pretvorbo oleinske kisline s pomočjo citokroma CYP540B8. Glede na visoko stopnjo pretvorbe oleinske kisline smo pokazali, da je oleinska kislina glavni substrat citokroma CYP540B8. Glede na to, da so derivati oleinske kisline vključeni v biosintezo oksilipinov, ki predstavljajo enega od ključnih dejavnikov patogenosti pri glivah lahko sklepamo, da je citokrom CYP540B8 vključen v patogenost glive *A. fumigatus*. HPLC, LC-MS in GC-MS analize izbranih potencialnih substratov citokroma CYP540B7 so pokazale le šibko pretvorbo arahidonske kisline. Na podlagi filogenetskih raziskav kjer je bilo ugotovljeno da je gen *Cyp540B7* paralog gena *Cyp540B8* smo sklepali na podobno funkcijo vendar pa iz naših rezultatov nismo potrdili pretvorbe oleinske kisline s pomočjo CYP540B7 zato lahko zaključimo, da ima citokrom CYP540B7 kljub visoki aminokislinski podobnosti s citokromom CYP540B8 drugačno vlogo. Analize izbranih potencialnih produktov citokroma CYP5076C2 še potekajo.

Z omenjenimi metodami smo uspeli izraziti in očistiti vse tri izbrane citokrome P450 (CYP540B8, CYP540B7 in CYP5076C2 in obe citokrom P450 reduktaze ter določiti funkcijo dvema od treh izbranih citokromovin s tem okrepili znanje o molekulah, vključenih v patogenost glive *A. fumigatus*, ki predstavlja osnovni pogoj za razvoj učinkovitih diagnostičnih in terapevtskih orodij. Raziskave, so potekale na Kemijskem inštitutu v sodelovanju s Katedro za farmacevtsko kemijo FFA UL. Za ugotavljanje vloge omenjenih citokromov pri patogenosti glive in protiglivnega delovanja inhibitorjev na patogenih sevih *A. fumigatus* pa smo navezali stike z ustanovo Manchester Academic Health Science Center (Univerza Manchester, Velika britanija), ki se ukvarja z biološkimi analizami na omenjeni glivi.

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

Plan za 1. leto:

1. Izbor citokromov P450 potencialno vključenih v virulenco glive *A. fumigatus*.

2. Rekombinantno izražanje genov za citokrome P450.
3. Čiščenje rekombinantno izraženih P450 in določitev aktivnosti z različnimi testi (spektrofotometrično, tudi poskus rekonstitucije).

Plan za 2. leto:

1. Izbor potencialnih substratov in inhibitorjev izbranih citokromov P450 .
2. Analiza potencialnih substratov in inhibitorjev s kisikovim testom, z metodo diferenčne presejevalne fluorimetije (DSF).

Namen projekta je bil identificirati in funkcijsko opredeliti izbrane citokrome P450, produkte genov, uravnanih z *LaeA*, ki so verjetno vključeni v virulenco glive. Študije virulencnih dejavnikov so pomembne zaradi dveh razlogov, omogočajo zgodnjo diagnostiko okužb z glivo *A. fumigatus* in uporabo teh dejavnikov za tarčo pri izdelavi zdravil, cepiv in/ali specifičnih protiglivnih terapij. Glede na predložen plan ocenjujem, da je realizacija projekta zelo dobra. Po izboru treh kandidatnih genov za citokrome P450 smo uspeli izraziti vse tri aktivne citokrome (CYP540B8, CYP540B7 in CYP5076C2) in oba njhova redoks partnerja citokrom P450 reduktazi (CPRA1 in CPRA2). Rekombinantne citokrome P450 smo testirali v rekonstitucijskih sistemih z različnimi redoks partnerji (reduktazami citokromov P450) in tako določili potencialne substrate omenjenih citokromov. Naši rezultati so pokazali da oba citokroma CYP540B vežeta specifične maščobne kisline. S pomočjo HPLC, LC-MS in GC-MS analize smo dokazali, da citokrom CYP540B8 pretvarja oleinsko kislino, ki je vključena v biosintezo oksilipinov, ki predstavljajo enega od ključnih dejavnikov patogenosti pri glivah. Pokazali pa smo tudi šibko pretvorbo arahidonske kisline v rekonstitucijskem sistemu z CYP540B7. Vzporedno je potekalo tudi iskanje potencialnih inhibitorjev, ki bi lahko vodili v razvoj novih protiglivnih sredstev. V ta namen smo navezali stike z ustanovo Manchester Academic Health Science Center (Univerza Manchester, Velika britanija), ki se ukvarja z biološkimi analizami na omenjeni glivi. V okviru tega projekta sta bila objavljena tudi dva znanstvena članka, še en pa je bil že poslanvobjavo. Z izbranimi metodami smo uspeli izraziti in očistiti vse tri izbrane citokrome P450 in obe citokrom P450 reduktaze ter določiti funkcijo dvema izbranim citokromoma. Z našimi rezultati smo uspeli okrepiti znanje o molekulah, vključenih v patogenost glive *A. fumigatus*, kar predstavlja osnovni pogoj za razvoj učinkovitih diagnostičnih in terapevtskih orodij. V okviru projekta smo uspeli realizirati vse zastavljene cilje.

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

Ni bilo večjih sprememb.

6.Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	30257369	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Virtual screening yields inhibitors of novel antifungal drug target, benzoate 4-monooxygenase
		ANG	Virtual screening yields inhibitors of novel antifungal drug target, benzoate 4-monooxygenase
	Opis	SLO	Glivni encimi CYP53 so zelo ohranjeni proteini, ki sodelujejo pri razstrupljanju fenolnih spojin in nimajo homologov pri višjih evkariontih, zaradi česar predstavljajo dobro tarčo za protiglivna sredstva. Z namenom, da odkrijemo nove inhibitorje CYP53 smo uporabili dva vzporedna virtualna protokola presejanja in ovrednotenja najboljših spojin. Z analizo spektralnih vezavnih interakcij in testiranja zaviranja katalitične aktivnosti encima ter z analizo protiglivnega delovanja smo izbrali 3-metil-4-(1H-pyrrol-1-il) benzojsko kislino (spojina 2), kot najboljšega kandida za nadaljno odkrivanje protiglivnih spojin.
			Fungal CYP53 enzymes are highly conserved proteins, involved in phenolic detoxification and have no homologues in higher eukaryotes, rendering them favorable drug targets. Aiming to discover novel CYP53 inhibitors, we

		ANG	employed two parallel virtual screening protocols and evaluated highest scoring hit compounds by analyzing the spectral binding interactions, by surveying the antifungal activity, and assessing the inhibition of catalytic activity. Based on combined results, we selected 3-methyl-4-(1H-pyrrol-1-yl)benzoic acid (compound 2) as the best candidate for hit-to-lead follow-up in the antifungal drug discovery process.
	Objavljeno v		American Chemical Society; Journal of chemical information and modeling; 2012; Vol. 52, iss. 11; str. 3053-3063; Impact Factor: 4.304; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.252; A': 1; WoS: DY, ET, EV; Avtorji / Authors: Berne Sabina, Podobnik Barbara, Zupanec Neja, Novak Metka, Kraševac Nada, Turk Samo, Korošec Branka, Lah Ljerka, Šuligoj Erika, Stojan Jure, Gobec Stanislav, Komel Radovan
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	31019737	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Protiglivna aktivnost derivatov cimetne kisline vključuje zaviranje benzoatne 4- hidroksilaze (CYP53)
		ANG	Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53)
	Opis	SLO	Cilj : CYP53A15 , sodeluje pri razstrupljanju benzoata, ključnega intermediata v presnovi aromatičnih spojin pri glivah. Ker je ta encim značilen za glive, predstavlja obetavno tarčo za protiglivna sredstva Metode in rezultati : Pri našem delu smo pokazali visoko protiglivno delovanje sedmih derivatov cimetne kisline proti C. lunatus, in še dvema drugima glivama Aspergillus niger in Pleurotus ostreatus. Da bi razjasnili mehanizem delovanja derivatov cimetne kisline smo proučevali interakcije med temi spojinami in aktivnim mestom C. lunatus citokroma P450 , CYP53A15. Zaključek: Dokazali smo , da cimetna kislina in vsaj štiri od 42 testiranih derivatov zavira encimsko delovanje CYP53A15.
		ANG	Aims: CYP53A15, from the sorghum pathogen Cochliobolus lunatus is involved in detoxification of benzoate, a key intermediate in aromatic compound metabolism in fungi. Because this enzyme is unique to fungi, it is a promising drug target in fungal pathogens of other eukaryotes. Methods and results: In our work we showed high antifungal activity of seven cinnamic acid derivatives against C. lunatus, and two other fungi, Aspergillus niger and Pleurotus ostreatus. In order to elucidate the mechanism of action of cinnamic acid derivatives with the most potent antifungal properties, we studied the interactions between these compounds and the active site of C. lunatus cytochrome P450, CYP53A15. Conclusion: We demonstrated that cinnamic acid and at least four of the 42 tested derivatives inhibit CYP53A15 enzymatic activity. Significance and impact of study: By identifying selected derivatives of cinnamic acid as possible antifungal drugs, and CYP53 family enzymes as their targets, we revealed a potential inhibitor-target system for antifungal drug development. This article is protected by copyright. All rights reserved.
	Objavljeno v		Blackwell Science; Journal of applied microbiology; 2013; iss. , Vol.; str.; Impact Factor: 2.196; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.864; WoS: DB, QU; Avtorji / Authors: Korošec Branka, Sova Matej, Turk Samo, Kraševac Nada, Novak Metka, Lah Ljerka, Stojan Jure, Podobnik Barbara, Berne Sabina, Zupanec Neja, Bunc Marko, Gobec Stanislav, Komel Radovan
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

--	--

Družbeno-ekonomski dosežek			
1.	COBISS ID	5192218	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Derivati cimetne kisline kot potencialni inhibitorji glivne benzoatne 4-monooksigenaze (CYP53A15)
		ANG	Cinnamic acid derivatives as potential inhibitors of fungal benzoate 4-monooxygenase (CYP53A15)
	Opis	SLO	V zadnjih letih je veliko raziskav usmerjenih v iskanje novih protiglivnih tarč. Ena takih je tudi glivni citokrom CYP53, družina visoko konzerviranih proteinov, ki je prisoten v številnih patogenih glivah, kot so <i>Aspergillus fumigatus</i> in <i>Gibberella zeae</i> . V naši raziskavi smo ugotovili, da benzoat para-hidroksilaza (CYP53A15 ali BPH) sodeluje pri razstrupljanju benzoata, ključnega vmesnega metabolita pri presnovi aromatskih spojin v glivi. Visoka specifičnost in odsotnost homologa pri višjih evkariontih opredeljujejo CYP53A15 kot zanimivo tarčo za razvoj protiglivnih učinkovin. Prav tako smo pokazali zaviranje CYP53A15 z naravnimi spojinami, kot so isoeugenol, timol, trans-cimetova kislina in dokazali njihov protiglivni potencial. Med testiranimi 25 derivatov cimetne kisline smo pokazali, protiglavno delovanje 4 spojin. Dva od njih sta zavirala delovanje encima CYP53A15 in sta bila izbrana za nadaljnjo optimizacijo novih protiglivnih spojin.
		ANG	In recent years several promising antifungal targets have been under exploration. One of such is also fungal CYP53, family of highly conserved proteins observed in a number of pathogenic fungi, such as <i>Aspergillus fumigatus</i> and <i>Gibberella zeae</i> . In our recent study we identified benzoate para-hydroxylase (CYP53A15 or BPH) as a unique enzyme involved in detoxification of benzoate, a key intermediate in metabolism of aromatic compounds in fungi. High specificity and absence of homologue in higher eukaryotes assign CYP53A15 as interesting drug target. We have also revealed inhibition of CYP53A15 with natural compounds, such as isoeugenol, thymol, trans-cinnamic acid and shown their antifungal potential. Among 25 cinnamic acid derivatives tested, 4 compounds have shown antifungal potential. Two of them were also evaluated as inhibitors of CYP53A15 activity and were selected for further optimization of new lead structures
	Šifra	F.02 Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Objavljeno v	[11th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity & Biotechnology, 22-26 June 2012, Torino, Italy. Programme and abstracts. Torino: [s. n.], 2012, str. 59.	
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
2.	COBISS ID	30547417	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Inhibicija benzoatne 4-monooksigenaze (CYP53A15) iz glive <i>Cohliobolus lunatus</i> z derivati cimetne kisline
		ANG	Inhibition of benzonate 4-monooxygenase (CYP53A15) from <i>Cohliobolus lunatus</i> by cinnamic acid derivatives
	Opis	SLO	CYP53A15 , sodeluje pri razstrupljanju benzoata ,ključnega intermediata v presnovi aromatičnih spojin pri glivah . Ker je ta encim značilen za glive , predstavlja obetavno tarčo za protiglivna sredstva Metode in rezultati : Pri našem delu smo pokazali visoko protiglavno delovanje sedmih derivatov cimetne kisline proti C. lunatus, in še dvema drugima glivama <i>Aspergillus niger</i> in <i>Pleurotus ostreatus</i> . Da bi razjasnili mehanizem delovanja derivatov cimetne kisline smo proučevali interakcije med temi spojinami in aktivnim mestom C. lunatus citokroma P450 , CYP53A15. Zaključek: Dokazali smo , da cimetna kislina in vsaj štiri od 42 testiranih derivatov zavira encimsko delovanje CYP53A15.

	ANG	CYP53A15, from the sorghum pathogen <i>Cochliobolus lunatus</i> is involved in detoxification of benzoate, a key intermediate in aromatic compound metabolism in fungi. Because this enzyme is unique to fungi, it is a promising drug target in fungal pathogens of other eukaryotes. Methods and results: In our work we showed high antifungal activity of seven cinnamic acid derivatives against <i>C. lunatus</i> , and two other fungi, <i>Aspergillus niger</i> and <i>Pleurotus ostreatus</i> . In order to elucidate the mechanism of action of cinnamic acid derivatives with the most potent antifungal properties, we studied the interactions between these compounds and the active site of <i>C. lunatus</i> cytochrome P450, CYP53A15. Conclusion: We demonstrated that cinnamic acid and at least four of the 42 tested derivatives inhibit CYP53A15 enzymatic activity. Significance and impact of study: By identifying selected derivatives of cinnamic acid as possible antifungal drugs, and CYP53 family enzymes as their targets, we revealed a potential inhibitor-target system for antifungal drug development.
Šifra	B.04	Vabljen predavanje
Objavljeno v	27th Fungal genetics conference, Asilomar [California], March 12-17, 2013; 2013; [Abstr. št. 67]; Avtorji / Authors: Korošec Branka, Podobnik Barbara, Berne Sabina, Zupanec Neja, Novak Metka, Kraševac Nada, Turk Samo, Sova Matej, Lah Ljerka, Stojan Jure, Gobec Stanislav, Komel Radovan	
Tipologija	1.12	Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁷

Znanstveni članek poslan v objavo v revijo BBRC (Biochemical and Biophysical Research Communications):
Korošec Branka, Novak Metka, Podobnik Barbara, Lah Ljerka, Stojan Jure, Komel Radovan.
Characterization of two novel cytochromes CYP540B8 and its paralogue CYP540B7.

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

9.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Številni projekti določanja nukleotidnih zaporedij glivnih genomov so razkrili visoko število citokromov P450 monooksigenaz pri vrstah z nitasto obliko rasti. Velika večina citokromov P450, vključno s tistimi najdenimi v gručinah genov, ki so udeleženi v biosintezi sekundarnih metabolitov, so t. i. sirote (angl. orphans) v tem smislu, da njihovo uravnavanje in funkcija še nista znani. Razmeroma počasen napredek določevanja funkcije specifičnim P450 zato predstavlja velik izziv za znanost.

Glivni citokromi P450, pogosto vključeni v genske gruče za sekundarni metabolizem, so udeleženi v sintezi različnih naravnih spojin, številni med njimi predstavljajo mikotoksine, vključene v virulenco glive. Ker je zadostno znanje o molekulah, vključenih v patogenost gliv, osnovni pogoj za razvoj učinkovitih diagnostičnih in terapevtskih orodij, je določitev in funkcijska opredelitev domnevnih genov za citokrome P450 in njihovih produktov ključna. Z določitvijo funkcije dvema novima citokromoma, ki potencialno prispevata k virulenci glive *A. fumigatus* smo okrepili znanje o vključenosti citokromov v virulenco glive *A. fumigatus*. Izbrani in funkcijsko določeni citokromi P450 pa predstavljajo izhodišče za nadaljnje molekularno modeliranje njihovih struktur s ciljem načrtovati komplementarne majhne molekule, ki bodo specifično inhibirale njihovo aktivnost. Med inhibitorji izbranih citokromov P450 pa lahko na podlagi pridobljenih spoznanj iščemo spojine za izdelavo novih protiglivičnih učinkovin.

ANG

Fungal genome sequencing projects have revealed high numbers of cytochrome P450 monooxygenases in species with filamentous growth form, but great majority of these cytochromes P450, including those found in secondary metabolite gene clusters, are „orphans“ in the sense that their regulation and function are still largely unknown. Thus, the relatively

slow progress of assigning function to specific P450s poses a challenge. Fungal P450, often part of secondary metabolite gene clusters, are involved in the synthesis of different natural products, many of which are involved in fungal virulence. As sufficient knowledge of the molecules involved in mycotoxin biosynthetic pathways is a prerequisite for the development of diagnostic and therapeutic tools, characterisation and functional determination of the putative cytochrome P450 genes and their products is crucial. By characterization of two novel cytochromes, which potentially contribute to the virulence of the fungus *Aspergillus fumigatus*, we enhance knowledge of the involvement of cytochromes in the virulence of the fungus *Aspergillus fumigatus*. Specific P450s can be further used in molecular modeling studies with the aim of designing complementary small compounds that would specifically inhibit P450 activities. Inhibitors of identified P450s may serve as compounds for the design of novel antifungal drugs

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Kljub trenutnim diagnostičnim in terapevtskim možnostim umrljivost zaradi invazivne aspergiloze, ki jo povzroča gliva *Aspergillus fumigatus*, ostaja visoka. Glavno težavo predstavlja tudi vse pogostejša odpornost glive *A. fumigatus* na azolna zdravila. Zato je razvoj novih, hitrih in občutljivejših diagnostičnih metod in učinkovitejših protiglivnih zdravil, z novim mehanizmom delovanja, neobhodno potreben. Predvidevamo, da številni funkcijsko še neopredeljeni citokromi P450, vključeni v biosintezo sekundarnih metabolitov patogenih gliv, prispevajo k virulenci in tako predstavljajo zanimive tarče za razvoj novih, bolj specifičnih in učinkovitih protiglivnih zdravil. V naši raziskavi smo funkcijsko opredelili dva nova citokroma P450 in pokazali njuno potencialno vključenost v patogenost glive *A. fumigatus*. Z opredelitvijo vloge novim citokromom P450 smo izpostavili tiste citokrome, ki nimajo homologov pri višjih evkariontih in tako lahko predstavljajo potencialne protiglivne tarče, kar bo postavilo temelje za razvoj bolj selektivnih in učinkovitih inhibitorjev proti patogenim glivam, z manj škodljivimi stranskimi učinki. Naši rezultati tako predstavljajo napredek pri zoperstavljanju proti kužnim in toksine proizvajajočim glivam, tako na medicinskem kot na kmetijskem področju, saj glivne okužbe povzročajo tudi veliko izgubo pridelka in s tem veliko gospodarsko škodo.

ANG

Despite current diagnostic and therapeutic options, mortality associated with invasive aspergillosis caused by *A. fumigatus* remains high. A major problem is also the increasing frequency of azole drug resistance observed in *A. fumigatus*. Thus the development of new rapid diagnostic methods with higher sensitivity and more efficacious antifungal drugs with novel mechanisms of action are needed. We suspect that many of the functionally yet uncharacterized cytochromes P450 of pathogenic fungi, involved in biosynthesis of secondary metabolites putatively contribute to fungal virulence and as such could represent interesting targets for the development of new more specific and efficient anti-fungal drugs. In our study, we functionally characterized two cytochrome P450s and showed their potential involvement in the pathogenicity of the fungus *Aspergillus fumigatus*. By defining the role of the new cytochrome P450 were exposed those which do not have homologues in higher eukaryotes and thus may represent a potential antifungal targets, which could enable the development of more selective and potent inhibitors against pathogenic fungi, with less adverse side effects. Our results represent progress in development of novel antifungal compounds, based on natural defence molecules, which could prove useful in combating infectious and toxin-producing fungi in medicine as well as in agriculture, since fungal infections cause economically significant crop losses annually.

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

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

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	

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

	Uporaba rezultatov	
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE

	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

Komentar

--

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

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☐	☐	☐	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☐	☐	☐	☐	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☐	☐	☐	☐	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☐	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	☐	☐	☐	☐	
G.02.07.	Večji delež izvoza	☐	☐	☐	☐	
G.02.08.	Povečanje dobička	☐	☐	☐	☐	
G.02.09.	Nova delovna mesta	☐	☐	☐	☐	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	☐	☐	☐	☐	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	☐	☐	☐	☐	
G.02.12.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	☐	☐	☐	☐	
G.03.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	☐	☐	☐	☐	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	☐	☐	☐	☐	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	☐	☐	☐	☐	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	☐	☐	☐	☐	
G.04.06.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in	☐	☐	☐	☐	

	identitete					
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj	☐	☐	☐	☐	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	☐	☐	☐	☐	
G.09.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	

Komentar

--

12.Pomen raziskovanja za sofinancerje¹¹

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

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

Protiglivna aktivnost derivatov cimetne kisline vključuje zaviranje benzoatne 4- hidroksilaze (CYP53)

V zadnjih letih je veliko raziskav usmerjenih v iskanje novih protiglivnih tarč. Ena takih je tudi glavni citokrom CYP53, družina visoko konzerviranih proteinov, prisotnih v številnih patogenih glivah, kot je *Aspergillus fumigatus*. CYP53, sodeluje pri razstrupljanju benzoata, ključnega intermedijata v presnovi aromatičnih spojin pri glivah. Visoka specifičnost in odsotnost homologa pri višjih evkariontih opredeljujejo CYP53 kot zanimivo tarčo za razvoj protiglivnih učinkovin. Med testiranimi 42 derivatov cimetne kisline smo pokazali protiglivno delovanje 7 derivatov cimetne kisline proti glivam *C. lunatus*, *Aspergillus niger* in *Pleurotus ostreatus*. 4 od njih so zavirali delovanje encima CYP53A15 in so bili izbrani za nadaljnjo optimizacijo novih protiglivnih spojin. Dokazali smo, da cimetna kislina in vsaj štiri od 42 testiranih derivatov zavira encimsko

delovanje CYP53A15.

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:

Kemijski inštitut

Branka Korošec

ŽIG

Kraj in datum: Ljubljana 5.4.2014

Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2014/74

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2014 v1.02

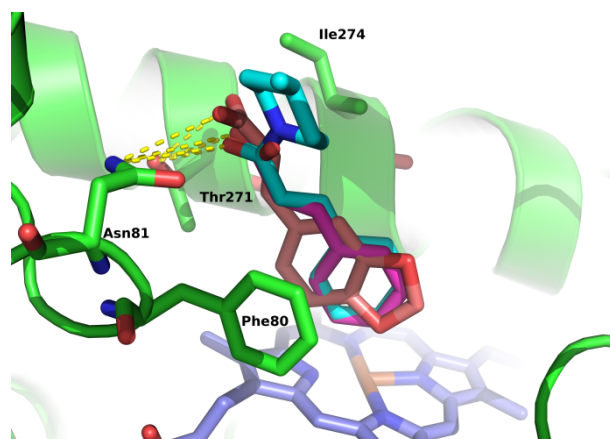
9C-B4-EE-72-EC-C6-2A-6F-85-CF-DE-94-E1-A2-12-D8-79-C1-BA-FC

Priloga 1

Medicinske vede

Področje: 3.01 Mikrobiologija in imunologija

Protiglivična aktivnost derivatov cimetine kisline vključuje zaviranje benzoatne 4-hidroksilaze (CYP53) 31019737 COBISS.SI



Sidranje spojine **18** (modro) in **9** (rdeče) v primerjavi s cimetano kislino (vijolično) v aktivno mesto modela CYP53A15 narejenega na podlagi 3D homolognega modela.

V zadnjih letih je veliko raziskav usmerjenih v iskanje novih protiglivičnih tarč. Ena takih je tudi glivni citokrom CYP53, družina visoko konzerviranih proteinov, prisotnih v številnih patogenih glivah, kot je *Aspergillus fumigatus*. CYP53, sodeluje pri razstrupljanju benzoata, ključnega intermedata v presnovi aromatičnih spojin pri glivah. Visoka specifičnost in odsotnost homologa pri višjih evkariontih opredeljujejo CYP53 kot zanimivo tarčo za razvoj protiglivičnih učinkovin. Med testiranimi 42 derivatov cimetine kisline smo pokazali protiglivično delovanje 7 derivatov cimetine kisline proti glivam *C. lunatus*, *Aspergillus niger* in *Pleurotus ostreatus*. 4 od njih so zavirali delovanje encima CYP53A15 in so bili izbrani za nadaljnjo optimizacijo novih protiglivičnih spojin. Dokazali smo, da cimetna kislina in vsaj štiri od 42 testiranih derivatov zavira encimsko delovanje CYP53A15.