

Vloga Biotehniške fakultete, Univerza v Ljubljani: Koordinator
 Naslov projekta: **Razvoj encimskega preparata za razgradnjo s prioni kontaminiranih površin.**

Koordinator: Prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

ARRS šifra: L7-8277 (C)

Osnovne informacije o financiranju

Trajanje: 1.5.2017 - 30.04.2019

Obseg financiranja: 1,58 FTE

Sodelujoče raziskovalne organizacije

ARRS šifra	Raziskovalna organizacija	Status
0481	Biotehniška fakulteta Univerza v Ljubljani	Fakulteta (koordinator)
0406	Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani	Fakulteta
0787	Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov	Zasebni raziskovalni zavod
/	Borer Chemie AG Borer	Zasebno podjetje

Membership of the project team

Ime in priimek	ARRS šifra	raziskovalno področje	Vloga
Avbelj Martina	28299	Biotehnologija/mikrobna biotehnologija	Raziskovalec
Bahun Miha	39095	Biokemija in molekularna biologija	Mladi raziskovalec
Čadež Neža	18332	Biotehnologija/mikrobna biotehnologija	Raziskovalec
Juntos Polona	04630	Veterinarska medicina / Animalna patologija in epizootiologija	Raziskovalec
Karničar Katarina	32503	Biotehnologija/mikrobna biotehnologija	Raziskovalec
Lindner Vilma	50382		Tehniški sodelavec
Mubi Irena	50383		Tehniški sodelavec
Osojnik Črnivec Ilya Gasan	29336	Kemija / Fizikalna kemija	Raziskovalec
Paš Maja	15618	Biotehnologija/mikrobna biotehnologija	Raziskovalec
Petković Hrvoje	13542	Biotehnologija / Tehnologija rekombinantne DNA	Raziskovalec
Poklar Ulrih Nataša	10873	Kemija / Fizikalna kemija	Vodja
Prislan Iztok	23417	Kemija / Fizikalna kemija	Raziskovalec
Ropret Sandra	35360	Biotehnologija/mikrobna biotehnologija	Raziskovalec
Šnajder Marko	30763	Biokemija in molekularna biologija	Raziskovalec
Taler - Verčič Ajda	29544	Biokemija in molekularna biologija	Raziskovalec
Turk Dušan	04988	Biokemija in molekularna biologija	Raziskovalec
Zabavnik Piano Jelka	08506	Veterinarska medicina / Animalna patologija in epizootiologija	Raziskovalec

Povzetek

Prenosljive spongiformne encefalopatije (TSE) predstavljajo družino nevrodegenerativnih bolezni živali in ljudi. Pojav humane variante v novi obliki Creutzfeldt-Jakobove bolezni (vCJB), ki je posledica epidemije goveje spongiformne encefalopatije (BSE) v Združenem kraljestvu, je povečal prepoznavnost prenosljive spongiformne encefalopatije kot resno tveganja za javno zdravje po svetu. Obstajajo standardne kemijske in fizikalne metode sterilizacije, ki občutno znižajo možnost prenosa TSE, ampak ga ne popolnoma izključijo. Poleg tega niso primerne za nekatero občutljivo medicinsko opremo in so lahko škodijo zdravlju medicinskega osebja, katero je v stiku s kemikalijami. Obstaja nekaj alkalnih in encimskih detergentov za zmanjšanje prionske infektivnosti, vendar optimalna rešitev vključuje encimski preparat, ki bo deloval v širokem območju temperatur in pH-ja. Leta 2011 smo patentirali postopek za encimsko razgradnjo proteinskih agregatov s pernizinom, kot so infektivnih prioni (PrP^{Sc}) različnih izvorov (miš, govedo, srna, človek) *in vitro*. Pernizin je termostabilna serinska proteaza s potencialno uporabo v mnogih industrijah, od industrije čistil do medicinskega področja, kjer potrebujemo srednje do visoke temperature ob posebnih okoljih (npr. denaturanti, reduktanti in detergenti).

Streptomyces spp. so poznane po tem, da imajo visoko zmožnost izločanja produkta v zunajceličen medij. *Streptomyces* spp. je postal zanimiv zaradi orodij za heterologno ekspresijo: tehnike hitre in enostavne transformacije, dobre fermentacijske sposobnosti in robustnosti izločanja proteina. Leta 2014 smo opisali in zaščitili metodo za prekomerno izražanje pernizina v heterolognih bakterijskih sistemih.

Kljub zmanjšanju klasičnih primerov BSE, prioni še vedno predstavljajo resen zdravstveni problem. Potrebujemo nov, učinkovit in okolju prijazen način inaktivacije, odstranitev in/ali razgradnje s prioni okuženih medicinskih odpadkov in površin.

Glavni cilj je razvoj encimskih preparatov, ki bodo učinkoviti za dekontaminacijo s PrP^{Sc} onesnaženih površin (zmanjšanje infektivnosti prionov vsaj 4,5 log enot), kakor tudi kirurške opreme. Projekt lahko razdelimo na štiri cilje:

(C1) Konstrukcija izboljšanega *Streptomyces* sp. seva s pomočjo genskega inženiringa, naključne mutageneze in razvojem procesa za dodatno povečanje donosa proizvodnje rekombinantnega pernizina z uporabo novega ekspresijskega sistema. Z genskim inženiringom spremeniti gen za pernizin, ki je aktiven brez dodatne aktivacije.

(C2) Biofizikalna in biokemijska karakterizacija rekombinantnega pernizina v prisotnosti različnih raztopin, uporabnih za končno formulacijo učinkovitih izdelkov.

(C3) Nova formulacija izdelka za dekontaminacijo PrP^{Sc} ali drugih proteinskih biofilmov. Izkoristili bomo vsestranskost encima, da razgradi različne substrate. Nova formulacija bo zmanjšala tveganje za prenos TSE.

(C4) Oblikovanje platforme za implementacijo drugih industrijsko pomembnih proteinov. Uporaba enakih metod bo omogočila industrijsko uporabnost drugim biotehnološko perspektivnim encimom.

Cilji projekta in njihova realizacija

Trenutno zaključujemo cilj 3 in se pripravljamo na uresničitev zadnjega cilja.

Bibliografija

Zaključujemo članek, ki bo pripravljen za oddajo v recenzijo reviji dokonca leta. V okviru projekta smo dognanja raziskav predstavili na naslednjih konferencah:

BAHUN, Miha, ŠNAJDER, Marko, HARTMAN, Kevin, HABIČ, Anamarija, POKLAR ULRIH, Nataša. Calcium induced folding of pernizine, a thermostable serine protease from

extremophilic archaeon *Aeropyrum pernix*. V: SZÜTS, Dávis (ur.), BUDAY, László (ur.). *FEBS3+ Conference : [from molecules to living systems] : final programme & book of abstracts : 2-5 September 2018, Siófok, Hungary*. Veszprém: OOK-Press. 2018, str. 125, P3-04. [COBISS.SI-ID [4944248](#)]

ŠNAJDER, Marko, BAHUN, Miha, KRANJC, Luka, PETKOVIĆ, Hrvoje, JUNTES, Polona, POKLAR ULRIH, Nataša. Production and application of thermostable protease pernisine from *Aeropyrum pernix* K1. V: SZÜTS, Dávis (ur.), BUDAY, László (ur.). *FEBS3+ Conference : [from molecules to living systems] : final programme & book of abstracts : 2-5 September 2018, Siófok, Hungary*. Veszprém: OOK-Press. 2018, str. 209, P9-07. [COBISS.SI-ID [4943992](#)]

JUNTES, Polona, ŠNAJDER, Marko, BAHUN, Miha, POKLAR ULRIH, Nataša. Enzymatic degradation of bovine cellular and pathological form of prion proteins and potential use for decontamination. V: *Joint ESVP and ECVP Congress, September 5th - 8th 2018, Cluj-Napoca, Romania*, ESVP and ECVP congress, September 5th-8th 2018, Cluj. Cluj: University of Agricultural sciences and veterinary medicine. 2018, str. 229. <https://www.ecvpath.org/joint-esvp-and-ecvp-congress-2018-final-program-abstract-book/>. [COBISS.SI-ID [4664698](#)]

ŠNAJDER, Marko, BAHUN, Miha, KRANJC, Luka, PETKOVIĆ, Hrvoje, POKLAR ULRIH, Nataša. Construction and production of active pernisine in *Streptomyces rimosus*. V: GORIČAR, Katja (ur.), HUDLER, Petra (ur.). *Book of abstracts = Zbornik povzetkov*, 12th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with International Participation = 12. srečanje Slovenskega biokemijskega društva z mednarodno udeležbo, Bled 20 - 23 september 2017. Ljubljana: Slovenian Biochemical Society. 2017, str. 98, PI-24. [COBISS.SI-ID [4817272](#)]

CARRILLO RINCON, Andres Felipe, MAGDEVSKA, Vasilka, KRANJC, Luka, ŠNAJDER, Marko, BAHUN, Miha, PAŠ, Maja, PETKOVIĆ, Hrvoje, POKLAR ULRIH, Nataša. Heterologna produkcija aktivnega pernezina v bakteriji *Streptomyces rimosus*. V: VODOVNIK, Maša (ur.), KUŠAR, Darja (ur.), MARINŠEK-LOGAR, Romana (ur.). *Knjiga povzetkov*, 7. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva, 20.-22. september 2017, Bled, Slovenija. Ljubljana: Slovensko mikrobiološko društvo. 2017, str. 127, Po54. [COBISS.SI-ID [4829816](#)]