Šifra projekta / Project code **J4-60083**

Načrtovanje mestno-specifičnih rekombinaz za ciljanje terapevtsko pomembnih nukleotidnih zaporedij v genomu / ***Expanding programmability of site-specific recombinases for targeting therapeutically relevant genomic sequences***

Vodja projekta:
dr. Tina Lebar

1. **VSEBINSKI OPIS PROJEKTA:**

Natančen nadzor nad velikimi fragmenti DNK je ključna lastnost molekularnih orodij za urejanje genoma. Tirozinske rekombinaze so kompaktni encimi, prisotni v različnih organizmih, kjer samostojno preurejajo dolga zaporedja DNK z izjemno natančnostjo. Zaradi teh lastnosti imajo velik potencial za terapevtsko urejanje genoma, zlasti pri zdravljenju kompleksnih genetskih bolezni, ki jih povzročajo večkratne mutacije v dolgih genih. Kljub temu pa njihovo reprogramiranje za ciljanje izbranih mest v genomu ostaja velik izziv zaradi kompleksnega načina vezave na DNK. Potrebni so novi pristopi za natančno identifikacijo njihovih determinant specifičnosti za različna nukleotidna zaporedja, visoko zmogljivost karakterizacije njihovih lastnosti vezave DNK, ter s tem povečanje njihove uporabnosti za genske terapije.

Cilj projekta je odkrivanje in karakterizacija novih tirozinskih rekombinaz ter njihovih pripadajočih tarčnih zaporedij v mikrobnih genomih. Z oblikovanjem obsežnih podatkovnih zbirk želimo razumeti mehanizme vezave teh encimov na DNK ter razviti nove koncepte za razširitev njihove tarčne specifičnosti. Načrtovane rekombinaze, sposobne vstavljanja velikih nukleotidnih zaporedij v natančno izbrana mesta človeškega genoma, bi lahko postale močna orodja v genskih terapijah.

Precisely controlled manipulation of large DNA fragments is an essential feature of next-generation genome editors. Tyrosine recombinases are compact enzymes found in diverse organisms, where they autonomously mediate highly precise rearrangements of long DNA sequences. These enzymes hold great potential as genome editing tools for therapeutic applications, particularly in treatment of complex genetic diseases caused by multiple mutations in large genes. However, reprogramming them for targeting selected genomic loci remains a major challenge due to their complex DNA-binding mode. Novel approaches are required to accurately identify their nucleotide specificity determinants, characterize their DNA binding properties in high-throughput, and elevate their utility for gene therapies.

The goal of this project is to discover and characterize novel tyrosine recombinases and their cognate DNA targets in microbial genomes. By building large datasets, we aim to better understand the DNA-binding mechanisms of these enzymes and extract engineering principles to expand their targeting capabilities. Engineered recombinases capable of inserting large payloads into defined locations in the human genome could become powerful gene therapy tools.

Sodelujoče organizacije: Kemijski Inštitut

a. osnovni podatki glede financiranja:

Projekt financira ARIS v okviru cenovne kategorije D za obdobje 3 let v obsegu 1753 letnih ur. Pričetek financiranja je 1.4.2025.
The project is co-financed by ARIS with 1753 annual hours of class D price for a period of 3 years. Funding starts on 1.4.2025.

b. sestava projektne skupine s povezavami na SICRIS

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

dr.Tina Lebar, 34252: https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/38797
dr. Mojca Benčina, 14360: https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/8380
dr. Ajasja Ljubetič, 31709: https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/34466
dr. Tjaša Plaper, 39111: https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/45131
Matea Maruna, 53733: https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/50194
Tina Strmljan, 55061: https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/51736

2. faze projekta in njihova realizacija

Faza 1: Izkoristili bomo naravno "zbirko" rekombinaz s pomočjo računalniškega rudarjenja javno dostopnih genomov. Namen je odkrivanje novih encimov in njihovih tarč. Zbran nabor podatkov bo omogočil opredelitev strukturnih regij za preoblikovanje.

Faza 2: Uporabili bomo več inženirskih pristopov za uvedbo novih nukleotidnih specifičnosti v obstoječe encime. Lastnosti vezave DNK novih encimov bomo določili z visoko zmogljivimi eksperimentalnimi pristopi na osnovi plazmidnih knjižnic ter sekvenciranja naslednje generacije.

Faza 3: Nove načrtovane encime bomo uporabili za vstavljanje velikih kosov DNK v terapevsko relevantne genomske regije v človeških hepatocitih. Uporabili bomo načrtovane knjižnice ter selekcijo prek stabilnega izražanja poročevalca. Najboljše regije bomo dodatno okarakterizirali sekvenciranjem transkriptoma.

Phase 1: We will exploit the natural »collection« of recombinase enzymes via computational mining of publicly available genomes, aiming to discover novel enzymes and their targets. The collected dataset will be use to extract structural regions for engineering.

Phase 2: We will use multiple engineering approaches to introduce new nucleotide specificities into existing enzymes. The DNA binding properties of new enzymes will be characterized using high-throughput experimental approaches based on plasmid libraries and next-generation sequencing.

Phase 3: New designed enzymes will be used to insert large DNA fragments into therapeutically relevant genomic regions in human hepatocytes. We will use custom designed libraries and selection via stable expression of a reporter. Top candidates will be additionally characterized by transcriptome sequencing.

3. **bibliografske reference, ki izhajajo neposredno iz izvajanja projekta**

4. **logotip financerja**

Javna agencija za znanstvenoraziskovalno
in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije