

UMETNE PROTEINSKE NANOSTRUKTURE

Dr. Helena GRADIŠAR

Gozdarski inštitut, september 2014



Kemski inštitut
Ljubljana
Slovenija

National Institute
of Chemistry
Slovenia





Laboratorij za biotehnologijo

Kemijski inštitut, EN-FIST

Sintezna biologija

Naravna imunost

- * logične operacije v celicah
- * bionanomateriali



Kemijski inštitut
Ljubljana
Slovenija

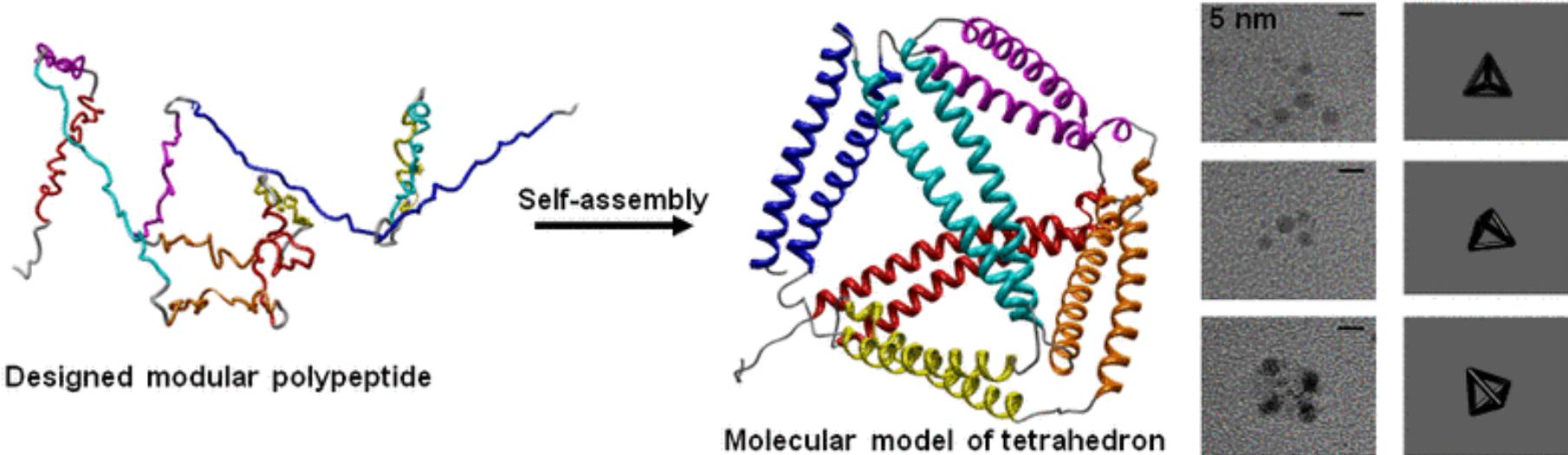
National Institute
of Chemistry
Slovenia



Design of a single-chain polypeptide tetrahedron assembled from coiled-coil segments pp362 - 366

Helena Gradišar, Sabina Božič, Tibor Doles, Damjan Vengust, Iva Hafner-Bratkovič, Alenka Mertelj, Ben Webb, Andrej Šali, Sandi Klavžar & Roman Jerala

doi:10.1038/nchembio.1248

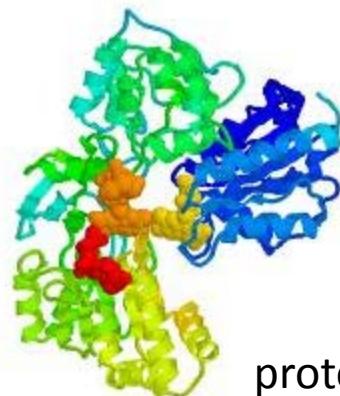


"It is a piece of great work in the field of programmed biomacromolecular self-assembly," said chemist Chengde Mao of Purdue University in Indiana, who was not involved in the study. "The beauty of the strategy is its simplicity."

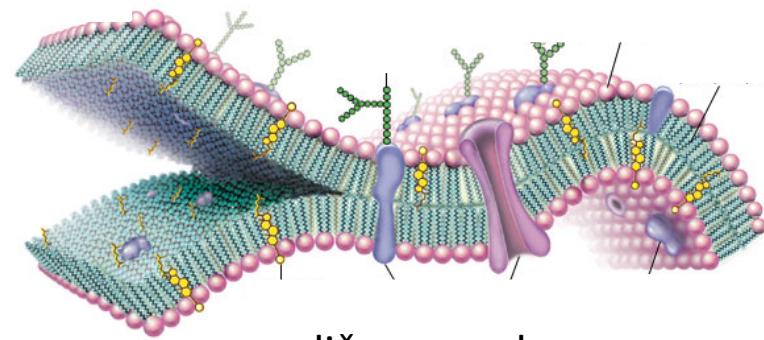
Naravne nanostrukture



DNK



proteini



celična membrana

modularnost in samosestavljanje



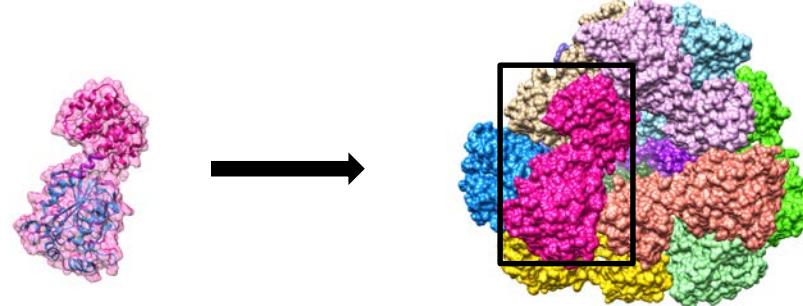
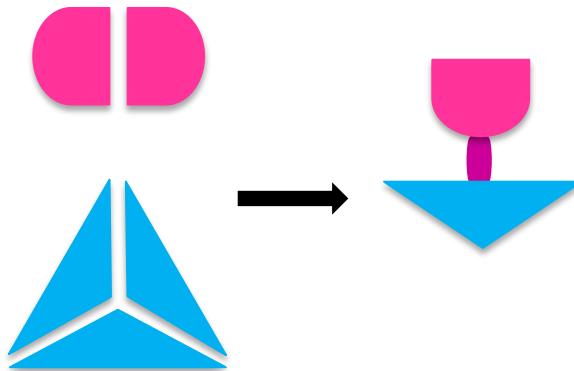
BIONANOTEHNOLOGIJA

načrtovanje umetnih nanostruktur - poznavanje naravnih zakonitosti

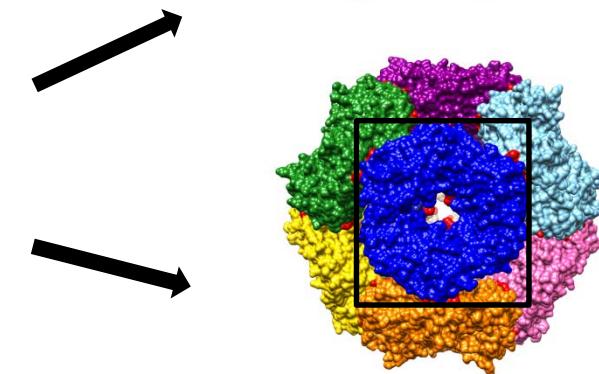
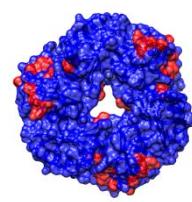
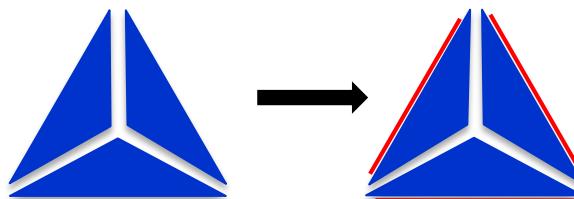
Umetne proteinske nanostrukture

1. Povezovanje naravnih domen

Padilla et al., PNAS 2001
Lai et al., Science 2012



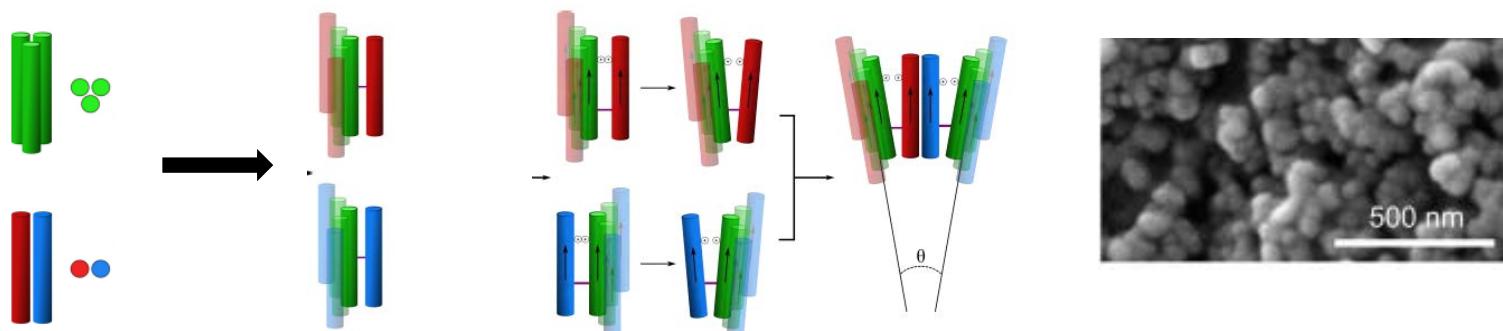
2. Interakcijske domene iz naravnih domen



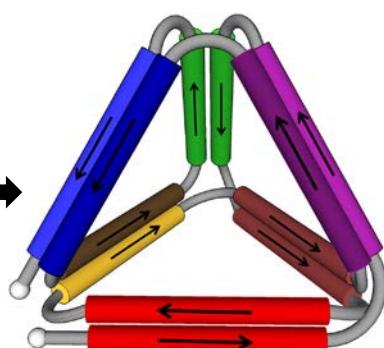
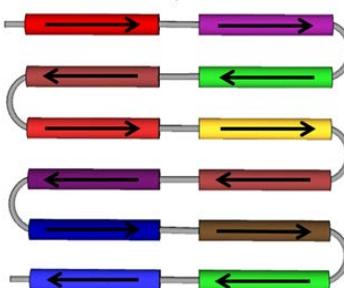
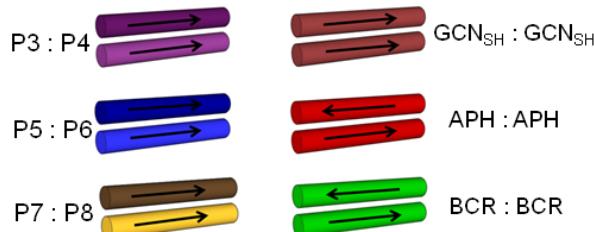
King et al., Science 2011

Umetne proteinske nanostrukture

3. Modularni princip za gradnjo nanokletke



4. Načrtovano modularno zvitje proteina



set *de novo* načrtovanih modulov

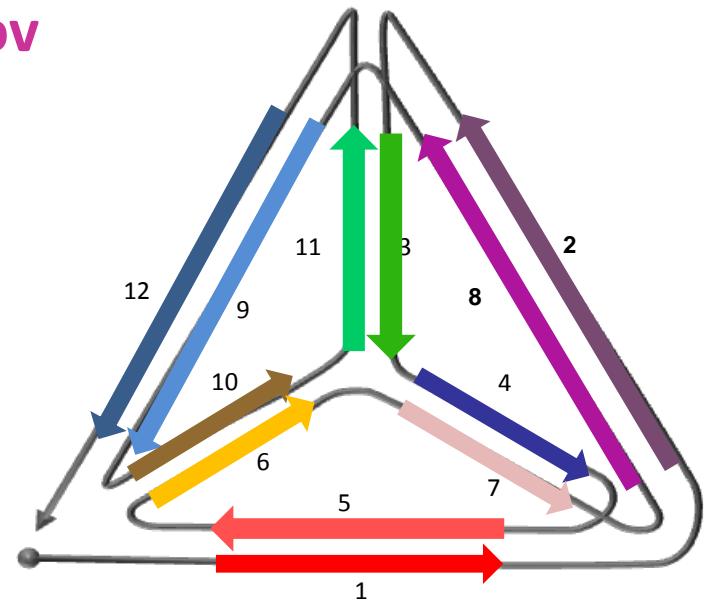
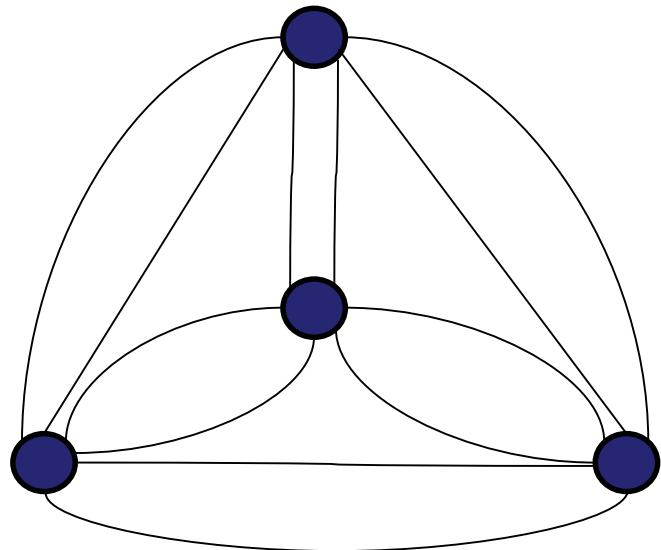
topološka rešitev

tetraedrska struktura

Gradišar et al., Nature Chemical Biology 2013

Topološka analiza poti, ki opiše tetraeder

Matematično modeliranje Teorija grafov

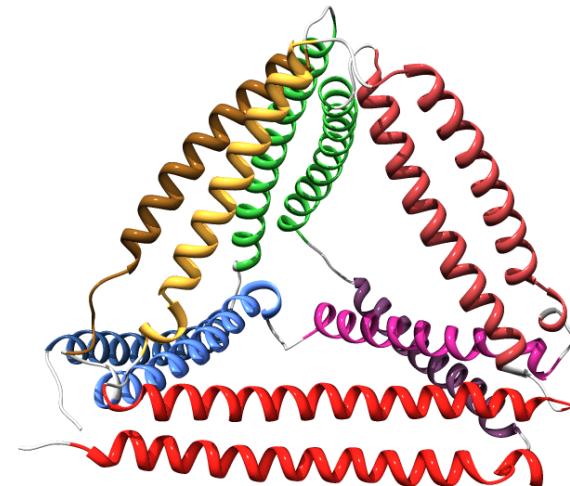


Ali lahko z **eno verigo** opišemo tetraeder, pri čemer vsak rob prečkamo **natanko dvakrat** ?

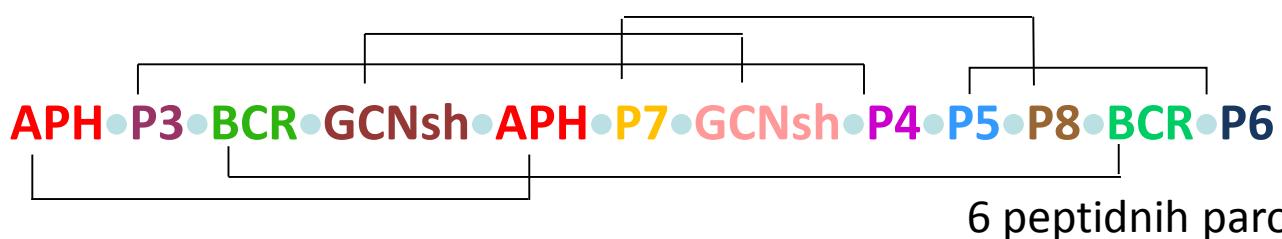
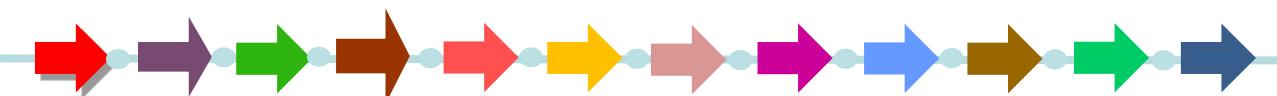
Topološka rešitev. Vrstni red korakov je **natančno določen**.

Načrtovanje polipeptidne verige, ki se zvije v tetraeder

Ali lahko pripravimo tetraeder iz **ene polipeptidne verige**, sestavljene iz 12-ih povezanih peptidnih segmentov, ki paroma tvorijo **ovite vijačnice** ?



Polipeptid TET12



Vrstni red peptidnih segmentov je natančno določen.

Polipeptid TET12

Aminokislinske sekvence **de novo** načrtovanih peptidnih segmentov

- MKQLEKELKQLEKELQAIKEKQLAQLQWKAQARKKKLAQLKKKLQA
- SPEDEIQQLEEEIAQLEQKNAALKEKNQALKYG
- DIEQELERAKASIRRLEQE VNQERSRMAYLQTLLAK

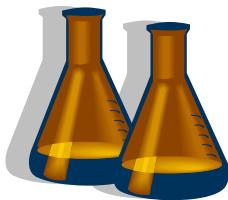
.....

Aminokislinska sekvenca polipeptida TET12

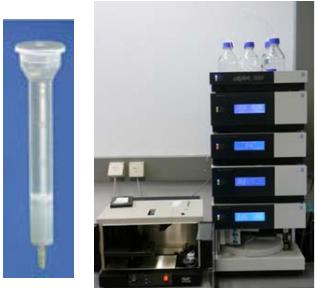
MKQLEKELKQLEKELQAIKEKQLAQLQWKAQARKKKLAQLKKKLQASGPG
SPEDEIQQLEEEIAQLEQKNAALKEKNQALKYGSGPGDIEQELERAKASIR
RLEQE VNQERSRMAYLQTLLAKSGPGQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLK
KLVGSGPGMKQLEKELKQLEKELQAIKEKQLAQLQWKAQARKKKLAQLKK
KLQASGPGSPEDEIQA LEEKNAQLKQEIAALEEKNQALKYGSGPGQLEDK
VEELLSKNYHLENEVARLKKGSGPGSPEDKIAQLKQKIQALKQENQQLE
EENAALEYSGPGSPEDENAALEEKIAQLKQKNAALKEEIQALEYSGPG
SPEDKIAQLKEENQQLEQKIQALKKEENAALEYSGPGDIEQELERAKASIR
RLEQE VNQERSRMAYLQTLLAKSGPGSPEDKNAALKEEIQALEEENQALE
EKIAQLKYGHHHHHH

Produkcija, izolacija in zvitje TET12

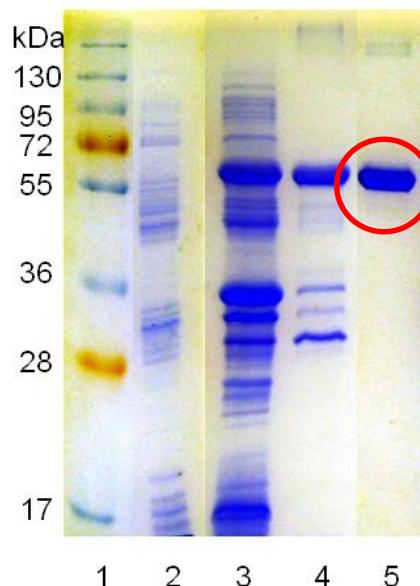
Produkcija v bakteriji *E.coli*



Izolacija iz IB



SDS-PAGE



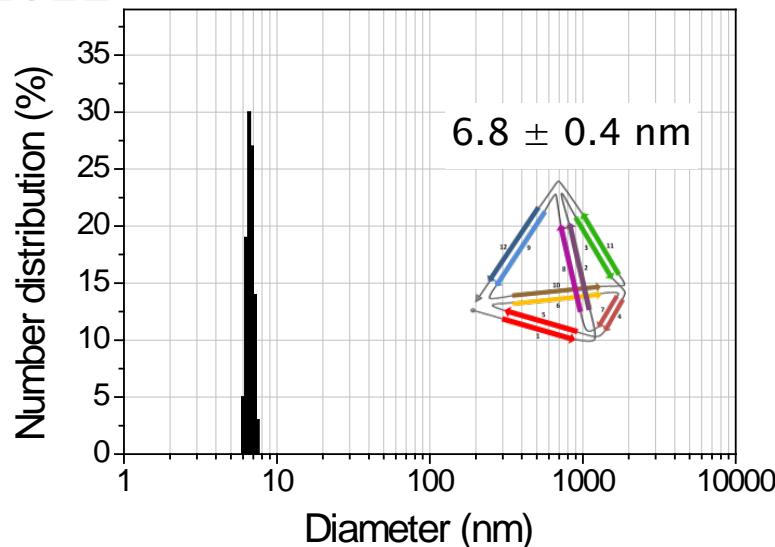
Samoestavljanje

- dializa pri nizki konc. proteina ($5 \mu\text{g/ml}$)
- karakterizacija vzorcev
- merjenje velikosti delcev (DLS) in deleža vijačnega zvitja (CD), pomembnost pravilnega zaporedja segmentov, opazovanje struktur z AFM in TEM

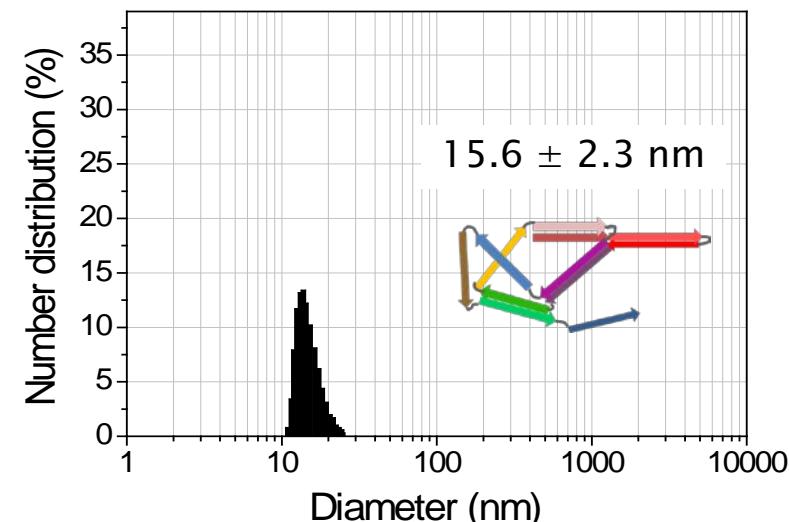
Afinitetna
kromatografija
HPLC-RP

Pravilni vrstni red segmentov definira strukturo

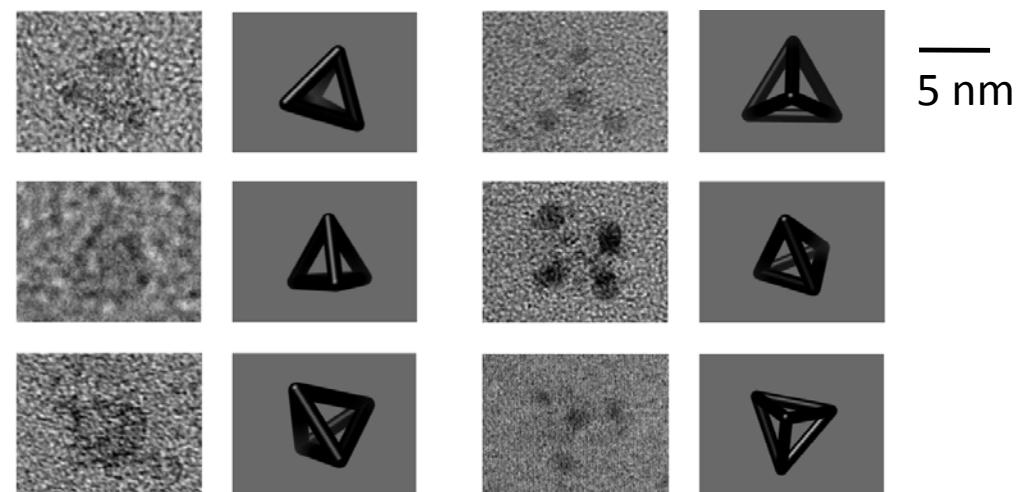
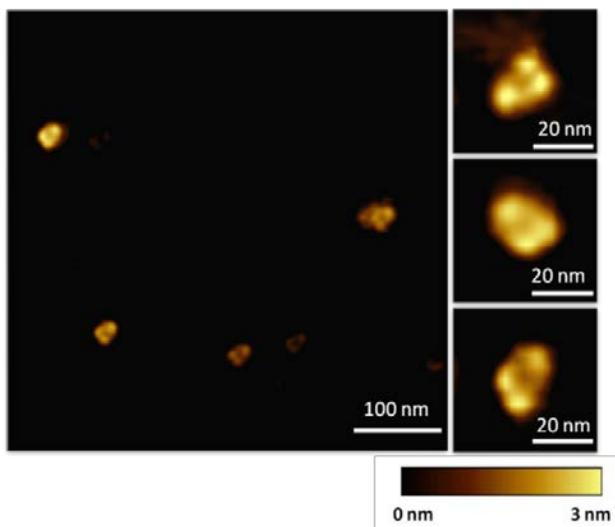
TET12



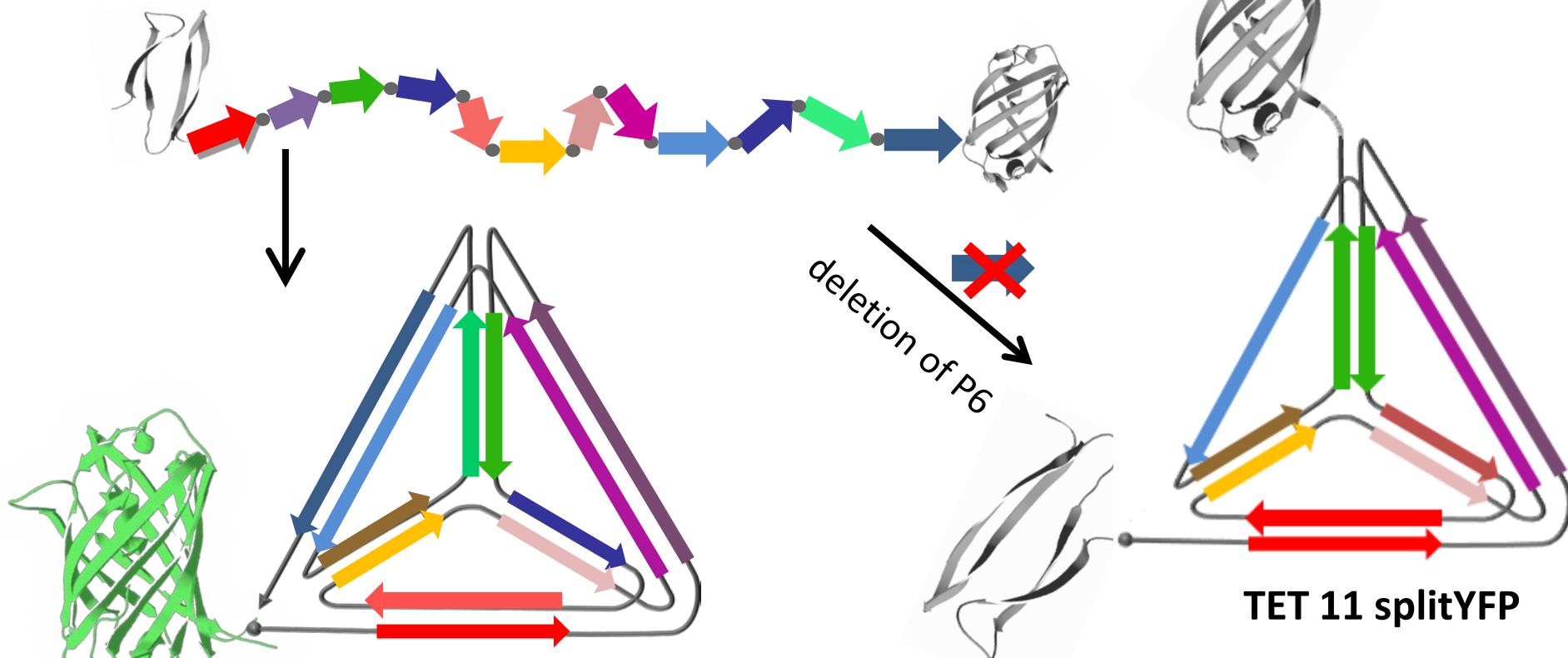
TET12scr zamenjan vrstni red segmentov



Vizualizacija nastalih struktur z AFM in TEM

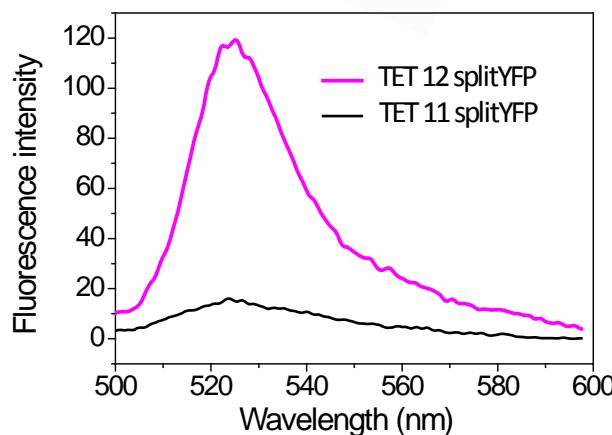


Konca verige se srečata v istem oglišču



TET 12 splitYFP

TET 11 splitYFP



merjenje
fluorescence

Zaključek

→ Razvili smo **novo strategijo** za gradnjo samoestavljivih nanostruktur iz ene proteinske verige - ***PROTEINSKI ORIGAMI***

Nadaljnje delo

- Povečanje seta peptidnih parov, ki tvorijo ovite vijačnice
- Načrtovanje kompleksnejših proteinskih nanostruktur
- Funkcionalizacija nanostruktur (izboljšanje biokatalize, priprava bionanomaterialov, dostava zdravil, cepiva)

Zahvala

Prof.dr. Roman Jerala KI, ENFIST

Sabina Božič KI

Tibor Doles KI, ENFIST

Prof.dr. Sandi Klavžar FMF

Dr. Iva Hafner Bratkovič KI

Dr. Andrej Šali, Dr. Ben Webb, UCSF

Damjan Vengust IJS

Dr. Alenka Mertelj IJS



Slovenian iGEM 2009 team

Sabina Božič

Nika Debeljak

Tibor Doles

Urška Jelerčič

Anja LukanŠpela Miklavič

Marko Verce



Kemijski inštitut
Ljubljana
Slovenija



CENTER ODLIČNOSTI



Javna agencija
za raziskovalno dejavnost
Republike Slovenije