

N4-0037 – *In vivo* zvitje dizajniranega proteina

Vodja projekta:

Prof. dr. Roman Jerala

1. VSEBINSKI OPIS PROJEKTA

Proteini, kodirani z linearnim zaporedjem amino kislin, so najbolj vsestranski in kompleksni pametni nanomateriali. Proteini opravljajo nešteto funkcij od komunikacije do strukturne vloge ter katalize.

Načrtovanje proteinskega zvitja z novo, v naravi nepoznano obliko in funkcijo, je izjemno zahtevno. Nedavno smo zasnovali pionirsko strategijo načrtovanja novih tipov proteinskega zvitja, ki temelji na razumsko zasnovanem zaporednem verižno povezanem nizu peptidnih modulov, ki tvorijo obvite vijačnice. Rekombinantna *de novo* zasnovana polipeptidna veriga se sama sestavi v nanometrsko tetraedrsko kletko. To predstavlja nov tip proteinskega zvitja, pri čemer je celovita ureditev določena s topologijo in ne s kompaktnim hidrofobnim jedrom kot v naravnih proteinih. Predlagani projekt bo razširitev in nadgradnja koncepta načrtovanja topoloških proteinskih zvitij.

Prvi načrtovani tetraeder smo pridobili v bakterijah, kar dokazuje potencialno tehnološko platformo za industrijsko proizvodnjo. Protein tetraedra se je tvoril v obliki netopnih agregatov in fuzija proteina tetraedra z delom YFP v *in vivo* pogojih v bakterijah ni omogočila fluorescence, kar dokazuje, da se protein v *in vivo* pogojih ni zvil v pravilno obliko. Pravilno zvit protein je nastal pri počasnem ponovnem zvitju pri nizkih koncentracijah, kar je podobno sestavljanju nanostruktur DNA. Zahteva po *in vitro* postopku ponovnega zvijanja proteina močno omejuje obseg potencialne uporabnosti tako *in situ* bioloških aplikacij, ki omejujejo uporabo topoloških polipeptidnih nanostruktur, kot tudi *in vitro* aplikacij. To velja tudi za veliko večino nanostruktur DNA, medtem ko je *in vivo* samosestavljanje nanostruktur RNA še predmet intenzivnega raziskovanja. Produkcija pravilno zvitega topološko načrtovanega proteina *in vivo* bo zato predstavljala zelo pomemben napredek. Z njim nameravamo odgovoriti na vprašanje, ali se ta vrsta struktur v naravi ni razvila zaradi nezmožnosti, da se v fizioloških pogojih pravilno zvije. Poleg prednosti za uporabo v tehnologiji, bo *in vivo* zvitje omogočilo interakcije načrtovanih polipeptidnih poliedrov z znotrajceličnimi elementi, načrtovanje molekularnih naprav, medicinske aplikacije, *in vivo* katalizo in številne druge uporabe.

Predlagamo načrtovanje polipeptidnih zaporedij, ki bodo omogočili *in vivo* zvitje preko načrtovane poti zvijanja, ki jo bomo regulirali z izborom tipov in zaporedij modulov, ki tvorijo obvite vijačnice. Razlog za doslej doseženo tvorbo agregatov proteinov *in vivo* je morda v nizki topnosti zaradi površinsko izpostavljenih hidrofobnih skupin, visoke koncentracije proteinov med biosintezo znotraj celic, ki proizvajajo protein, kot tudi obstoj kinetičnih ovir pri zvitju v procesu ponovnega zvijanja za doseganje konformacije z najnižjo globalno energijo. Ti koraki v razvoju bodo vzpostavili temelje na področju in omogočili načrtovanje novih molekularnih naprav.

a. osnovni podatki glede financiranja

Projekt financira ARRS v okviru cenovne kategorije D za obdobje treh let v obsegu 2471 raziskovalnih ur letno, z začetek financiranja 1.9.2015 in zaključkom 31.8.2018.

b. sestava projektne skupine s povezavami na SICRIS

ŠIFRA	Priimek in ime
14360	Benčina Mojca
28337	Drobnak Igor
34529	Forstnerič Vida
17915	Gradišar Helena
06628	Jerala Roman
31709	Ljubetič Ajasja
39048	Prešeren Jure
33201	Smole Anže
38021	Stevović Bojana

2. FAZE PROJEKTA IN NJIHOVA REALIZACIJA

Projekt je razdeljen v dva sklopa:

Sklop 1: Načrtovanje poti zvitja DNA nanostruktur

Sklop 2: Načrtovanje *in vivo* zvitja topoloških proteinov

Mejniki:

- po 1 letu: Uspešno načrtovana samosestavljajoča DNA kvadratna piramida
- po 2 letih: Zvitje načrtovanega polipeptidnega tetraedra *in vivo* v bakterijah
- po 3 letih: Zvitje načrtovane polipeptidne nanostrukture *in vivo* v sesalskih celicah

3. BIBLIOGRAFSKE REFERENCE, KI IZHAJAJO NEPOSREDNO IZ IZVAJANJA PROJEKTA

KOČAR, Vid, SCHRECK, John S., ČERU, Slavko, GRADIŠAR, Helena, BAŠIĆ, Nino, PISANSKI, Tomaž, DOYE, Jonathan P. K., JERALA, Roman. Design principles for rapid folding of knotted DNA nanostructures. *Nature communications*, 2016, 7, 1-8, doi: [10.1038/ncomms10803](https://doi.org/10.1038/ncomms10803). [COBISS.SI-ID [5880858](#)]

LJUBETIČ, Ajasja, DROBNAK, Igor, GRADIŠAR, Helena, JERALA, Roman. Designing the structure and folding pathway of modular topological bionanostructures. *Chemical communications*, 2016, 52, 5220-5229. doi: [10.1039/C6CC00421K](https://doi.org/10.1039/C6CC00421K). [COBISS.SI-ID [5889050](#)]

AUPIČ, Jana, LAPENTA, Fabio, STRMŠEK, Žiga, JERALA, Roman. Towards designing new nano-scale protein architectures. *Essays in Biochemistry*, 2016, 60, 315-324. doi: [10.1042/EBC20160018](https://doi.org/10.1042/EBC20160018). [COBISS.SI-ID [6076186](#)]

BOŽIČ ABRAM, Sabina, AUPIČ, Jana, DRAŽIĆ, Goran, GRADIŠAR, Helena, JERALA, Roman. Coiled-coil forming peptides for the induction of silver nanoparticles. *Biochemical and biophysical research communications*, 2016, 472, 566-571, doi: [10.1016/j.bbrc.2016.03.042](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.042). [COBISS.SI-ID [5888026](#)]

DROBNAK, Igor, GRADIŠAR, Helena, LJUBETIČ, Ajasja, MERLJAK, Estera, JERALA, Roman. Modulation of coiled-coil dimer stability through surface residues while preserving pairing specificity. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139, 8229-8236, doi: [10.1021/jacs.7b01690](https://doi.org/10.1021/jacs.7b01690). [COBISS.SI-ID [6191642](#)]

LJUBETIČ, Ajasja, GRADIŠAR, Helena, JERALA, Roman. Advances in design of protein folds and assemblies. *Current opinion in chemical biology*, 2017, 40, 65-71, doi: [10.1016/j.cbpa.2017.06.020](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.06.020). [COBISS.SI-ID [6191898](https://www.cobiss.si/id/6191898)]

LJUBETIČ, Ajasja, LAPENTA, Fabio, GRADIŠAR, Helena, DROBNAK, Igor, AUPIČ, Jana, STRMŠEK, Žiga, LAINŠČEK, Duško, HAFNER BRATKOVIČ, Iva, MAJERLE, Andreja, KRIVEC, Nuša, BENČINA, Mojca, PISANSKI, Tomaž, ČIRKOVIČ-VELIČKOVIČ, Tanja, ROUND, Adam, CARAZO, José María, MELERO, Roberto, JERALA, Roman. Design of coiled-coil protein-origami cages that self-assemble *in vitro* and *in vivo*. *Nature biotechnology*, 2017, 35, 1094-1101. doi: [10.1038/nbt.3994](https://doi.org/10.1038/nbt.3994). [COBISS.SI-ID [6266906](https://www.cobiss.si/id/6266906)]

AUPIČ, Jana, LAPENTA, Fabio, JERALA, Roman. SwitCCh : metal-site design for controlling the assembly of a coiled-coil homodimer. *ChemBioChem*, 2018, [1-7]. [link](#); [open access](#); pre-revised; doi: [10.1002/cbic.201800578](https://doi.org/10.1002/cbic.201800578).

LAPENTA, Fabio, AUPIČ, Jana, STRMŠEK, Žiga, JERALA, Roman. Coiled coil protein origami : from modular design principles towards biotechnological applications. *Chemical Society reviews*, 2018, 47, 3530-3542. [link](#), doi: [10.1039/C7CS00822H](https://doi.org/10.1039/C7CS00822H).

MAJERLE, Andreja, SCHMIEDEN, Dominik T., JERALA, Roman, MEYER, Anne S. Synthetic biology for multiscale designed biomimetic assemblies : from designed self-assembling biopolymers to bacterial bioprinting. *Biochemistry*. 2019, 58, 2095-2104. [link](#), DOI: [10.1021/acs.biochem.8b00922](https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00922).

4. LOGOTIP FINANCERJEV



ARRS

JAVNA AGENCIJA ZA RAZISKOVALNO DEJAVNOST
REPUBLIKE SLOVENIJE