



Università politecnica delle Marche  
Dipartimento di scienze della vita e dell'ambiente

*Tesi di laurea in scienze biologiche*  
*a.a. 2020/2021*

# **ORIGAMI DI PROTEINE: AUTOASSEMBLAGGIO IN VITRO E IN VIVO**

**Relatrice:**

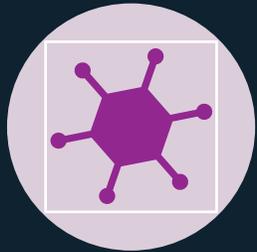
Maria Grazia Ortore

**Candidato:**

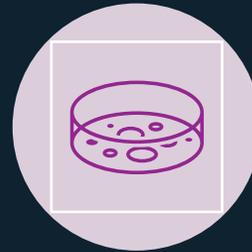
Filomena Carriera

S1083033

# OBIETTIVI



Progettazione di gabbie proteiche poliedriche in tre forme: **tetraedro**, **prisma triangolare** e **piramide a quattro lati**

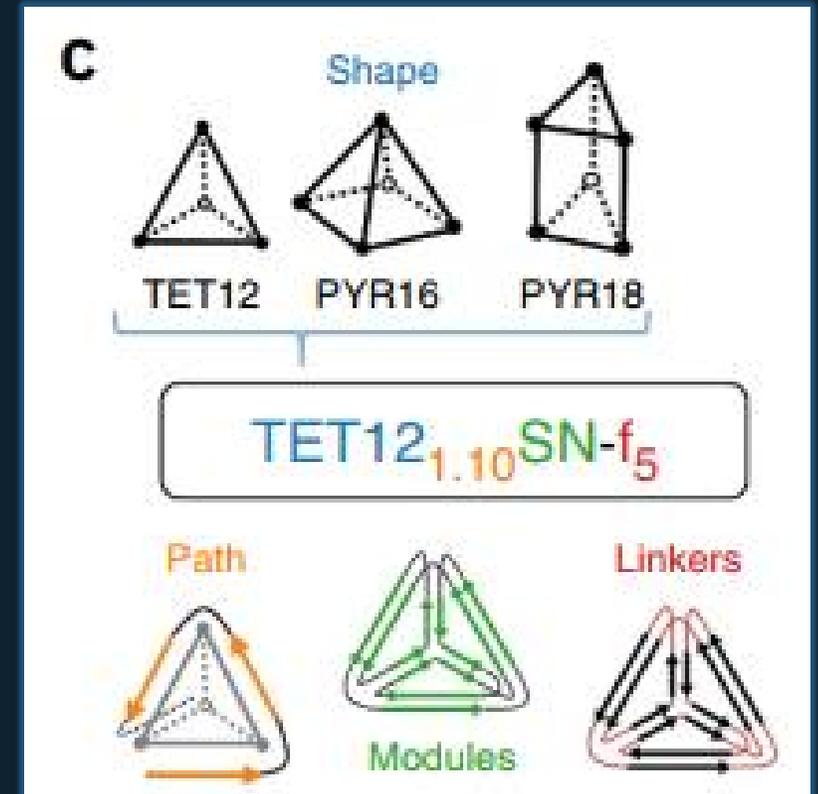
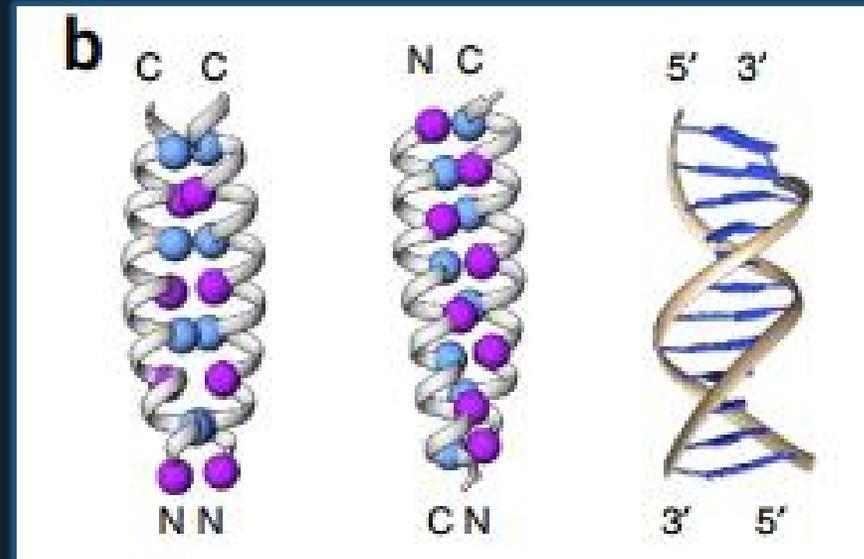
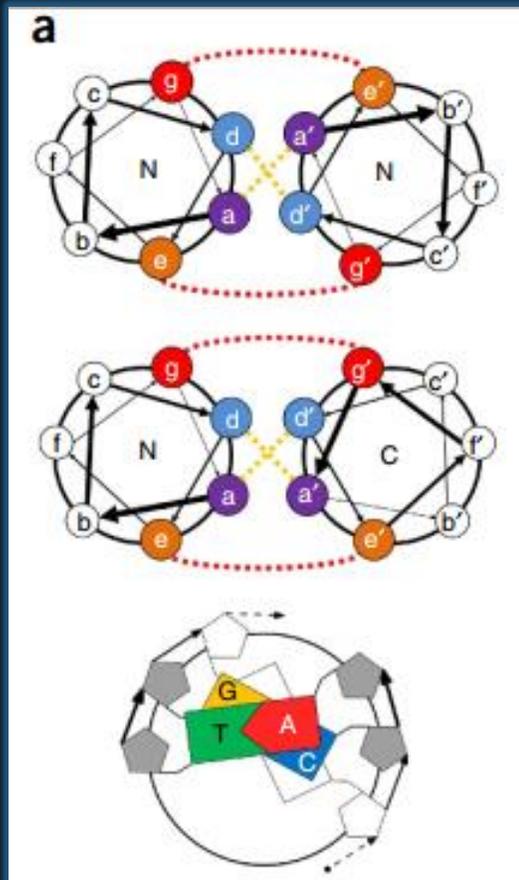


Dimostrazione dell'autoassemblaggio della struttura tetraedrica in **cellule di mammifero** e **topi**.

# DIMERI COILED-COIL (CC)

## BLOCCHI DI COSTRUZIONE DELLE GABBIE POLIEDRICHE:

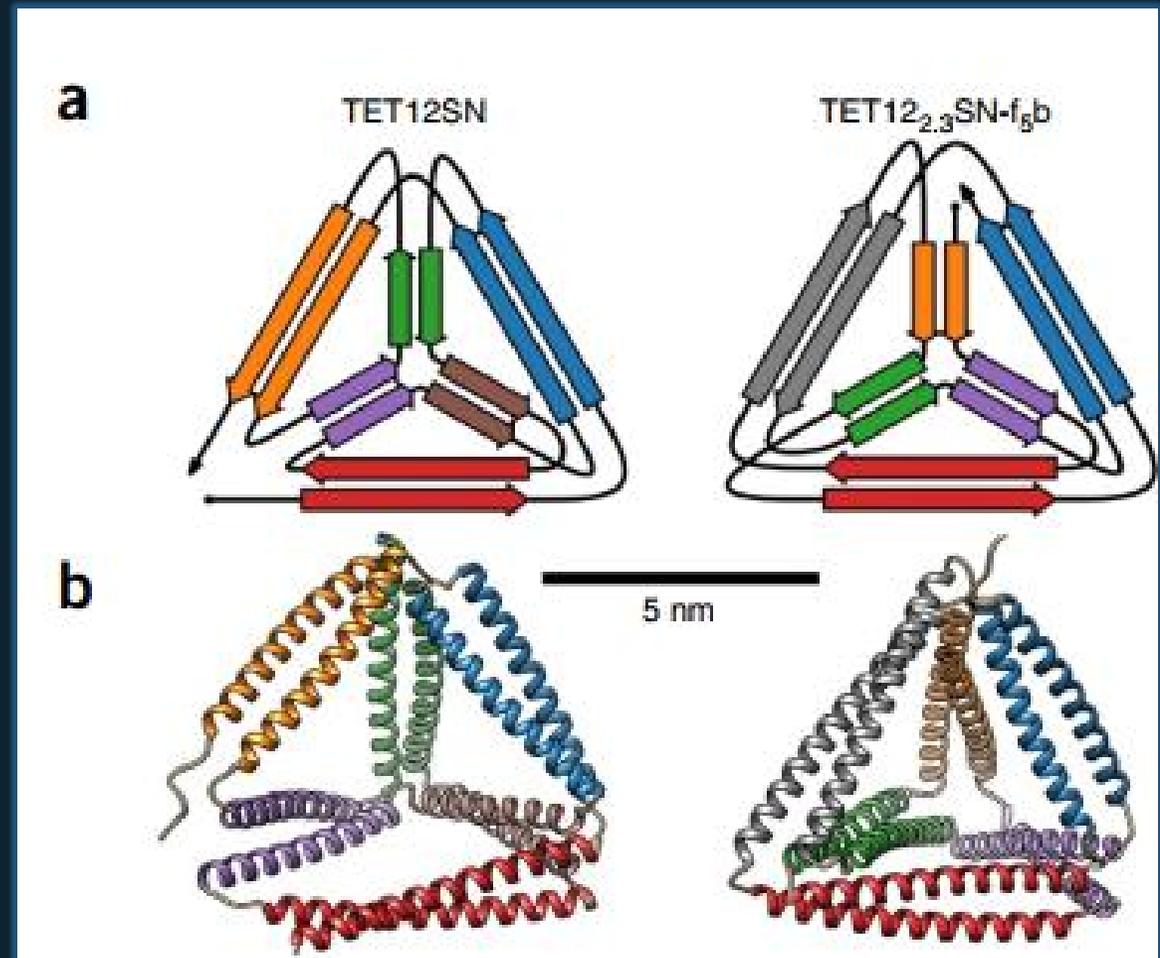
- Forma allungata: ripetizione regolare di sette residui amminoacidici
- Complementarità a coppie



# TETRAEDRI

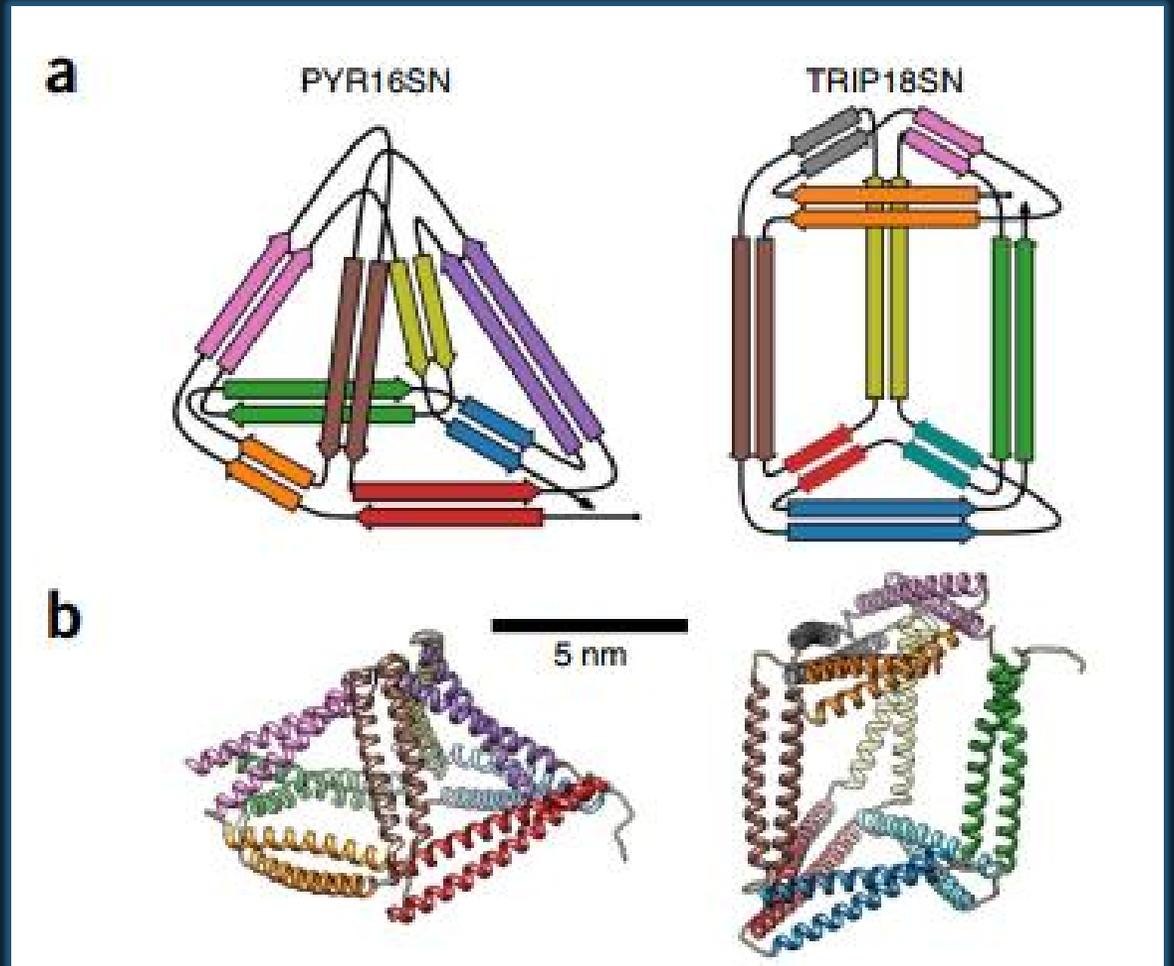
Sono stati valutati 12 disegni tetraedrici con diverse:

- **Topologie**
- **Permutazioni circolari**
- **Lunghezza e sequenza dei linkers**
- **Moduli CC:** solubili e carichi negativamente (S) e solubili e supercarichi negativamente (SN)



# PIRAMIDE A 4 LATI E PRISMA TRIANGOLARE

- **PYR16SN** è composto da 2 moduli antiparalleli e 6 paralleli con una giunzione a 4 rami nel vertice
- **TRIP18SN** presenta 3 dimeri CC antiparalleli e 6 dimeri CC paralleli



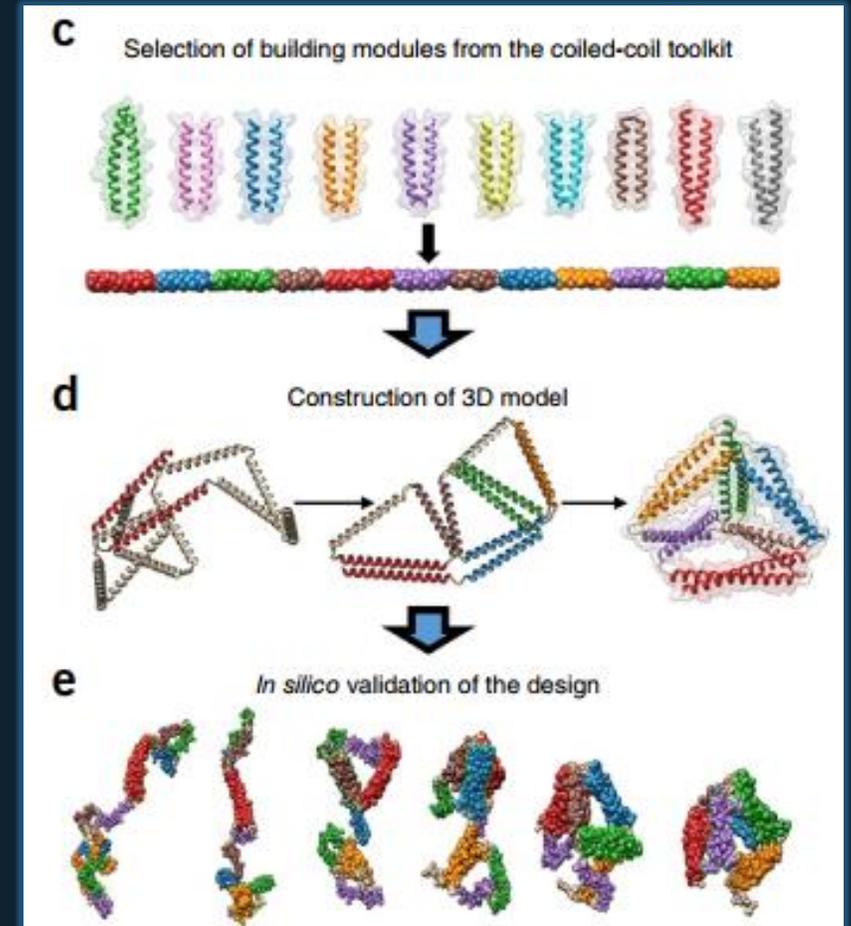
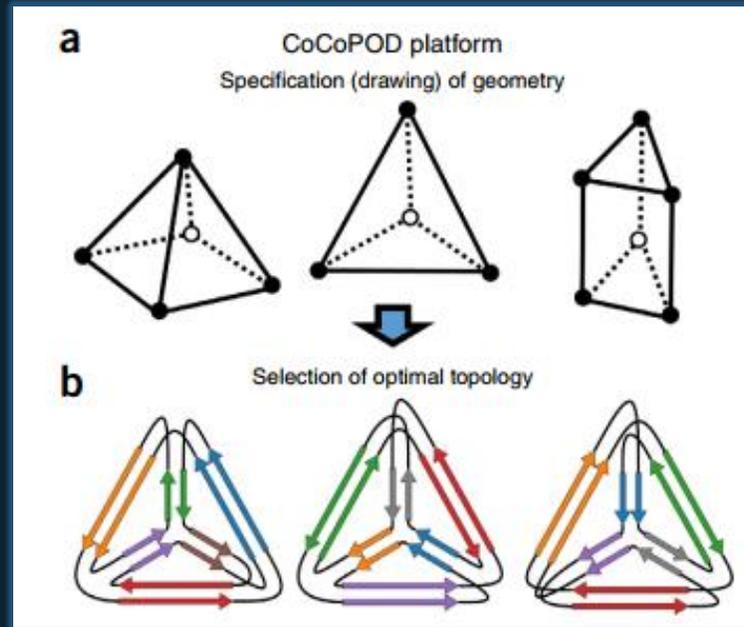
# CoCoPOD



## COILED-COIL PROTEIN ORIGAMI DESIGN PLATFORM

## ESPRESSIONE IN CELLULE BATTERICHE

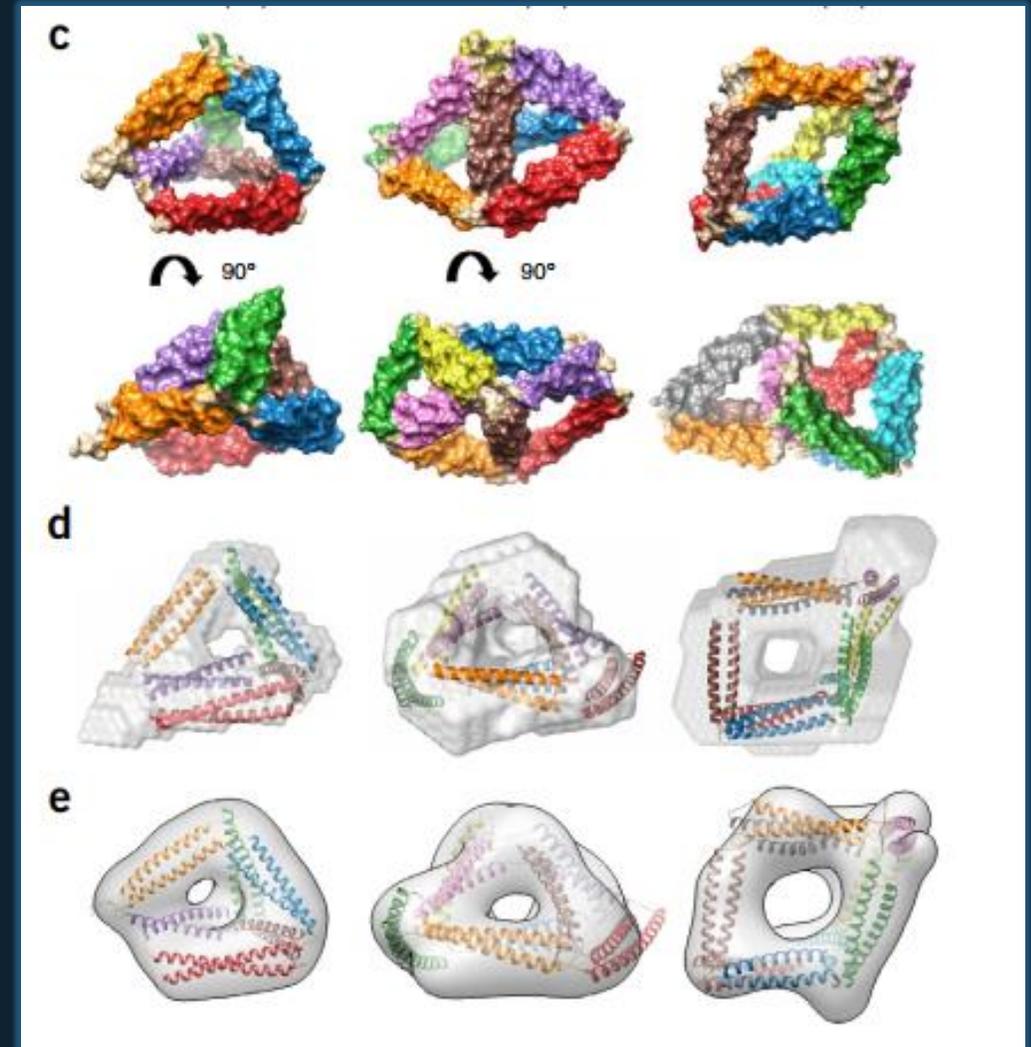
- Costruzione di plasmidi
- Espressione e purificazione dei polipeptidi



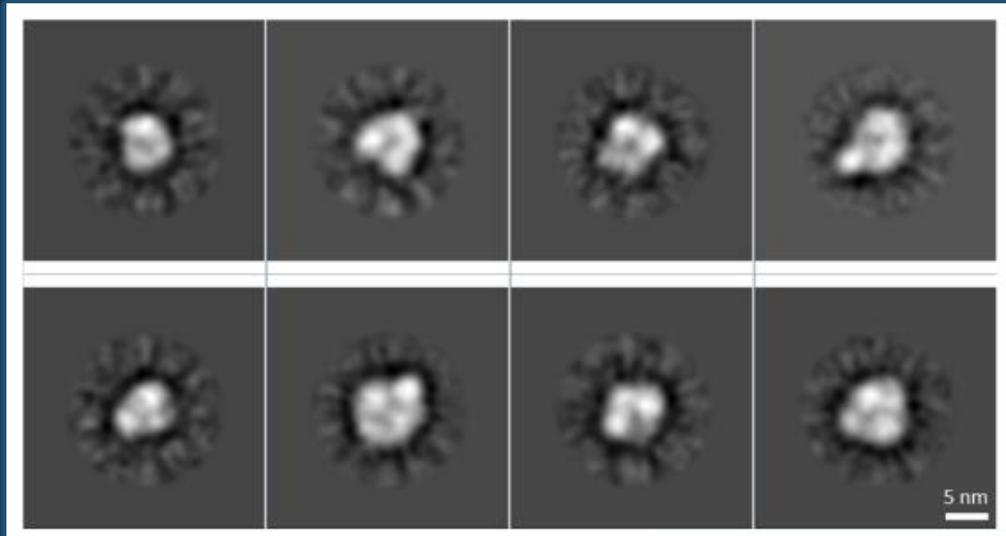
L'espressione di varianti tetraedriche, piramide e prisma in batteri ha dimostrato che tutti i progetti sono stati prodotti come proteine solubili.

# ANALISI STRUTTURALE DEI POLIEDRI PROGETTATI

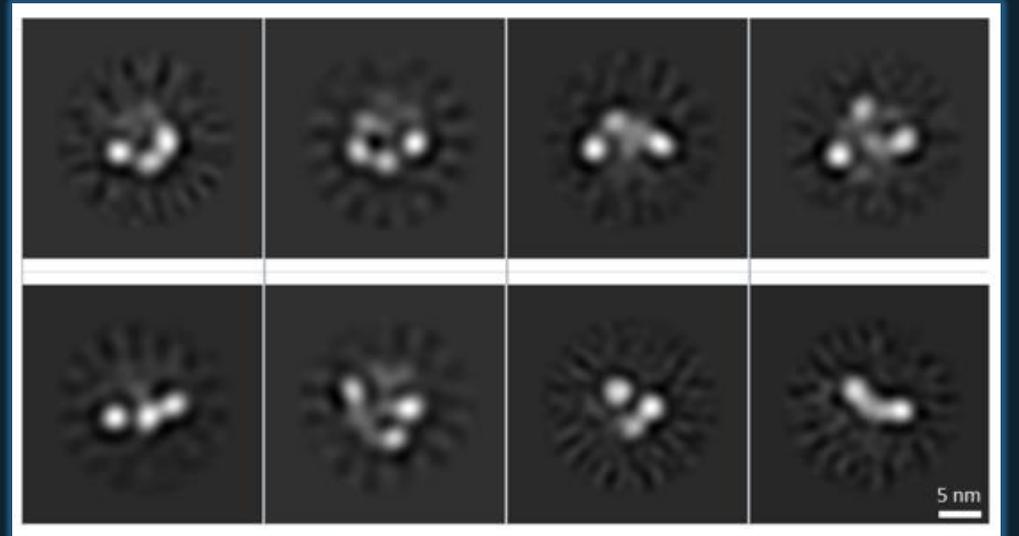
- **SDS-PAGE:** per determinare il peso molecolare e il grado di purezza delle proteine.
- **MISURAZIONE DEL DICROISMO CIRCOLARE (DC):** per valutare la specificità di legame dei dimeri CC, la stabilità termica dei costrutti proteici.
- **MISURAZIONE DEL DICROISMO CIRCOLARE SF:** per determinare la cinetica di folding e unfolding proteico.
- **MISURAZIONE DELLA DIFFUSIONE DINAMICA DELLA LUCE (DLS):** per determinare il profilo della distribuzione dimensionale delle piccole particelle proteiche in soluzione.
- **SEC-MALS:** per determinare il peso molecolare e la dimensione dei costrutti proteici in soluzione.
- **SAXS:** per determinare la conformazione delle strutture proteiche.
- **XL-MS:** per studiare le interazioni all'interno delle catene polipeptidiche.



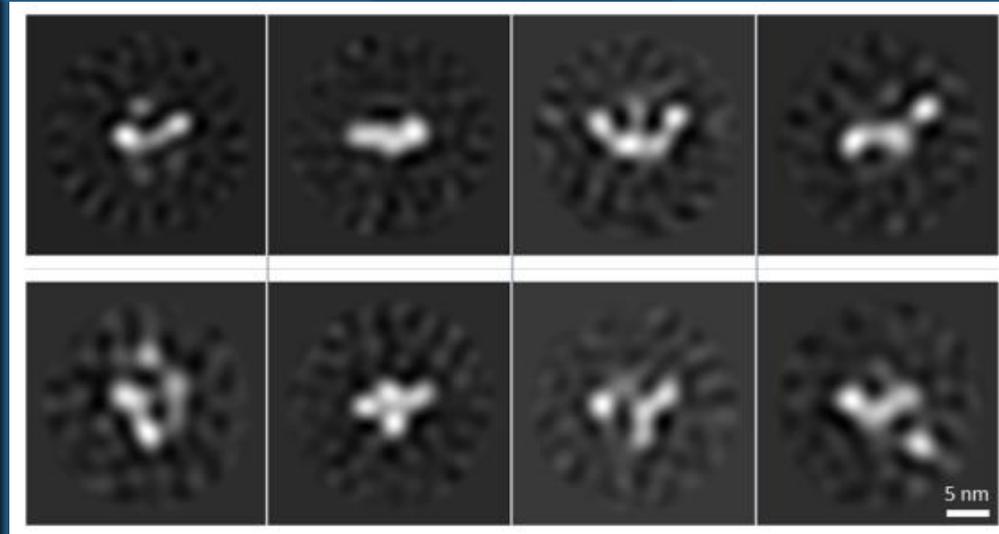
# NEGATIVE STAIN EM



**TET12SN**

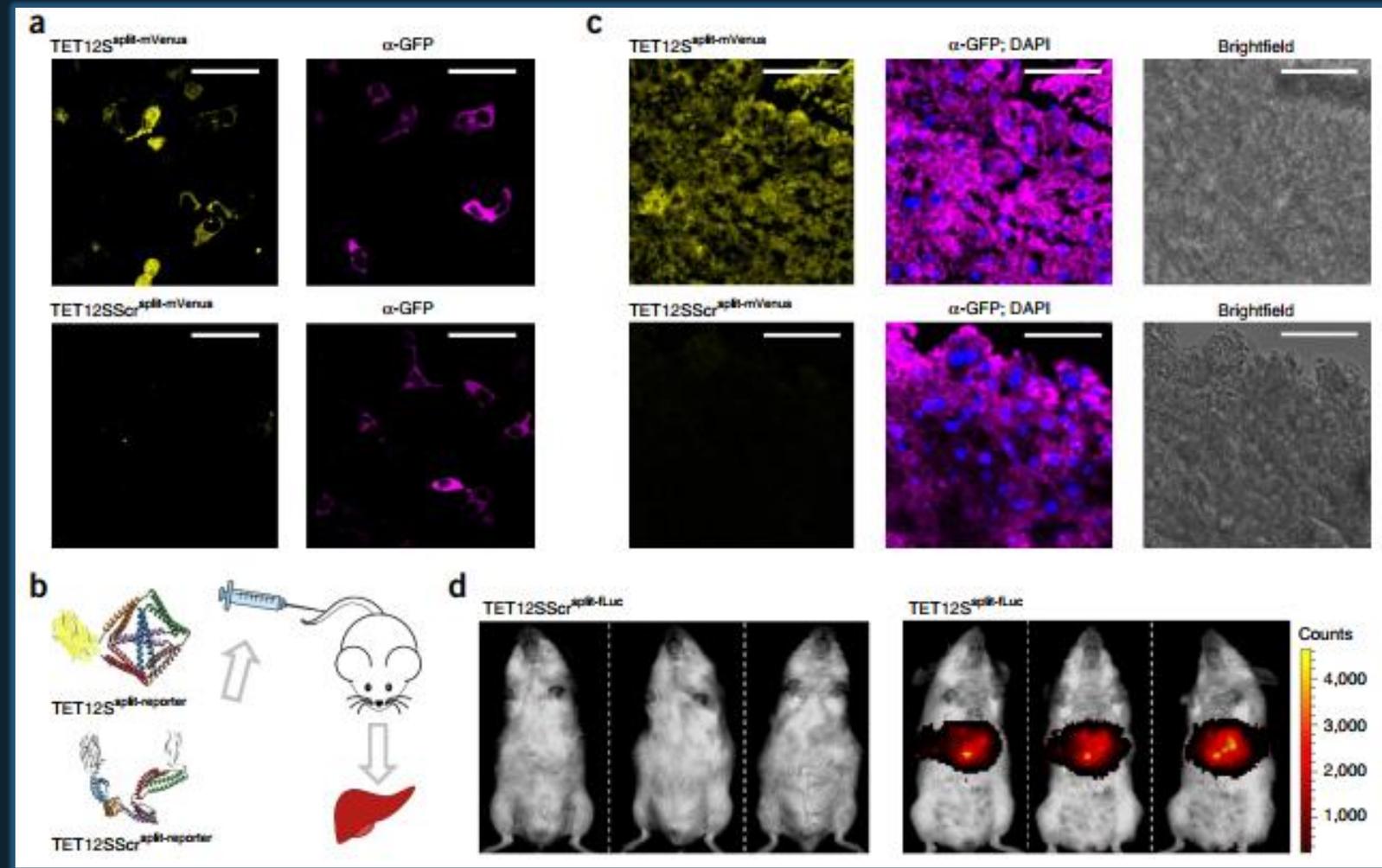


**PYR16SN**



**TRIP18SN**

# AUTOASSEMBLAGGIO IN CELLULE DI MAMMIFERO E IN TOPI



**GRAZIE PER L'ATTENZIONE!**

# DESIGN OF COILED-COIL PROTEIN ORIGAMI CAGES THAT SELF-ASSEMBLE IN VITRO AND IN VIVO

*Ajasja Ljubetic, Fabio Lapenta, Helena Gradišar, Igor Drobnak, Jana Aupic, Žiga Strmšek, Duško Lainšček, Iva Hafner-Bratkovič, Andreja Majerle, Nuša Krivec, Mojca Bencina, Tomaž Pisanski, Tanja Čirković Veličković, Adam Round, José María Carazo, Roberto Melero & Roman Jerala.*

In questo esposto viene descritto un sistema analogo alla progettazione di nanostrutture di DNA, in cui dimeri di proteine coiled-coil (CC) costituiscono i blocchi di costruzione per la progettazione de novo di gabbie proteiche poliedriche che si autoassemblano efficientemente in vitro e in vivo. Sono state progettate più di 20 gabbie proteiche in tre forme: tetraedro, piramide a 4 lati e prisma triangolare. Tra i vari motivi strutturali noti delle proteine, i dimeri CC forniscono la migliore approssimazione dei blocchi di costruzione del DNA, poiché hanno una forma allungata simile ed esibiscono la complementarità a coppie; la specificità di accoppiamento è definita dalla combinazione di interazioni idrofobiche ed elettrostatiche tra i residui in determinate posizioni. I dimeri CC che formano i segmenti (ossia i bordi delle gabbie poliedriche) sono concatenati in una singola catena polipeptidica tramite peptidi linkers che funzionano da cerniere. Le strutture CCPO sono state progettate utilizzando una piattaforma computazionale chiamata CoCoPOD che costruisce modelli 3D a partire da una singola catena polipeptidica. La strategia di progettazione consiste di più step automatizzati. Successivamente si è passati all'espressione delle varie strutture in cellule batteriche, attraverso la clonazione dei geni di interesse all'interno di vettori di espressione (plasmidi) inseriti in un ceppo competente di E. Coli. Tutti i progetti sono stati prodotti come proteine solubili. L'analisi strutturale dei poliedri progettati attraverso SAXS ha confermato che le strutture corrispondevano ai progetti, con cavità interne chiaramente visibili. Per confermare ulteriormente la dimensione e la forma determinata dai risultati di SAXS le gabbie poliedriche sono state osservate in microscopia elettronica (negative stain EM) testimoniando definitivamente il successo della strategia di progettazione. Per studiare il potenziale delle strutture CCPO in applicazioni mediche, è stato esaminato il ripiegamento di un tetraedro sia in cellule di mammifero che in topi da laboratorio, utilizzando la ricostruzione di una proteina fluorescente divisa come reporter. L'espressione del plasmide trasfettato ha infatti mostrato un'elevata fluorescenza dimostrando che il ripiegamento avveniva secondo il progetto. Inoltre non è stata osservata alcuna attivazione della risposta infiammatoria dimostrando la biocompatibilità delle strutture CCPO.

Anche se la specificità di accoppiamento dei dimeri CC non è così diretta come quella delle basi del DNA, essi hanno vantaggi maggiori rispetto alla nanotecnologia del DNA. I residui funzionali di amminoacidi possono essere facilmente incorporati mentre il DNA richiede l'introduzione di domini funzionali tramite coniugazione chimica. La ricostruzione delle proteine fluorescenti divise ha dimostrato anche che le strutture CCPO possono essere combinate con domini di proteine naturali. Si prevede una vasta gamma di applicazioni per le strutture CCPO, come la produzione in situ di vaccini che presentano più antigeni sulla superficie di nanoparticelle proteiche (approccio che ha migliorato la risposta immunitaria contro l'influenza), iniezione e targeting di farmaci, funzione di scaffold degli epitopi per la vaccinazione e la loro combinazione con agonisti della risposta immunitaria, compartimentazione e distribuzione di enzimi citotossici o farmaci terapeutici. L'approccio potrebbe trovare impiego anche in ambito non terapeutico, come nella progettazione di macchine molecolari proteiche, sensori e materiali funzionali.