

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2013/10



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J4-2212
Naslov projekta	Glivni citokromi P450, vključeni v detoksifikacijo rastlinskih obrambnih spojin, kot tarče novih protiglivnih učinkovin
Vodja projekta	385 Nada Kraševac
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	4653
Cenovni razred	B
Trajanje projekta	05.2009 - 04.2012
Nosilna raziskovalna organizacija	104 Kemijski inštitut
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	258 Lek farmacevtska družba d.d. 381 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta 787 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.06 Biotehnologija 4.06.04 Mikrobna biotehnologija
Družbeno-ekonomski cilj	13.01 Naravoslovne vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)

2. Raziskovalno področje po šifrantu FOS¹

Šifra	1.06
- Veda	1 Naravoslovne vede
- Področje	1.06 Biologija

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta²

SLO

V naravi vlada dinamično ravnoesje med virulenčnostjo glivnega patogena in odpornostjo rastlinskega gostitelja. Gliva ogroža rastlino z virulenčnimi dejavniki, hkrati pa razstruplja obrambne spojine gostitelja. V kmetijstvu povzročajo glivne okužbe žitaric izgubo pridelka in veliko škodo. Sirek (*Sorghum*) je peta najpomembnejša žitarica v svetovnem merilu,

namenjena prehrani ljudi in živali, pridobivanju bioetanolu in industrijskih proizvodov. Nitasta zaprtotrošnica *Cochliobolus lunatus* (*Curvularia lunata*) je naravni patogen na omenjeni rastlini. Sirek proizvaja bogato zakladnico različnih fitokemikalij, ki predstavljajo kemično obrambo rastline, gliva v odgovor na rastlinske obrambne spojine sproži mehanizme njihove detoksifikacije. Pri tem so ključni citokromi P450; nitaste glive vsebujejo izjemno veliko število citokromov P450. Namen raziskave je bil določiti glivne citokrome P450, ki so sposobni razstrupiti rastlinske obrambne spojine, določiti nove protiglivne tarče in izbrati ter načrtovati nove, bolj učinkovite inhibitorje ključnih citokromov P450 v metabolizmu rastlinskih obrambnih spojin. Določitev genoma glive *C. lunatus*, skupaj s transkriptomskimi podatki, omogoča razširitev nabora tarčnih citokromov P450. Vzpostavili smo sistem metod, ki omogoča določitev funkcije različnih citokromov P450. Na encimu benzoatna 4-monooksigenaza (CYP53A15) smo preverili in ovrednotili metode načrtovanja in dejanskega delovanja načrtanih inhibitorjev. Citokrom CYP53A15 se izkazal kot zelo obetavna tarča, prisoten je v večini nitastih gliv, ne pa tudi pri višjih evkariotih, zato smo veliko pozornosti posvetili iskanju inhibitorjev za to tarčo. Določili smo potencialno spojino vodnico s protiglavnim delovanjem, ki lahko vodi v razvoj novih (fito)farmacevtskih sredstev. Izbrana spojina vodnica predstavlja dobro izhodišče, ker njeno delovanje ni omejeno samo na to glivo. Z vrednotenjem drugega kroga spojin, izbranih na osnovi spojine vodnice, smo že določili nekaj spojin z izboljšano protiglavno aktivnostjo. Z opredelitvijo izbranih derivatov cimene kisline kot možnih protiglavnih sredstev, in družino encimov CYP53 kot njihovo potencialno tarčo, smo pokazali na drugi možen sistem za razvoj protiglavnih sredstev.

ANG

In nature, a dynamic equilibrium is maintained between the virulence of a fungal pathogen and the resistance of its plant host. Fungi attack plants with an array of virulence factors, yet at the same time they must detoxify defense compounds released by their hosts. Fungal infections cause economically significant crop losses annually. Sorghum is the fifth most important cereal crop in the world, used for food, fodder and biofuel. The filamentous ascomycete *Cochliobolus lunatus* (*Curvularia lunata*) is a natural pathogen of Sorghum species. This plant species produces numerous secondary metabolites that constitute the plant's chemical defense. In response to released plant defense compounds, fungus activates mechanisms for their detoxification. In these mechanisms cytochromes P450 play crucial role; filamentous fungi possess numerous cytochromes P450. The aim of our research was to identify those cytochromes P450 involved in detoxification of plant defense compounds, to identify new antifungal targets and to select and design new, more effective inhibitors for key cytochromes P450 in the metabolism in plant defense compounds. Genome determination of the fungus *C. lunatus* together with transcriptomic data, enable further extension of target cytochromes P450 set. We established a system of methods for determining the function of various cytochromes P450. The enzyme benzoate 4-monooxygenase (CYP53A15) served to examine and evaluate the methods for design and the actual function of inhibitors. Cytochrome CYP53A15 has proved to be a promising target, present in most of the filamentous fungi but not in higher eukaryotes, so we devoted considerable attention to find inhibitors for this target. We determined the best candidate for hit to-lead follow-up in the antifungal drug discovery, which can lead to the development of new (phyto) pharmaceuticals. The selected compound proved to be a good starting point because the antifungal activity is not limited to this fungus only. The evaluation of the second round of compounds, selected on the basis of this inhibitor, identified more compounds with improved antifungal activity. With identification of selected cinnamic acid derivatives as potential antifungals and CYP53 enzyme family as their potential target, we demonstrated alternative system for the development of antifungal drugs.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu³

V naravi vlada dinamično ravnovesje med virulenčnostjo glivnega patogena in odpornostjo rastlinskega gostitelja. Gliva ogroža rastlino z virulenčnimi dejavniki, hkrati pa razstruplja obrambne spojine gostitelja. V kmetijstvu povzročajo glivne okužbe žitaric izgubo pridelka in veliko škodo. Sirek (*Sorghum*) je peta najpomembnejša žitarica v svetovnem merilu, namenjena prehrani ljudi in živali, pridobivanju bioetanolu in industrijskih proizvodov. Nitasta zaprtotrošnica *Cochliobolus lunatus* (*Curvularia lunata*) je naravni patogen na omenjeni rastlini.

Namen naših raziskav je: določiti tiste glivne citokrome P450, ki so sposobni razstrupiti rastlinske obrambne spojine, in tako razkriti prej neznane metabolne poti; prepričati se o delovanju rastlinskih metabolitov in vivo v testih protiglavnih aktivnosti; določiti nove protiglivne tarče; načrtovati izbor in oblikovanje novih, bolj učinkovitih inhibitorjev za ključne citokrome P450 v glivnem metabolizmu. Naravne spojine bi lahko služile kot alternativa običajnim protiglavnim spojinam, ki ogrožajo okolje in zdravje ljudi.

Izbor spojin iz sirka za sintetični koktajl

Sirek (*Sorghum bicolor*) vsebuje obrambne sekundarne rastlinske metabolite kot tudi osnovne celične sestavine, ki so možni substrati citokromov P450 pri rastlinskih patogenih. Na osnovi analize sirkovega ekstrakta iz literature (Awika et al., 2004), smo določili izbor spojin za indukcijo micelija. Sintetični koktajl vsebuje 26 različnih spojin raztopljenih v DMSO: tanine, derivate benzojske in cimetne kisline, antocianidine in antocianine ter fitosterole.

Indukcija nitaste glive *C. lunatus* in priprava cDNA

Po indukciji tekoče kulture s koktajlom smo iz micelija izolirali RNA. V firmi Research and Testing laboratories (Texas, ZDA) so določili zaporedje transkriptoma. Poleg transkriptoma v zgodnji fazi interakcije (90 min), so določili še transkriptom v pozni fazi interakcije (48 h). V preteklem obdobju smo na določitev zaporedja poslali še kontrolno, neinducirano RNA (48 h).

Analiza transkriptomov

V zgodnjem transkriptomu smo, izmed 13753 transkriptov, identificirali 34 različnih, ki imajo ohranjeno proteinsko domeno PF00067, značilno za citokrome P450. Izmed njih po dva para pripadata fuzijskim, bifunkcionalnim proteinom, ki poleg citokromske domene vsebujejo še domene značilne za citokrom P450 reduktazo oziroma hem peroksidazo (dioksidogeneze). Dva predstavljata homologa 14 alfa demetilaze in 22-sterol desaturaze, ki sodelujeta pri tvorbi ergosterola, za glive značilne membranske komponente. Naslednja dva predstavljata homologa hidroksilaz, vključenih v hidroksilacijo fenilacetatnega obroča. Še nadaljnji štiri so bili prisotni že v naši predhodni subtraksijski hibridizacijski knjižnici (indukcija glive z rastlinskimi obrambnimi substancami podobnim steroidom progesteronom) in verjetno sodijo v nabor tarčnih citokromov P450. Za preostalih 25 literaturne opore o morebitni funkciji ni. V poznem transkriptomu smo, izmed 7960 transkriptov, identificirali 38 različnih citokromov P450. Obema fazama odziva je skupnih 23 citokromov P450, med njimi tudi benzoat 4-monooksigenaza (CYP53A15). Skupno število transkriptov za citokrome P450 je 59, izmed 106 z P450 nomenklaturu poimenovanih iz celotnega genoma.

Določitev genoma glive *C. lunatus*

Navezali smo stike z ugledno raziskovalko Gillian Turgeon (Department of Plant Pathology & Plant-Microbe Biology, Cornell University, ZDA), ki se s fitopatogenom *C. heterostrophus* in s sekundarnimi metaboliti, ki jih tvori gliva, ukvarja vrsto let. V javnem programu sekvenciranja (CSP 2011) so nam odobrili skupen projekt z naslovom: *Cochliobolus*: razširjeno in poglobljeno; predlog zanj smo oddali v letu 2010. Projekte za določevanje genoma izberejo na osnovi znanstvene vrednosti, po neodvisni presoji recenzentov in glede na pomembnost za področja, ki jih zanimajo, to so globalno kroženje ogljika, alternativna proizvodnja energije in biogeokemija.

Celotni genom glive je uspešno določen. Sekvenciranje so izvedli na inštitutu Joint Genome Institute (JGI), Walnut Creek, ZDA. Dostop do druge, izboljšane verzije avtomatske anotacije, je mogoč preko spletne strani: *Cochliobolus lunatus* m118 v2.0; <http://genome.jgi-psf.org/Coclu2/Coclu2.home.html>) 2. verzija, maj 2012).

V letu 2011 smo na razpis CSP JGI poslali pismo o nameri za določitev več različnih transkriptomov z angleškim naslovom: Deep transcriptomics for understanding host-pathogen interactions between Dothideomycetes fungi and bioenergy crops; predlagatelji: Stephen B. Goodwin, Burt Bluhm, Rosie Bradshaw, Lynda Cuiffetti, Pierre DeWit, Igor V. Grigoriev, Richard Hamelin, Gert Kema, Nada Krascevic, Christopher Lawrence, Robin Ohm, Richard Oliver, Thierry Rouxel, Peter Solomon, Gillian Turgeon in Shaobin Zhong. Povabljeni smo bili k oddaji polnega predloga projekta, ki nato ni bil izbran za izvedbo.

Prijavili smo se tudi v letu 2012 z vsebinsko drugačnim projektnim predlogom za določitev 45 različnih transkriptomov iz gliv *C. heterostrophus* in *C. lunatus*. Tudi tokrat smo bili povabljeni k oddaji polnega projektnega predloga, vendar ne izbrani za izvedbo. Angleški naslov je projektnega predloga: Towards understanding the function of cytochromes P450 in host-pathogen interactions between Dothideomycete fungi and bioenergy crops; predlagatelji: Nada Kraševac, Marina Dermastia in B. Gillian Turgeon.

Iskanje kandidatnih genov citokromov P450 z bioinformatiko

Analizirali smo citokrome P450 pri nitasti glivi *C. lunatus* in *C. heterostrophus*, taksonomsko najbolj sorodni glivi z znanim genomom, v primerjavi z drugimi dotideomicetami iz rodu Pleosporales, v katerem je veliko pomembnih rastlinskih patogenov, npr. na žitaricah. *C. heterostrophus* vsebuje 139 citokromov P450, uvrščamo jih v 73 družin CYP. *Stagonospora nodorum* vsebuje 149 citokromov P450 v 89 družinah CYP in *Pyrenophora tritici-repentis* 113 v 64 družinah CYP. Če primerjamo vse tri vrste med seboj, število družin CYP naraste na 116,

kar kaže na znaten delež »osirotelih«, vrstno specifičnih genov. Največje število citokromov P450 v družini CYP65, prvi opisani citokrom CYP65A1 je del genske gruče za sintezo trihotecenskega toksina T-2. *C. lunatus* vsebuje 106 citokromov P450 v 69 družinah CYP, kar 11 jih pripada družini CYP65.

Rekombinantno izražanje citokromov P450 v bakteriji *Escherichia coli*

Večina transkriptov (pred določitvijo genoma) ni omogočala prepisa celega proteina. Zato smo jih, izmed osmih primernih za kloniranje in izolacijo proteinov v bakteriji *E. coli*, poleg citokroma CYP53A15 izbrali še pet, dva iz zgodnjega odziva (eden je znana tarča 14alfa demetilaza), enega iz poznega odziva in dva prisotna v obeh odzivih. Naročili smo sintetične gene za izražanje v bakteriji in bili pri njihovi ekspresiji različno uspešni.

Vzpostavitev pregledovalnih testov za funkcionalno določitev in ovrednotenje citokromov P450

Na obstoječem strukturnem modelu CYP53A15 (benzoatno 4-monooksigenazo) smo najprej potrdili sidranje izoeugenola, nato pa z metodo virtualnega rešetanja izbrali 50 derivatov izoeugenola, ki se najbolje sidrajo v aktivni center CYP53A15 in naročili knjižnico 40 možnih inhibitorjev.

Za preiskovanje verjetnih substratov citokromov P450 smo uporabili tehniko diferenčne spektrometrije. Ob vezavi substrata navadno pride do spektralnih sprememb. Spektralne spremembe ob vezavi substrata so posledica premika v ravnotežju med visoko-spinskim (390 nm) in nizko-spinskim (420 nm) stanjem železa. Preverili smo vseh 40 substanc.

Metoda presejevalne diferencialne fluorimetrije zazna toplotno razvitje proteinov z uporabo fluorescenčnega barvila, ki ima afiniteto do hidrofobnih domen molekul. Metoda se brez dodatne optimizacije še ni izkazala kot povsem zanesljiva za študij citokromov P450.

Termoforeza (angleško Microscale Thermophoresis (MTS)) omogoča hitro merjenje različnih molekulskih interakcij (protein-ligand, protein-protein, protein-DNA, ribosomi-protein, liposomi-protein), pri tem je eden izmed partnerjev fluorescentno označen. Rezultati prvih testov interakcije protein-inhibitor za citokrome P450 so obetavni.

Dobro topne inhibitorje, z izkazanim biološkim učinkom, smo ovrednotili tudi s kisikovim testom. Kisikov test je spektrofotometrična metoda, ki zazna porabo kisika pri pretvorbi substrata v P450 monoksigenaznih sistemih in omogoča določitev aktivnosti in vitro. Temelji na mikrotiterskih ploščah BD Oxygen Biosensor System z vezanim fluorescenčnim barvilom. Dokazali smo, da lahko metodo uporabimo za dokazovanje aktivnosti glivnih citokromov P450, vendar je metoda HPLC bolj povedna.

Vpliv dobro topnih inhibitorjev, z izkazanim biološkim učinkom, smo proučili v rekonstitucijskem sistemu CYP53A15 s citokrom P450 reduktazo. Potek encimske reakcije smo spremljali v različnih časovnih točkah, s pomočjo kvantitativne analize nastalih produktov, merjenih s HPLC. Reakcijo smo izvedli pri različnih koncentracijah substrata in inhibitorja. Našo ugotovitev, da poleg encima - citokroma P450 in substrata, reakcijo specifično določa tudi redoks partner, ki sodeluje v reakciji, smo objavili v znanstvenem članku (The versatility of the fungal cytochrome P450 monooxygenase system is instrumental in xenobiotic detoxification; Molecular microbiology (2011)).

S testi protiglavnega delovanja na micelij *in vivo* smo ovrednotili rast glive *C. lunatus* za vse substance. Popolno ali delno inhibicijo rasti glive na ploščah pod izbranimi pogoji je izkazalo kar 11 izmed teh substanc. Delovanje 8 substanc, ki so kazale popolno ali delno inhibicijo rasti glive na ploščah, smo ovrednotili še pri dveh glivah *Aspergillus niger* in *Pleurotus ostreatus* ter v primerjavi z protiglavnim zdravilom ketokonazolom.

Verjamemo, da smo z metodami izbora in testi za analizo delovanja inhibitorjev uspeli načrtati potencialno novo spojino vodnico, ki lahko vodi v razvoj novih (fito)farmaceutskih sredstev, o čemer smo objavili znanstveni članek (Virtual screening yields inhibitors of novel antifungal drug target, benzoate 4-monooxygenase; Journal of Chemical Information and Modeling (2012)).

V poskusih kristalizacije encima CYP53A15 z izbranim inhibitorjem so zrasli prvi kristali. Pričakujemo, da bomo po optimizaciji pogojev pridobili kristale, primerne za določitev strukture, kar bo omogočilo še natančnejše virtualno rešetanje spojin. S pomočjo napovednih metod bomo opredelili njihovo toksičnost, njene lastnosti pa poskusili še izboljšati s ponovnim krogom virtualnega rešetanja in testiranja. Nov krog 50 možnih inhibitorjev je v zaključni fazi

poskusov.

Protiglavno aktivnost najbolj obetavnih protiglavnih učinkovin, ki jih bomo določili na osnovi spojine vodnice, bomo ovrednotili na naboru 16 različnih vrst *Aspergillus*, ki smo jih pridobili v okviru konzorcija EUFGEN (EURotiales Functional GENomics consortium, <http://www.eufgen.org/>) iz nizozemske zbirke CBS-KNAW fungal biodiversity center. Za najbolj obetavne protiglavne učinkovine smo se na ustanovi Manchester Academic Health Science Centre (Univerza Manchester, Velika Britanija) dogovorili še za testiranje na kliničnih sevih človeškega patogena *A. fumigatus*.

Z enakimi metodami smo pokazali protiglavno delovanje tudi za sedem derivatov cimetne kisline. Za pojasnitev mehanizmov delovanja derivatov cimetne kisline, smo proučevali interakcije med temi spojinami in aktivnim mestom citokroma CYP53A15 iz glive *C. lunatus*. Cimetna kislina in vsaj štirje izmed 42 testiranih derivatov, zavirajo encimsko aktivnost CYP53A15. Z opredelitvijo izbranih derivatov cimetne kisline kot možnih protiglavnih sredstev, in družino encimov CYP53 kot njihovo potencialno tarčo, smo pokazali na drugi potencialni sistem za razvoj protiglavnih sredstev. Znanstveni članek (angleški naslov: Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53)) smo ravnokar poslali v revijo PLOS ONE.

Tematiko projekta smo predstavili v 7 predavanjih in na 13 plakatih na različnih domačih in mednarodnih konferencah.

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

Kratek pregled projekta:

1. Iskanje kandidatnih genov citokromov P450
 - 1.1 Gliva *C. lunatus*
 - 1.2 Bioinformatika (*C. heterostrophus*)
2. Izbor substratov iz sirka
3. Rekombinantno izražanje citokromov P450 v bakteriji *E. coli* in kvasovki *S. cerevisiae*
4. Pregledovalni testi za funkcionalno določitev citokromov P450
 - 4.1 Kisikov test
 - 4.2 Metoda presejevalne diferencialne fluorimetrije
 - 4.3 Testi protiglavnega delovanja
5. Ovrednotenje izbranih genov citokromov P450
 - 5.1 Modeliranje strukture citokromov P450
 - 5.2 Doking študije

Plan za 1. leto:

- a) Anotacija citokromov P450 pri nitasti glivi *C. heterostrophus*
- b) Izbira sintetičnega koktajla substanc in priprava ekstrakta iz rastlin *Sorghum*
- c) Indukcija nitaste glive *C. lunatus* in priprava cDNA knjižnice
- d) Identifikacija genov P450 na podlagi zaporedja DNA

Plan za 2. leto:

- a) Izbor potencialnih detoksifikacijskih P450
- b) Rekombinantno izražanje genov za P450

Plan za 3. leto:

- a) Čiščenje rekombinantno izraženih P450 in določitev aktivnosti z različnimi testi (spektrofotometrično, tudi poskus rekonstitucije)
- b) Izbor potencialnih inhibitorjskih substanc
- c) Analiza potencialnih inhibitorjskih substanc s kisikovim testom, z metodo diferenčne presejevalne fluorimetrije (DSF) ter in vivo testom na agarnih ploščah

Ocenjujemo, da je realizacija projekta dobra. Vzpostavili smo uporabne pregledovale teste za določitev funkcije citokromov P450 in poleg predvidenih, dodali še druge. Na citokromu P450 CYP53A15 smo preverili in ovrednotili metode načrtovanja in dejanskega delovanja načrtanih inhibitorjev. Določili smo potencialno spojino vodnico s protiglavnim delovanjem, ki lahko vodi v razvoj novih (fito)farmaceutskih sredstev. Izbrana spojina vodnica predstavlja dobro izhodišče, ker njeno delovanje ni omejeno samo na glivo *C. lunatus*. Stopili smo tudi že korak naprej, z vrednotenjem drugega kroga spojin, izbranih na osnovi spojine vodnice, in že določili nekaj spojin z izboljšano protiglavno aktivnostjo. V laboratoriju poteka izražanje in izolacija nekaterih

izmed citokromov P450, ki jih bomo funkcijsko opredelili. Določitev genoma glive (dodatno), skupaj z obstoječimi (in novimi) transkriptomskimi podatki, omogoča razširitev nabora tarčnih citokromov P450. Citokrom CYP53A15 se izkazal kot zelo zanimiva tarča, zato smo več pozornosti posvetili iskanju inhibitorjev za to tarčo, kot iskanju novih. Z opredelitvijo izbranih derivatov cimetne kisline kot možnih protiglivnih sredstev, in družino encimov CYP53 kot njihovo potencialno tarčo, ki smo pokazali na drugi možen sistem za razvoj protiglivnih sredstev.

6. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁵

Smatramo, da manjša odstopanja niso bistvena in niso vodila do sprememb raziskovalnega projekta. Prav tako niso imele na realizacijo projekta bistvenega vpliva izvedene kadrovske spremembe.

7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

	Znanstveni dosežek		
1.	COBISS ID	30257369	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Z virtualnim rešetanjem izbrani protiglivni inhibitorji za novo tarčo, benzoatno 4-monooksigenazo.
		ANG	Virtual screening yields inhibitors of novel antifungal drug target, benzoate 4-monooxygenase
	Opis	SLO	Glivni encimi iz družine CYP53 so dobro ohranjeni proteini, vključeni v razstrupljanje fenolnih spojin in ker ni homologov pri višjih evkariontih, so zanimivi kot možne tarče za delovanje učinkovin. Da bi našli nove inhibitorje, smo vzporedno uporabili dve različni metodi virtualnega rešetanja knjižnjic spojin, najbolj obetavne zadetke smo nato ovrednotili glede na vezavne spektre, protiglavno delovanje in inhibicijo katalitične aktivnosti encima. Glede na zbrane podatke smo kot najboljšo kandidatno spojino vodnico za nadaljni proces iskanja protiglavnega sredstva izbrali 3-metil-4-(1H-pirol-1-il)benzojsko kislino (spojino 2).
		ANG	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 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: 4.675; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.199; A'': 1; 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	4729882	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Mnogostranskost glivnega citokrom P450 monooksigenaznega sistema je ključnega pomena pri ksenobiotičnem razstrupljanju
		ANG	The versatility of the fungal cytochrome P450 monooxygenase system is instrumental in xenobiotic detoxification
			Citokromi P450 (CYP) katalizirajo različne reakcije in so ključni encimi v glivnem primarnem in sekundarnem metabolizmu ter ksenobiotičnem razstrupljanju. Encimatske lastnosti CYP in substratna specifičnost določajo

	Opis	SLO	izid reakcije, vendar ugotavljamo, da na izid reakcije lahko vplivajo tudi njihovi redoks partnerji. Nitaste glive s številnimi CYP imajo pogosto več mikrosomalnih redoks partnerjev, citokrom P450 reduktaz (CPR). Cilj je funkcionalno določiti dva endogena glivna P450 sistema in osvetliti verjetno fiziološko vlogo CPR1 in CPR2 v rastlinski patogeni askomiceti <i>Cochliobolus lunatus</i> . Če smo za rekonstitucijo uporabili CPR1, je CYP53A15 pretvoril benzojsko in 3-metoksibenzojsko kislino drugače, kot če je bil redoks partner CPR2. Naše študije kažejo, da je CPR1 pomembna za primarni metabolizem, medtem, ko je vloga CPR2 drugje.
		ANG	Cytochromes P450 (CYPs) catalyse diverse reactions and are key enzymes in fungal primary and secondary metabolism, and xenobiotic detoxification. CYP enzymatic properties and substrate specificity determine the reaction outcome. However, CYP-mediated reactions may also be influenced by their redox partners. Filamentous fungi with numerous CYPs often possess multiple microsomal redox partners, cytochrome P450 reductases (CPRs). Our objective was to functionally characterize two endogenous fungal cytochrome P450 systems and elucidate the putative physiological roles of CPR1 and CPR2 in the plant pathogenic ascomycete <i>Cochliobolus lunatus</i> . When reconstituted with CPR1, CYP53A15 converts benzoic acid and 3-methoxybenzoic acid differently, as when the redox partner is CPR2. Our studies also indicate that CPR1 is important in primary metabolism, whereas CPR2 plays a role elsewhere.
	Objavljeno v		Blackwell Scientific; Molecular microbiology; 2011; Vol. 85, iss. 5; str. 1374-1389; Impact Factor: 5.010; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.321; A': 1; WoS: CQ, QU; Avtorji / Authors: Lah Ljerka, Podobnik Barbara, Novak Metka, Korošec Branka, Berne Sabina, Vogelsang Matjaž, Kraševac Nada, Zupanec Neja, Stojan Jure, Bohlmann Joerg, Komel Radovan
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁷

	Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID	4962586	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Naslov projekta: <i>Cochliobolus</i> : razširjeno in poglobljeno
		ANG	Project titled: <i>Cochliobolus</i> : expanded and deepened
	Opis	SLO	Na osnovi projektnega predloga B. Gillian Turgeon, Univerza Cornell, ZDA in Nada Kraševac, Kemijski inštitut, Ljubljana, CSP 336 (2010) je projekt financiral Urad za znanost ameriškega Ministrstva za energetiko (Dogovor št. DE-AC02-05CH11231; finančni znesek ni številčno opredeljen). Na inštitutu Joint Genome Institute (JGI) so opravili določanje nukleotidnega zaporedja genoma v okviru javnega programa določevanja genomov (CSP 2011). Namen je raziskovalcem zagotoviti dostop do visoko zmogljivega sekvenciranja za projekte, ki so zanimivi za njihovo poslanstvo. Projekte izberejo glede na znanstveno vrednost in glede na pomembnost za razumevanje tem kot so: globalno kroženje ogljika, alternativni načini produkcije energije in biogeokemije. Cilj projekta je zbirko genomov gliv <i>Dothideomycetes</i> razširiti z dodatnimi žitnimi patogeni: <i>Cochliobolus lunatus</i> , <i>C. victoriae</i> , <i>C. carbonum</i> in <i>C. miyabeanus</i> .
			Based on CSP Proposal 336 (2010) from collaborators: B. Gillian Turgeon, Cornell University & Nada Kraševac, National Institute of Chemistry, Ljubljana, Slovenia, was the project supported by the Office of Science of the U.S. Department of Energy under Contract No. DE-AC02-05CH11231. The work was conducted by the Joint Genome Institute (JGI) Community Sequencing Program (CSP 2011). CSP is created to provide the scientific

		ANG	community at large with access to high-throughput sequencing at JGI for projects of relevance to DOE missions. Sequencing projects are chosen based on scientific merit and relevance to issues in global carbon cycling, alternative energy production, and biogeochemistry. Projekt aim is to add additional fungal cereal pathogens: Cochliobolus lunatus, C. victoriae, C. carbonum, and C. miyabeanus, to the Dothideomycete genome collection.
	Šifra		D.01 Vodenje/koordiniranje (mednarodnih in domačih) projektov
	Objavljeno v		KRAŠEVEC, Nada. Cytochromes P450 from Cochliobolus species: [lecture at] Dothideomycete Workshop-ECFG11, 3rd April, 2012, Marburg, Deutschland. Marburg, 2012. [COBISS.SI-ID 4962586]
	Tipologija		3.15 Prispevek na konferenci brez natisa
2.	COBISS ID		Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO	Določitev genoma fitopatogene glive Cochliobolus lunatus
		ANG	Genome sequencing of phytopathogen fungus Cochliobolus lunatus
	Opis	SLO	Zbirko genomov gliv iz skupine Dothideomycete smo razširili z dodatnimi žitnimi patogeni kot so: C. lunatus, C. victoriae, C. carbonum in C. miyabeanus. Velikost novih genomov je v značilnem območju 30-40 Mb, uporabljeni so bili podobni pristopi kot pri de novo in re-sekvenciranju seva O in T glive C. heterostrophus. # Objava genoma na spletni strani: Cochliobolus lunatus m118 v1.0; http://genome.jgi-psf.org/Coclu1/Coclu1.home.html) (1. verzija, februar 2012) Cochliobolus lunatus m118 v2.0; http://genome.jgi-psf.org/Coclu2/Coclu2.home.html) (2. verzija, maj 2012). # Objava novice v časopisu: Slovenski raziskovalci sodelovali pri določevanju genoma patogene glive (priloga Znanost, Delo, 9.3.2012) Predavanja na delavnicah v okviru mednarodnih znanstvenih srečanj: # Kraševac Nada. Cytochromes P450 from Cochliobolus species: [lecture at] Dothideomycete Workshop-ECFG11, 3rd April, 2012, Marburg, Deutschland. Marburg, 2012. [COBISS.SI-ID 4962586] # Javornik Branka, Gunde-Cimerman Nina, Plemenitaš Ana, Kraševac Nada. Fungal comparative genomics in Slovenia. V: Janežič Sandra (ur.), Benčina Mojca (ur.), Rupnik Maja (ur.), Gradišar Helena (ur.). 9th Congress of the Slovenian Biochemical Society [also] 5th Congress of the Slovenian Microbiological Society with International Participation [also] 3rd CEFORM (Central European Forum for Microbiology), Maribor, 12th - 15th October 2011. Abstract book. Maribor: Zavod za zdravstveno varstvo, 2011, str. 46. [COBISS.SI-ID 28997593] # Nada Kraševac. Sequencing and analysis of cytochrome P450s in Cochliobolus lunatus - update. Dothideomycetes Comparative Genomics workshop - Dothideomycetes genome sequencing: status and future needs; 27th Fungal Genetics Conference; Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, California, March 12, 2013.
			The collection of genomes from Dothideomycete fungi was extended by additional cereal, pathogens such as C. lunatus, C. victoriae, C. carbonum and C. miyabeanus. Size of new genomes is in the typical range of 30-40 Mb, approaches similar to those of de novo and re-sequencing strain O and T of fungus C. heterostrophus. # Genome web page: Cochliobolus lunatus m118 v1.0; http://genome.jgi-psf.org/Coclu1/Coclu1.home.html) (Version 1, February 2012) Cochliobolus lunatus m118 v2.0; http://genome.jgi-psf.org/Coclu2/Coclu2.home.html) (Version 2, Mai 2012). # Newspaper publishing: Slovenian researchers contributed to genome sequencing of pathogenic fungus (in: Znanost, Delo, 9.3.2012) Lectures at workshops of scientific meetings:

			# Kraševac Nada. Cytochromes P450 from Cochliobolus species: [lecture at] Dothideomycete Workshop-ECFG11, 3rd April, 2012, Marburg, Deutschland. Marburg, 2012. [COBISS.SI-ID 4962586] # Javornik Branka, Gunde-Cimerman Nina, Plemenitaš Ana, Kraševac Nada. Fungal comparative genomics in Slovenia. V: Janežič Sandra (ur.), Benčina Mojca (ur.), Rupnik Maja (ur.), Gradišar Helena (ur.). 9th Congress of the Slovenian Biochemical Society [also] 5th Congress of the Slovenian Microbiological Society with International Participation [also] 3rd CEFORM (Central European Forum for Microbiology), Maribor, 12th - 15th October 2011. Abstract book. Maribor: Zavod za zdravstveno varstvo, 2011, str. 46. [COBISS.SI-ID 28997593] #Nada Kraševac. Sequencing and analysis of cytochrome P450s in Cochliobolus lunatus - update. Dothideomycetes Comparative Genomics workshop; 27th Fungal Genetics Conference; Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, California, March 12, 2013.
	Šifra	F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz
	Objavljeno v	Cochliobolus lunatus m118 v2.0; http://genome.jgi-psf.org/Coclu2/Coclu2.home.html	
	Tipologija	3.25	Druga izvedena dela
3.	COBISS ID	246737408	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Mentorstvo doktorantom in diplomantom
		ANG	Tutoring for postgraduate and undergraduent students
	Opis	SLO	V proces raziskav smo vključili tudi dodiplomske in podiplomske študentke, bodoče visoko izobražene strokovnjakinje in raziskovalke, ki so izdelale dve diplomski deli in dve doktorski nalogi. MERZDOVNIK, Judita. Priprava rekombinantne benzoatne parahidroksilaze za kristalizacijske študije : diplomsko delo = Preparation of recombinant benzoate para-hydroxylase for crystallization studies : university studies. Ljubljana: [J. Merzdovnik], 2010. X, 55 f., ilustr. [COBISS.SI-ID 34480645] ŠULIGOJ, Erika. Preizkušanje možnih inhibitorjev benzoat 4-monooksigenaze kot novih protiglivnih učinkovin : diplomsko delo Testing potential inhibitors of benzoate 4-monooksigenaze as new antifungal agents : university studies. Ljubljana: [E. Šuligoj], 2012. XI, 58 f., ilustr. [COBISS.SI-ID 35823109] PODOBNIK, Barbara. Funkcijska analiza citokroma P450 para-benzoatne hidroksilaze pri nitasti glivi Cochliobolus lunatus : doktorska disertacija = Functional analysis of cytochrome P450 para-benzoatne hydroxylase from filamentous fungus Cochliobolus lunatus. Ljubljana: [B. Podobnik], 2010. X, 82 f., ilustr., tabele. [COBISS.SI-ID 253816832] LAH, Ljerka. Evolucijski in biološki vidiki reduktaz citokromov P450 pri glivah : doktorska disertacija = Evolutionary and biological aspects of fungal cytochrome P450 reductases : doctoral thesis. Ljubljana: [L. Lah], 2009. XIV, 94 str., ilustr., tabele. [COBISS.SI-ID 246737408]
		ANG	Young undergraduate and postgraduate students, future specialists and researchers, were involved in the research process as well; their work is resulting in the form of two diplomas and two doctoral thesis. MERZDOVNIK, Judita. Priprava rekombinantne benzoatne parahidroksilaze za kristalizacijske študije : diplomsko delo = Preparation of recombinant benzoate para-hydroxylase for crystallization studies : university studies. Ljubljana: [J. Merzdovnik], 2010. X, 55 f., ilustr. [COBISS.SI-ID 34480645] ŠULIGOJ, Erika. Preizkušanje možnih inhibitorjev benzoat 4-monooksigenaze kot novih protiglivnih učinkovin : diplomsko delo Testing potential inhibitors of benzoate 4-monooksigenaze as new antifungal

		agents : university studies. Ljubljana: [E. Šuligoj], 2012. XI, 58 f., ilustr. [COBISS.SI-ID 35823109] PODOBNIK, Barbara. Funkcijska analiza citokroma P450 para-benzoatne hidroksilaze pri nitasti glivi Cochliobolus lunatus : doktorska disertacija = Functional analysis of cytochrome P450 para-benzoatne hydroxylase from filamentous fungus Cochliobolus lunatus. Ljubljana: [B. Podobnik], 2010. X, 82 f., ilustr., tabele. [COBISS.SI-ID 253816832] LAH, Ljerka. Evolucijski in biološki vidiki reduktaz citokromov P450 pri glivah : doktorska disertacija = Evolutionary and biological aspects of fungal cytochrome P450 reductases : doctoral thesis. Ljubljana: [L. Lah], 2009. XIV, 94 str., ilustr., tabele. [COBISS.SI-ID 246737408]	
	Šifra	D.09 Mentorstvo doktorandom	
	Objavljeno v	[L. Lah]; 2009; XIV, 94 str.; Avtorji / Authors: Lah Ljerka	
	Tipologija	2.08 Doktorska disertacija	
4.	COBISS ID	258116096	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Organizacijski odbor znanstvenega srečanja
		ANG	Organizing Committee of a scientific congress
	Opis	SLO	V letu 2011 smo v Mariboru od 12. - 15. oktobra organizirali skupni kongres, ki je vključeval 9. Srečanje Slovenskega biokemijskega društva in 5. Srečanje Slovenskega mikrobiološkega društva (SMD) - z mednarodno udeležbo, ter 3. Centralno evropski forum za mikrobiologijo. V sklopu kongresa smo organizirali okroglo mizo z naslovom: "Inovacije in prenos tehnologije v znanosti" in posvet z naslovom: "Vpliv (prehrambeno) mikrobiološkega izobraževanja na prakso varnih živil". Srečanja se je udeležilo preko 270 udeležencev.
		ANG	In the year, a meeting was organized in Maribor from 12th-15th October in a form of Joint congress: 9th Congress of the Slovenian Biochemical Society and 5th Congress of the Slovenian Microbiological Society - with International Participation and 3rd CEFOR Central European Forum for Microbiology). The meeting included also a round table entitled: "Innovations and technology transfer in science and workshop entitled: "Microbiology education and consequences for food safety practice". The meeting was attended by over 270 participants.
	Šifra	B.01 Organizator znanstvenega srečanja	
	Objavljeno v	Zavod za zdravstveno varstvo; 2011; 298 str.; Avtorji / Authors: Janežič Sandra, Benčina Mojca, Rupnik Maja, Gradišar Helena	
	Tipologija	2.25 Druge monografije in druga zaključena dela	

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

Iz rezultatov projekta smo napisali še en znanstveni članek, ki je v času priprave tega poročila v oceni pri recenzentih:

Branka Korošec, Matej Sova, Samo Turk, Nada Kraševac, Metka Novak, Ljerka Lah, Jure Stojan, Barbara Podobnik, Sabina Berne, Neja Zupanec, Marko Bunc, Stanislav Gobec, Radovan Komel. Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53). PLOS ONE, Mar. 2013.

(Abstrakt: 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. In our work we showed high antifungal activity of seven cinnamic acid derivatives against *C. lunatus*, and two other fungi, *A. niger* and *P. 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. Further, we demonstrated that cinnamic acid and at least

four of the 42 tested derivatives inhibit CYP53A15 enzymatic activity. By identifying selected derivatives of cinnamic acid as possible antifungal drugs, and CYP53 family enzymes as their targets, we have revealed a potential inhibitor-target system for antifungal drug development.)

Prav tako bo, prav na zaključni rok oddaje tega poročila, tematika članka predstavljena kot predavanje in plakat na mednarodni konferenci:

Branka Korošec, Barbara Podobnik, Sabina Berne, Neja Zupanec, Metka Novak, Nada Kraševac, Samo Turk, Matej Sova, Ljerka Lah, Jure Stojan, Stanislav Gobec, Radovan Komel. Inhibition of benzoate 4-monooxygenase (CYP53A15) from *Cochliobolus lunatus* by cinnamic acid derivatives. 27th Fungal Genetics Conference; Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, California, March 12-17, 2013.

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

10.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

V naravi vlada dinamično ravnovesje med virulenčnostjo glivnega patogena in odpornostjo (rastlinskega) gostitelja. Gliva ogroža rastlino z virulenčnimi dejavniki, obenem pa mora razstrupljati obrambne spojine gostitelja. V endogenih biosintetskih poteh naravnih produktov imajo ključno vlogo citokromi P450, ki pa so prav tako življenjskega pomena pri njihovi razgradnji. Določanje glivnih genomov je razkrilo veliko število citokromov P450 pri vrstah z nitasto obliko rasti, pri čemer za večino velja, da ne sodijo v nobeno že znano družino CYP, njihova vloga v organizmih pa ostaja nerazkrita. Razmeroma počasen napredek določevanja funkcije specifičnim citokromom P450, zato predstavlja izziv za znanost. Izviren je pristop k razvijanju novih protiglivnih učinkovin, saj temelji na inhibiciji glivnih obrambnih citokromov P450 z malimi molekulami, analogi rastlinskih obrambnih spojin, oz. kar z naravnimi obrambnimi spojinami, za prevlado v spopadu specifične glive in gostitelja.

ANG

In nature, a dynamic equilibrium is maintained between the virulence of a fungal pathogen and the resistance of its (plant) host. Fungi attack plants with an array of virulence factors, yet at the same time they must detoxify defense compounds released by their hosts. In endogenous biosynthetic pathways of these natural products cytochromes P450 play key role, but they are also of vital importance in their degradation. Fungal genome sequencing projects have revealed high numbers of cytochromes P450 in species with filamentous growth form, but great majority of these cytochromes P450 are orphan genes in the sense that they do not fall into any of the known CYP families. As such, their function in the organism remains a mystery. Thus, the relatively slow progress of assigning function to specific cytochromes P450s poses a challenge. Original approach in developing new antifungal compounds is based on inhibitory action on fungal defense cytochromes P450 executed by small organic molecules, analogues of plant defense compounds, or directly by natural defense compounds which are heterologous to a specific fungus – host relationship.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Zaključeni projekt je usklajen z nacionalnim raziskovalnim in razvojnim programom. Vede o življenju in zdravju so prednostno področje, ki obeta ekonomske koristi najvišjih dodanih vrednosti, kot ugotavljajo v slovenski Resoluciji o nacionalnem in razvojnim programu. Vlaganje v raziskave v genomiki in biotehnologiji za zdravje je prioriteta javnega poziva, ki jo zaključeni projekt izpolnjuje. Eden izmed osrednjih ciljev te resolucije je tudi vzpodbujanje poslovnih družb - nosilk visoke tehnologije. Projektni partner, farmacevtska družba Lek, vlaga velik delež dobička v razvoj in raziskave, odraz česar so izdelki z visoko dodano vrednostjo. Dodatna vlaganja v raziskovalno področje zdravil so zagotovilo za odpiranje novih delovnih mest, predvsem za visoko izobražene delavce, ki prihajajo iz fakultet in inštitutov po končanih programih usposabljanja mladih raziskovalcev. V zaključenem projektu smo potrdili in vzpostavili še tesnejše sodelovanje s slovenskimi, kakor tudi uglednimi mednarodnimi raziskovalnimi skupinami.

ANG

This research agrees with the national research and development programme. The field of life sciences is a priority field with great economic promises and the highest added value, as already designated in the Slovenian National and Developmental Resolution programme. Investment in genomic and biotechnology research for health is the priority of the public appeal, and the completed project fulfils it entirely. One of the central goals of this resolution is also strengthening of business companies – the bearers of high technology. The project partner Lek Pharmaceuticals is a company investing a large proportion of profits into research and development which is reflected in products with a high added value. Additional investments into the field of drug discovery ensure much needed job openings, mostly for highly educated workers coming from universities and institutes following their education in the junior researcher programme. In the completed project we have reestablished and strengthened the cooperation with Slovenian as well as distinguished international research groups.

11. 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

--

12.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

--

13. Pomen raziskovanja za sofinancerje¹²

	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		

14. Izjemni dosežek v letu 2012¹³**14.1. Izjemni znanstveni dosežek**

Z virtualnim rešetanjem izbrani protiglivični inhibitorji za novo tarčo, benzoatno 4-monooksigenazo
 Vir: Berne Sabina, Podobnik Barbara, Zupanec Neja, Novak Metka, Kraševac Nada, Turk Samo, Korošec Branka, Lah Ljerka, Šuligoj Erika, Stojan Jure, Gobec Stanislav, Komel Radovan. Virtual screening yields inhibitors of novel antifungal drug target, benzoate 4-monooxygenase. Journal of chemical information and modeling; 2012; Vol. 52, str. 3053-3063; A": 1; A': 1; Izvirni znanstveni članek COBISS.SI-ID 30257369

14.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Določitev genoma fitopatogene glive *Cochliobolus lunatus*
 Vir: spletna stran <http://genome.jgi.doe.gov/Coclu2/Coclu2.home.html>

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

Nada Kraševac

ŽIG

Kraj in datum: Ljubljana 8.3.2013

Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2013/10

¹ Opredelite raziskovalno področje po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science). Prevajalna tabela med raziskovalnimi področji po klasifikaciji ARRS ter po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science) s kategorijami WOS (Web of Science) kot podpodročji je dostopna na spletni strani agencije (<http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/preslik-vpp-fos-wos.asp>). [Nazaj](#)

² Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

³ 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](#)

⁴ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

⁵ 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](#)

⁶ 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](#)

⁷ 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](#)

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁹ 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](#)

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

¹¹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹² 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](#)

¹³ Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2012 (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](#)

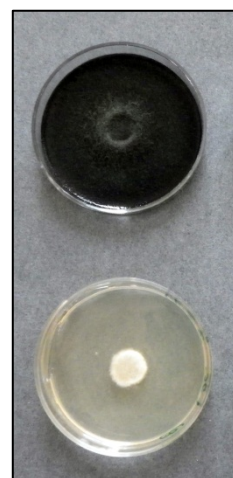
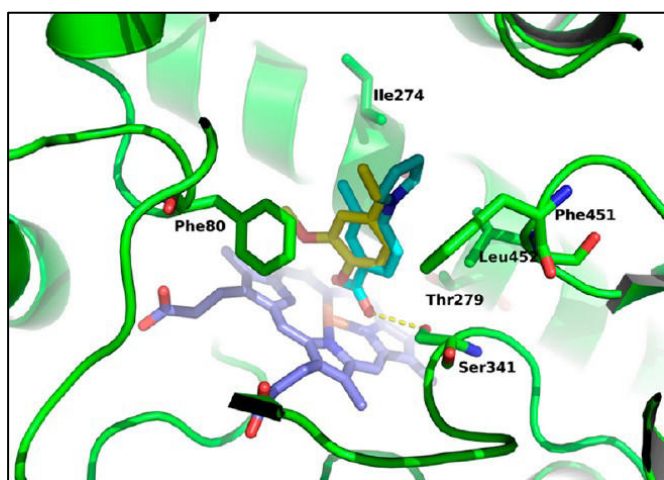
Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2013 v1.00
6F-51-6D-F2-4E-A0-F0-09-63-BF-EC-1A-C5-03-1D-1C-72-AE-86-D5

BIOTEHNIKA

Področje: 4.06 – Biotehnologija

Dosežek 1: Z virtualnim rešetanjem izbrani protiglivi inhibitorji za novo tarčo, benzoatno 4-monooksigenazo

Vir: Berne Sabina, Podobnik Barbara, Zupanec Neja, Novak Metka, Kraševac Nada, Turk Samo, Korošec Branka, Lah Ljerka, Šuligoj Erika, Stojan Jure, Gobec Stanislav, Komel Radovan. Virtual screening yields inhibitors of novel antifungal drug target, benzoate 4-monooxygenase. Journal of chemical information and modeling; 2012; Vol. 52, str. 3053-3063; A": 1;A': 1; Izvirni znanstveni članek COBISS.SI-ID 30257369



Glivni encimi iz družine CYP53 so dobro ohranjeni proteini, vključeni v razstrupljanje fenolnih spojin in ker ni homologov pri višjih evkariontih, so zanimivi kot možne tarče za delovanje učinkovin. Da bi našli nove inhibitorje, smo vzporedno uporabili dve različni metodi virtualnega rešetanja knjižnic spojin, najbolj obetavne zadetke smo nato ovrednotili glede na vezavne spektre, protiglivično delovanje in inhibicijo katalitične aktivnosti encima. Glede na zbrane podatke smo kot najboljšo kandidatno spojino vodnico za nadaljni proces iskanja protiglivičnega sredstva izbrali 3-metil-4-(1H-pirol-1-il)benzojsko kislino (spojino 2).

Glivni citokromi P450, vključeni v detoksifikacijo rastlinskih obrambnih spojin, kot tarče novih protiglivičnih učinkovin

Temeljni raziskovalni projekt J4-2212 (1.5.2009 - 30.4.2012) vodja dr. Nada Kraševac

Funkcijska genomika in biotehnologija za zdravje

Program P1-0104 (1.1.2009-31.12.2014) vodja prof. dr. Radovan Komel

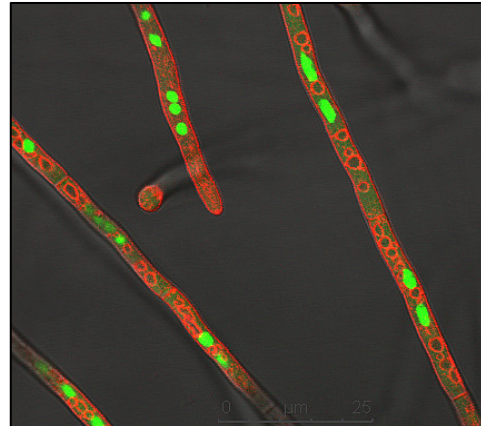


BIOTEHNIKA

Področje: 4.06 – Biotehnologija

Dosežek 2: Določitev genoma fitopatogene glive *Cochliobolus lunatus*

Vir: spletna stran <http://genome.jgi.doe.gov/Coclu2/Coclu2.home.html>



V naravi vlada dinamično ravnovesje med virulenčnostjo glivnega patogena in odpornostjo rastlinskega gostitelja. Gliva ogroža rastlino z virulenčnimi dejavniki, hkrati pa razstruplja obrambne spojine gostitelja. V kmetijstvu povzročajo glivne okužbe žitaric izgubo pridelka in veliko škodo. Sirek (*Sorghum*) je peta najpomembnejša žitarica v svetovnem merilu, namenjena prehrani ljudi in živali, pridobivanju bioetanola in industrijskih proizvodov. Nitasta zaprtotrosnica *Cochliobolus lunatus* (*Curvularia lunata*) je naravni patogen na omenjeni rastlini. Zbirko genomov gliv iz skupine Dothideomycete smo razširili z dodatnimi žitnimi patogeni: *C. lunatus*, *C. victoriae*, *C. carbonum* in *C. miyabeanus*. Velikost novih genomov je v značilnem območju 30-40 Mbp.

Cochliobolus: razširjeno in poglobljeno (*Cochliobolus*: expanded and deepened) skupaj z B. Gillian Turgeon, Univerza Cornell, ZDA. Projekt je financiral oddelek za znanost ameriškega Ministrstva za energetiko (Dogovor št. DE-AC02-05CH11231).



Glivni citokromi P450, vključeni v detoksifikacijo rastlinskih obrambnih spojin, kot tarče novih protiglivnih učinkovin

Temeljni raziskovalni projekt J4-2212 (1.5.2009 - 30.4.2012) vodja dr. Nada Kraševce

Funkcijska genomika in biotehnologija za zdravje

Program P1-0104 (1.1.2009-31.12.2014) vodja prof. dr. Radovan Komel

