

Šifra projekta / Project code J1-4406

CC-Trigger: izpodrivanje proteinskih obvitih vijačnic s pomočjo oprimkov omogoča kinetični nadzor proteinskih sestavov in napredne naprave z več stanji.

CC-Trigger: toehold mediated protein coiled-coil displacement to introduce kinetic control of protein assemblies and advanced multi-state devices.

Vodja projekta:

dr. Ajasja Ljubetič

1. VSEBINSKI OPIS PROJEKTA:

Proteini so najbolj vsestranski gradniki narave, saj katalizirajo ključne reakcije, obdelujejo signale in premikajo tovor s pomočjo konformacijskih sprememb. Razumevanje razmerij med zaporedjem, 3D strukturo in funkcijo proteinov ni le akademske narave, ampak ima tudi velik tehnološki pomen. V zadnjih letih je načrtovanje eno verižnih proteinov postalo dosegljivo. Izziv na tem področju je ustvarjanje večjih dinamičnih proteinskih kompleksov, ki imajo več konformacijskih stanj in/ali opravljajo posebne funkcije. Dinamične beljakovinske komplekse bi lahko uporabili za dostavo zdravil, pametnih odzivnih materialov in biosenzorjev.

Področje nanotehnologije DNA je prineslo neverjetne stroje in dinamične komplekse. Vključno s DNA pinceto, preklopno DNA posodo, sprehajalcem DNA in celo robotom za razvrščanje tovara. Napredek temelji na principu izpodrinjanja verige s pomočjo oprimka. Dvoverižna DNA je izjemno stabilna; vendar pa lahko majhen previs ene verige (oprimek) poveča izmenjavo verig milijonkrat. Na žalost je DNA težje zviti in uporabiti in vivo kot proteinske komplekse.

Namen tega raziskovalnega projekta je vpeljati mehanizem izpodrinjanja verige ovitih vijačnic s pomočjo oprimka in prikazati nekaj primerov uporabe. Nova tehnologija bi lahko omogočila nadzor aktivnosti in lokalizacijo encimov, proteinske sestavke z več stanji ter logična vrata.

Izpodrinjanje verig obvitih vijačnic bi lahko imel velik vpliv na področju načrtovanja proteinov in biomedicine. Nanotehnologija DNA je pokazala, da je načelo izpodrinjanja verig lahko zelo uporabno in vsestransko. Enako vsestranskost in aplikacije bi radi prinesli v bolj biokompatibilen in genetsko kodiran proteinski svet.

Proteins are nature's most versatile workers, catalysing key reactions, processing signals, and moving cargo. Many of those functions occur through conformational changes or reconfigurations of protein complexes. Understanding the relationships between the sequence, 3D structure and function of proteins is not only of academic interest, but is also of great technological importance. The challenge in the field is creating larger dynamic protein assemblies that have several states and/or perform specific functions. Dynamic protein assemblies could be used to build drug delivery vehicles, smart responsive materials, biosensors and many other functions.

DNA nanotechnology has produced amazing machines and multistate assemblies, including tweezers, switchable containers, molecular walkers and even cargo sorting robots. The common feature of those advances is the use of the **principle of toehold strand displacement**, where a DNA strand can displace strongly bound strand from the complex using a single strand toehold. While DNA nanotechnology is easier to program, protein assemblies can perform more versatile range functions.

The aim of this research project is to implement toehold mediated strand displacement principle using coiled coils (CCs) strands and demonstrate several exciting applications that this new technology would enable, for control of enzyme activity and localisation, reconfigurable multistate protein assemblies and logic gates.

CC strand displacement could have a huge impact on protein design and could generate a range of biomedical applications. DNA nanotechnology has already demonstrated that the strand displacement

principle can be extremely powerful and versatile, we aim to bring the same versatility and programmability of applications to the more biocompatible and genetically encodable protein world.

Sodelujoče organizacije:

- EN-FIST CENTER ODLIČNOSTI

a. osnovni podatki glede financiranja:

Projekt financira ARRS v okviru cenovne kategorije D za obdobje treh let v obsegu 1971 letnimi urami za obdobje 3 let. Pričetek financiranja je 1. 10. 2022.

The project is co-financed by ARRS with 1971 annual hours of price class D for a period of 3 years. Funding starts on October 1, 2022.

b. sestava projektne skupine s povezavami na SICRIS

Na Kemijskem inštitutu v projektini skupini sodelujejo / At the National Institute of Chemistry the project group includes:

Ajasja Ljubetič; SICRIS št.: 31709 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/34466>

Eva Rajh; SICRIS št. 55264 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/51964>

Tina Strmljan; SICRIS št. 55061 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/51736>

Špela Malenšek; SICRIS št. 53665 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/50120>

Klemen Mezgec; SICRIS št. 53353 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/49795>

Tina Fink; SICRIS št. 35277 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/40263>

Sara Vidmar; SICRIS št. 52006 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/48325>

2. faze projekta in njihova realizacija

Pri DNA oprimkih morajo imeti verige, katere izpodrivamo, zelo dolge razpolovne dobe, zato domnevamo, da so za delovanje izpodrivanja proteinskih verig potrebne dolge ovite vijačnice.

V DP1 bomo oblikovali prve dolge umetne heterodimerne ovite vijačnice.

V DP2 bomo načrtovali in testirali več konstruktov oprimkov, pri čemer bomo sistematično preučevali dolžino oprimka in dolžino dvoverižnega substrata.

V DP 3 bomo uporabili napredne računalniške metode za načrtovanje ortogonalnih setov dolgih ovitih vijačnic (setov, kjer samo vsaka veriga poveže le s svojim parom). Ortogonalni set bo omogočil več reakcij izpodrinjanja ovitih vijačnic v istem sistemu in konstrukcijo velikih proteinskih origamijev iz ovitih vijačnic.

V DP4 bomo razvili aplikacije sistema, ki bodo prikazovale moč izpodrinjanja verig ovitih vijačnic. Navdih bo vzeta iz sveta nanotehnologije DNA. Pripravili bomo proteinska stikala, proteinski origami z več stanji in logična vrata za obdelavo signalov.

In DNA toeholds, the duplex strands that are being displaced must have very long dissociation half-life, therefore we hypothesize that **long CCs** (which also have slow dissociation) are needed for the CC strand displacement to function. In WP1 we will design the first long artificial heterodimeric CCs, longer than 100 amino acid residues.

In WP2 we will design and test several toehold constructs, systematically studying the effect of the length of the toehold and length of the duplex substrate produced in WP1 on the efficacy and kinetics of displacement.

In WP 3 we will use advanced computational methods to design orthogonal sets of long CCs. The orthogonal set will enable several CC strand displacement reactions in the same system and the construction of large CC protein origami.

WP4 develops proof-of-principle applications that showcase the power of CC strand displacement. We plan to demonstrate two state switches, multistate reconfigurable CCPO assemblies and signal processing logic gates.

3. bibliografske reference, ki izhajajo neposredno iz izvajanja projekta

BOLDRIDGE, W. Clifford, LJUBETIČ, Ajasja, KIM, Hwangbeom, LUBOCK, Nathan, SZILÁGYI, Dániel, LEE, Jonathan, BRODNIK, Andrej, JERALA, Roman, KOSURI, Sriram. A Multiplexed Bacterial Two-Hybrid for Rapid Characterization of Protein-Protein Interactions and Iterative Protein Design. bioRxiv 2020.11.12.377184; doi: [10.1101/2020.11.12.377184](https://doi.org/10.1101/2020.11.12.377184).

4. logotip ARRS in drugih sofinancerjev



arrs

JAVNA AGENCIJA ZA RAZISKOVALNO DEJAVNOST
REPUBLIKE SLOVENIJE