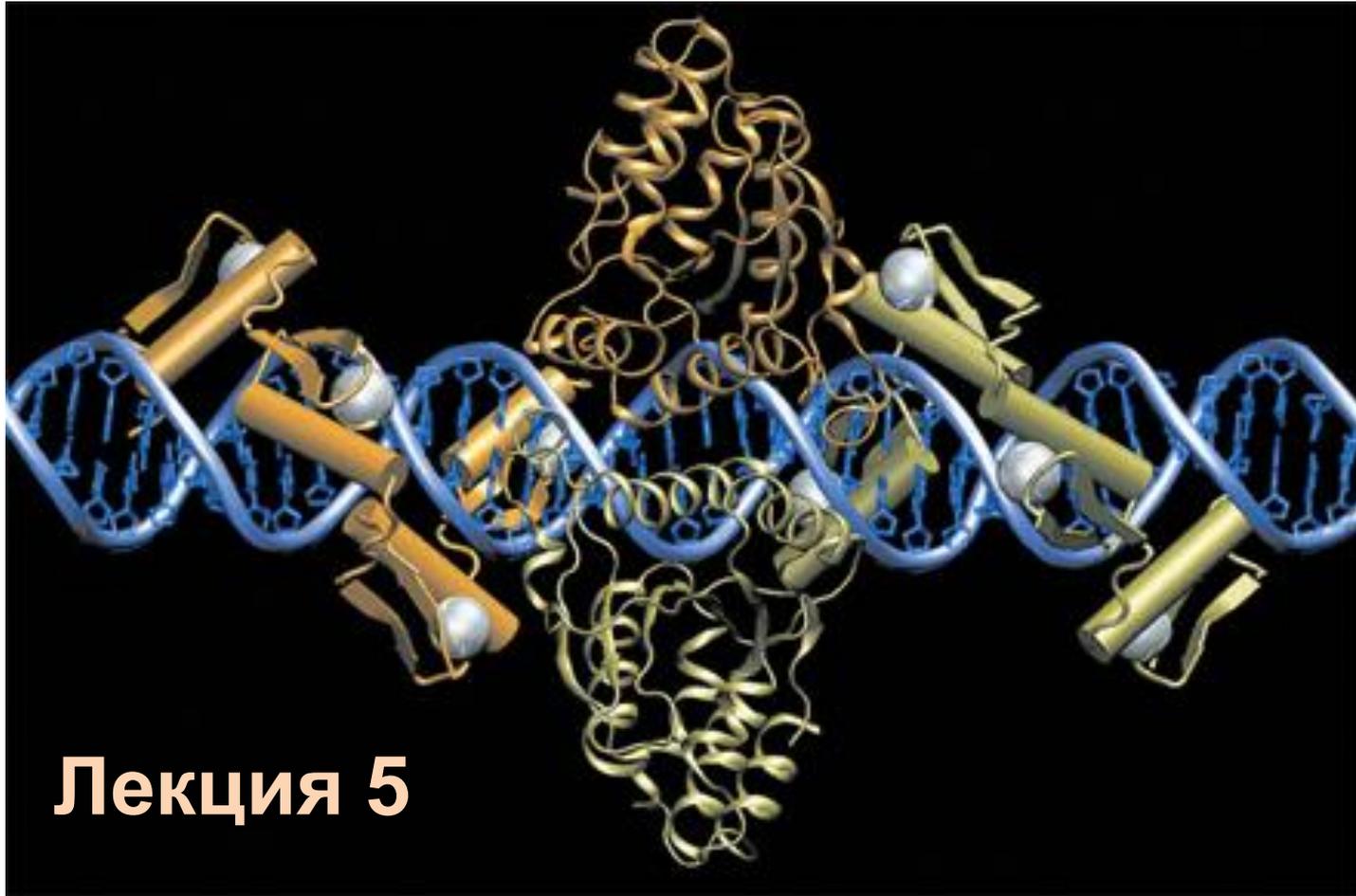


Основы генной инженерии и биотехнологии



Лекция 5

Генная инженерия в исследовании белков

Задачи белковой инженерии

Создание белков с новыми свойствами на основе новых аминокислотных последовательностей, а также путем модификации остатков аминокислот в природных полипептидных цепях

Свойства ферментов, важные для биотехнологии

- ❖ Реакции происходят в мягких условиях (температура, pH)
- ❖ Высокая эффективность ($k_{\text{кат}}/k_{\text{некат}}$) до 10^{17}
- ❖ Высокая специфичность. Кажущаяся константа ($k_{\text{кат}}/k_{\text{М}}$) до 10^8
- ❖ Недостаток: осуществляют реакции, происходящие только в организме

Две стратегии современной белковой инженерии

Рациональный дизайн белков

Конструирование белков *de novo*

Конструирование полипептидов с элементами известной вторичной структуры: α -спирали, β -слои, различные функциональные домены (цинковые пальцы, спираль-поворот-спираль, центры связывания ионов металлов)

Рациональный редизайн белков

Гибридные белки и ферменты. Изменение субстратной специфичности ферментов. Повышение стабильности белков – поперечные сшивки

Направленная эволюция белковых молекул

Отбор белков с нужными свойствами из библиотек мутантных молекул

RATIONAL DESIGN

1. Computer aided design



2. Site-directed mutagenesis



Individual mutated gene

3. Transformation

4. Protein expression

5. Protein purification

6. *not applied*



Constructed mutant enzyme



**IMPROVED
ENZYME**

7. Biochemical testing

DIRECTED EVOLUTION

1. *not applied*

2. Random mutagenesis



Library of mutated genes
(>10,000 clones)

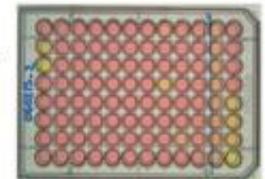
3. Transformation

4. Protein expression

5. *not applied*

6. Screening and selection

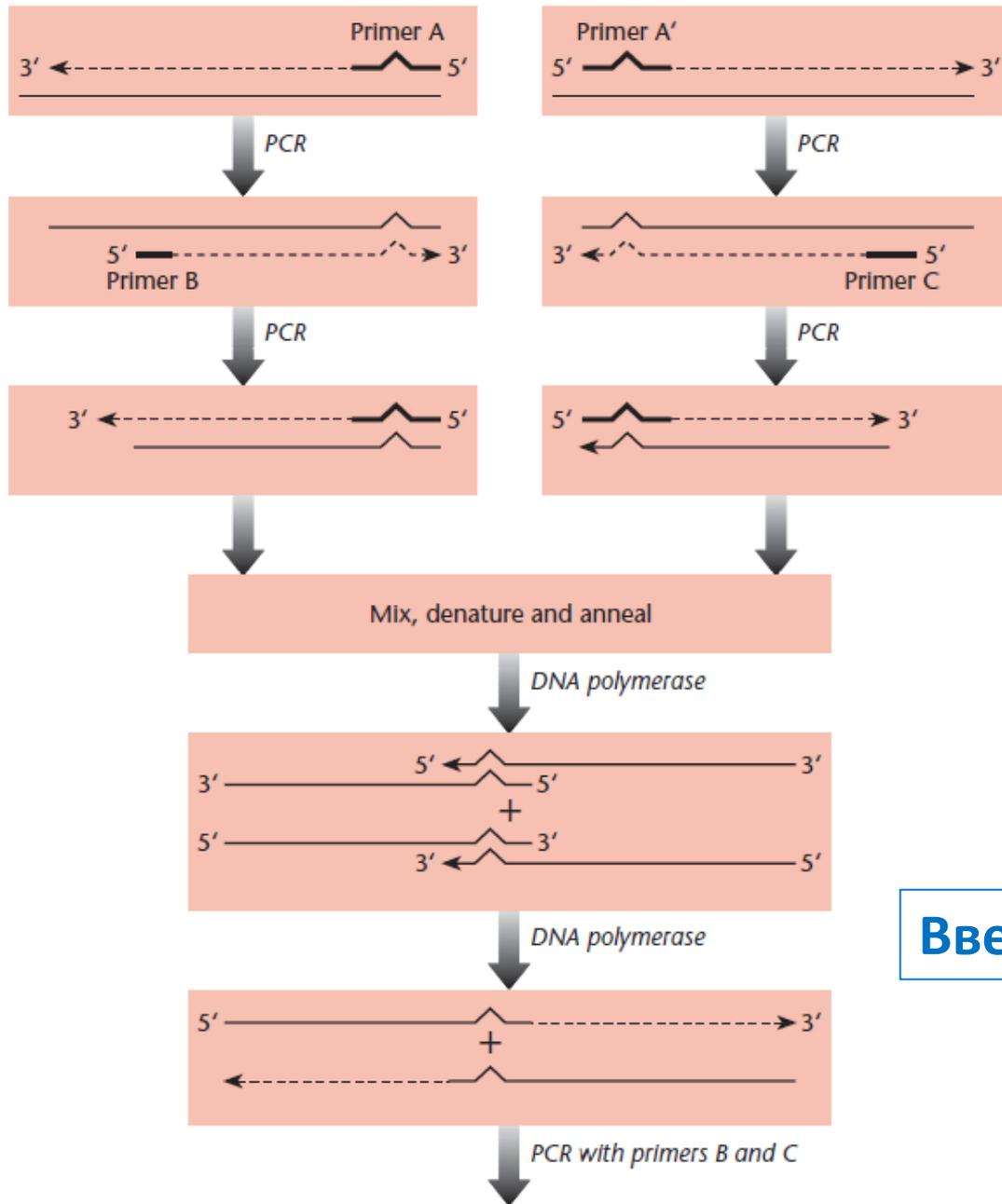
- stability
- selectivity
- affinity
- activity



Selected mutant enzymes

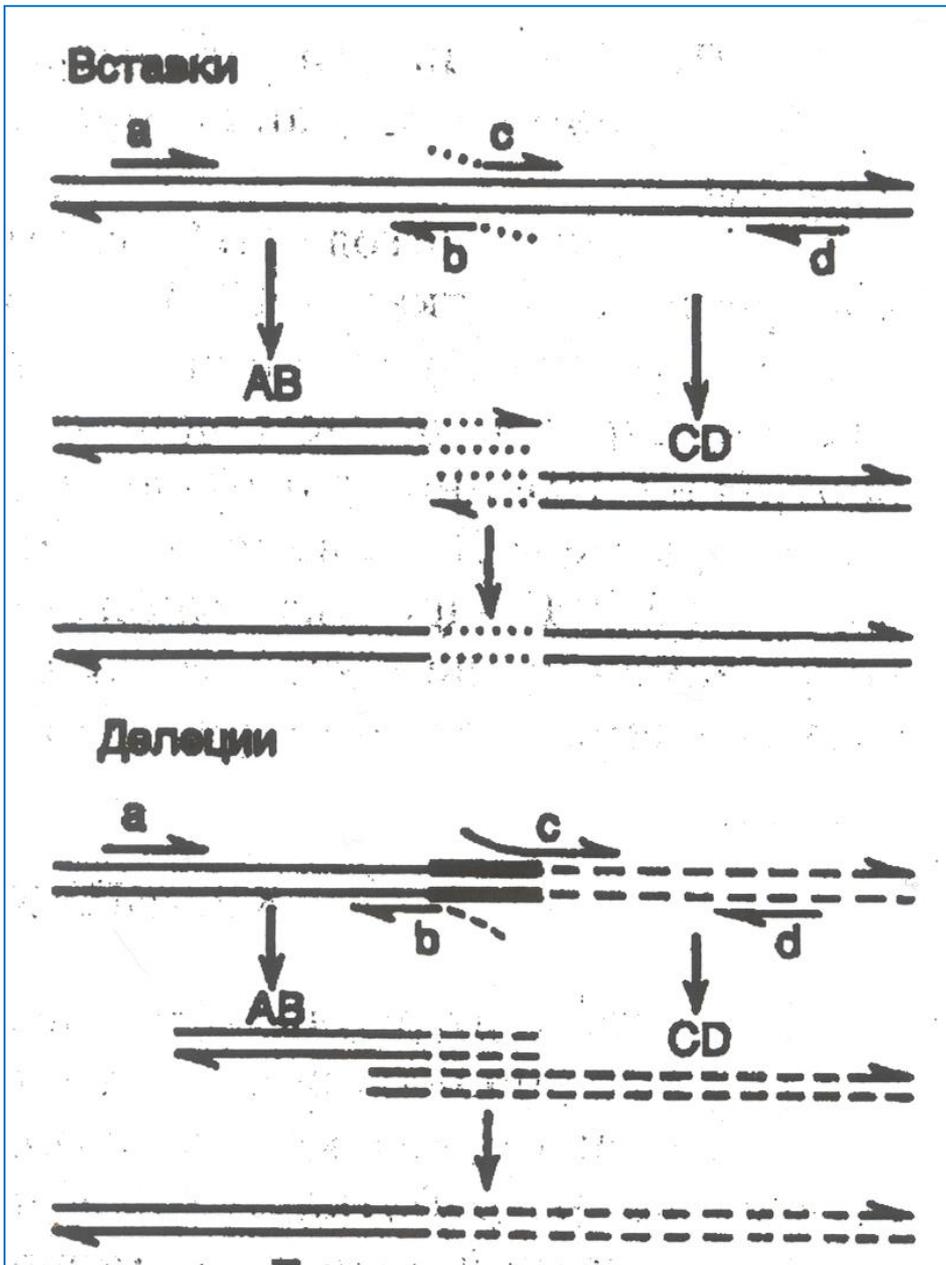
**При рациональном редизайне необходимо
изменять конкретные аминокислотные
остатки в белке:**

- 1. Направленным мутагенезом и/или**
- 2. С помощью химических
модификаций боковых цепей**



Направленный мутагенез с использованием ПЦР и перекрывающихся праймеров (Overlap extension PCR)

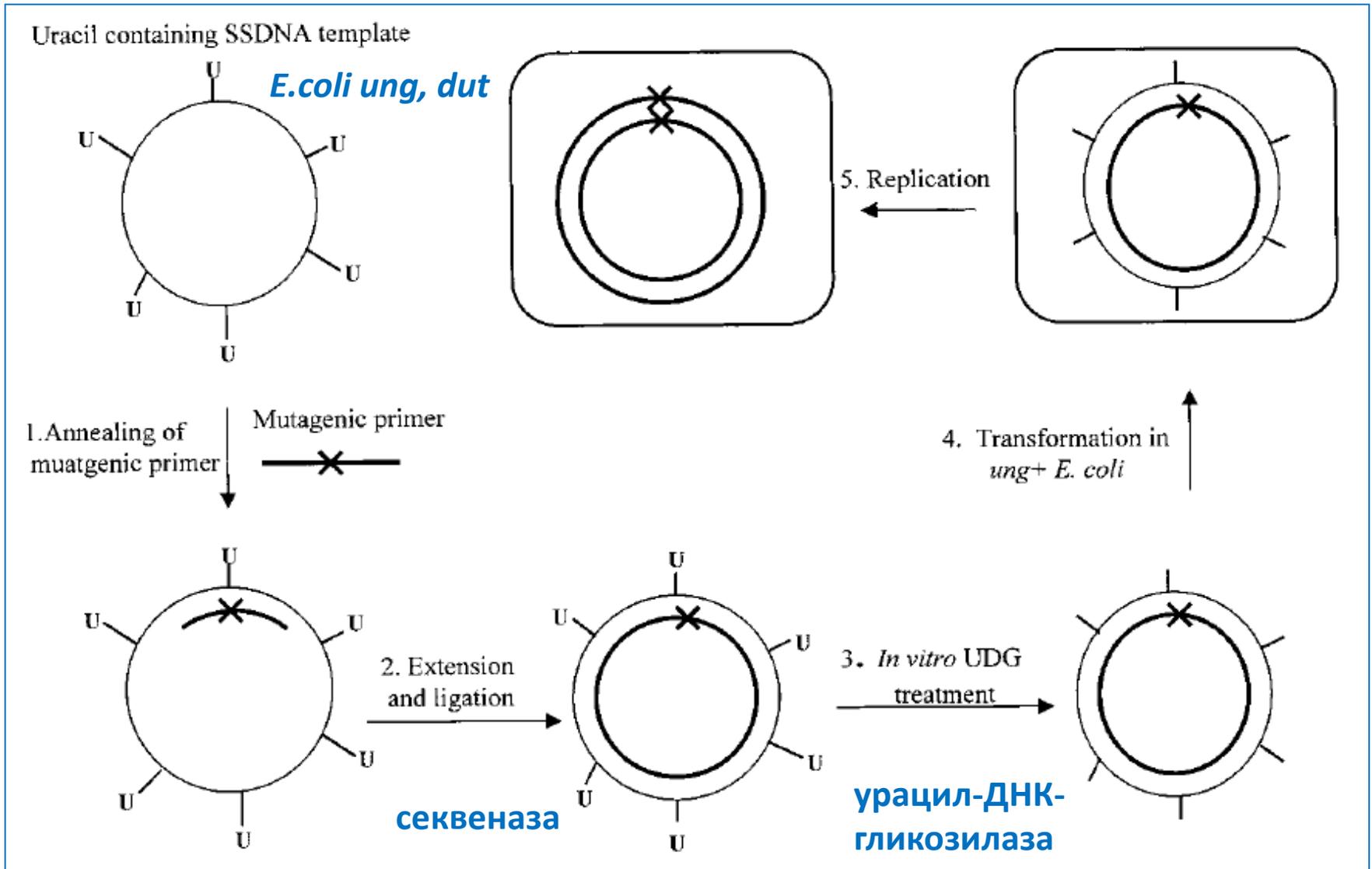
Введение точечных мутаций



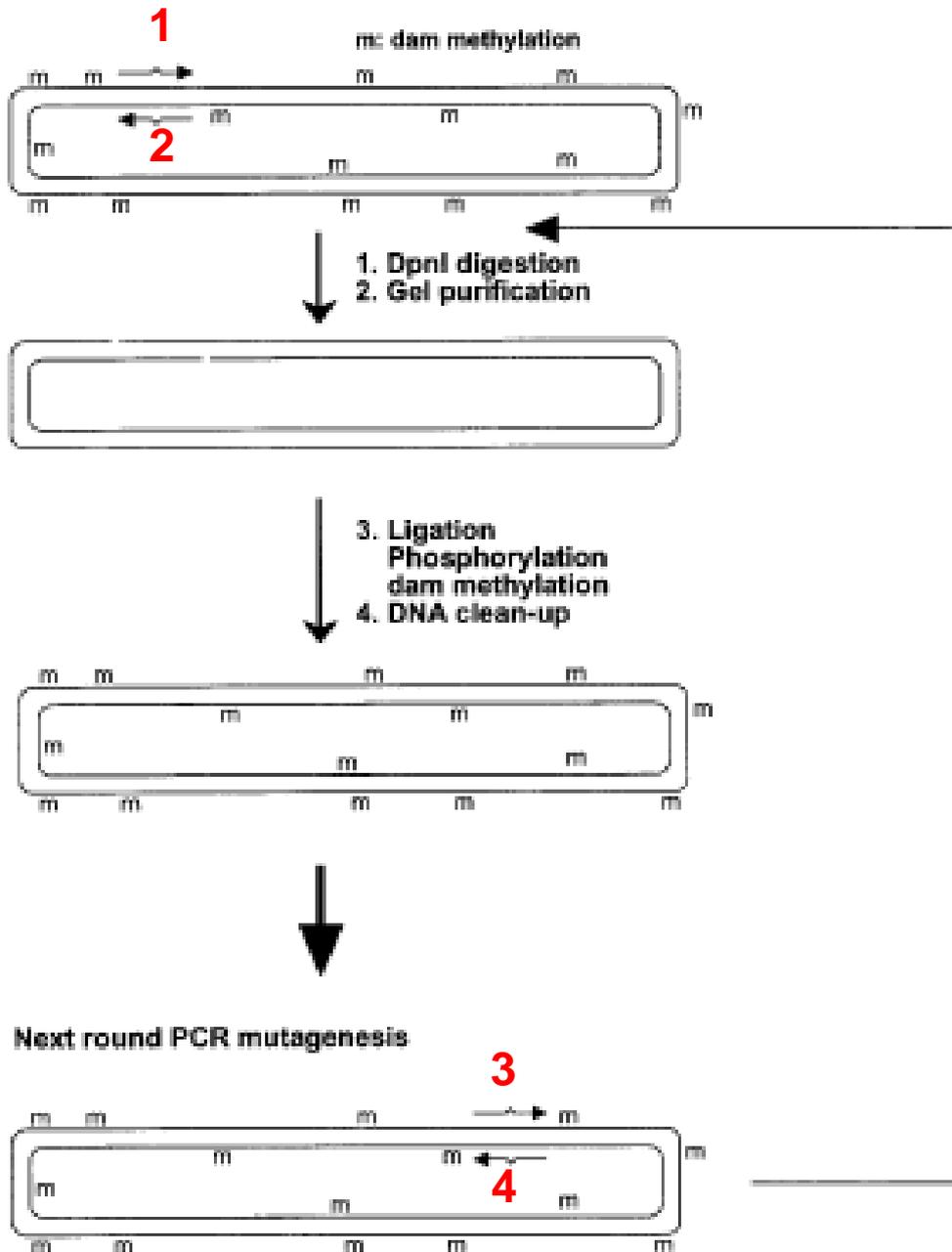
Направленный мутагенез
с использованием ПЦР и
перекрывающихся
праймеров

Получение вставок и делеций

Направленный мутагенез по методу Кункеля



ung – ген урацил-ДНК-гликозилазы, *dut* - ген dУТФазы



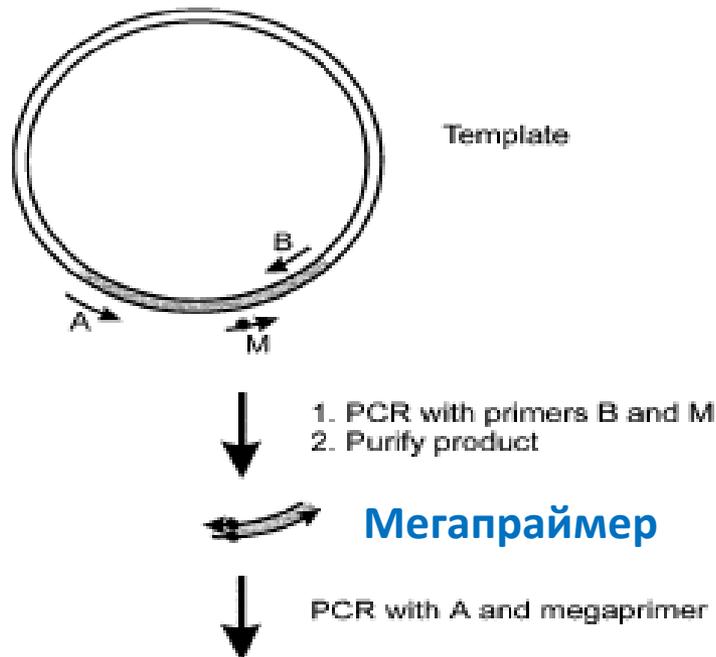
Введение нескольких мутаций с использованием ПЦР и метил-чувствительной рестриктазы *DpnI*

ПЦР с мутагенизирующими праймерами 1 и 2, затем 3 и 4

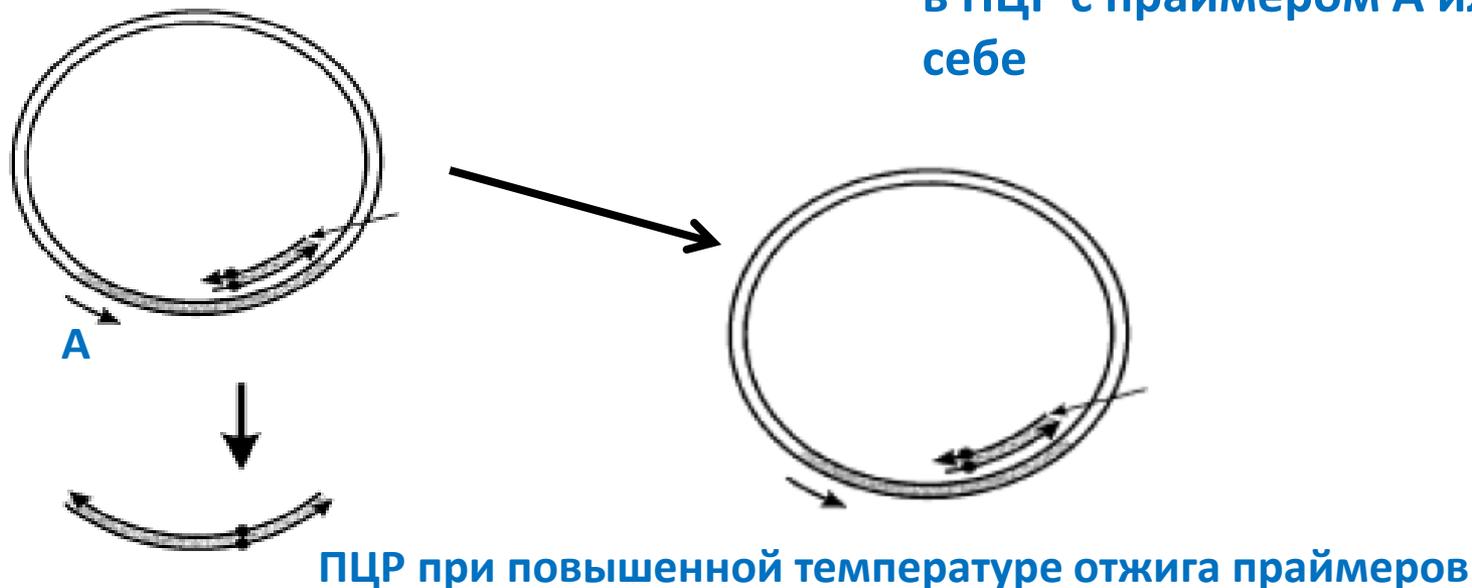
dam-ДНК-метилаза – полное метилирование dsДНК (N6 в A)

Рестриктаза *DpnI* – расщепляет полностью метилированные сайты

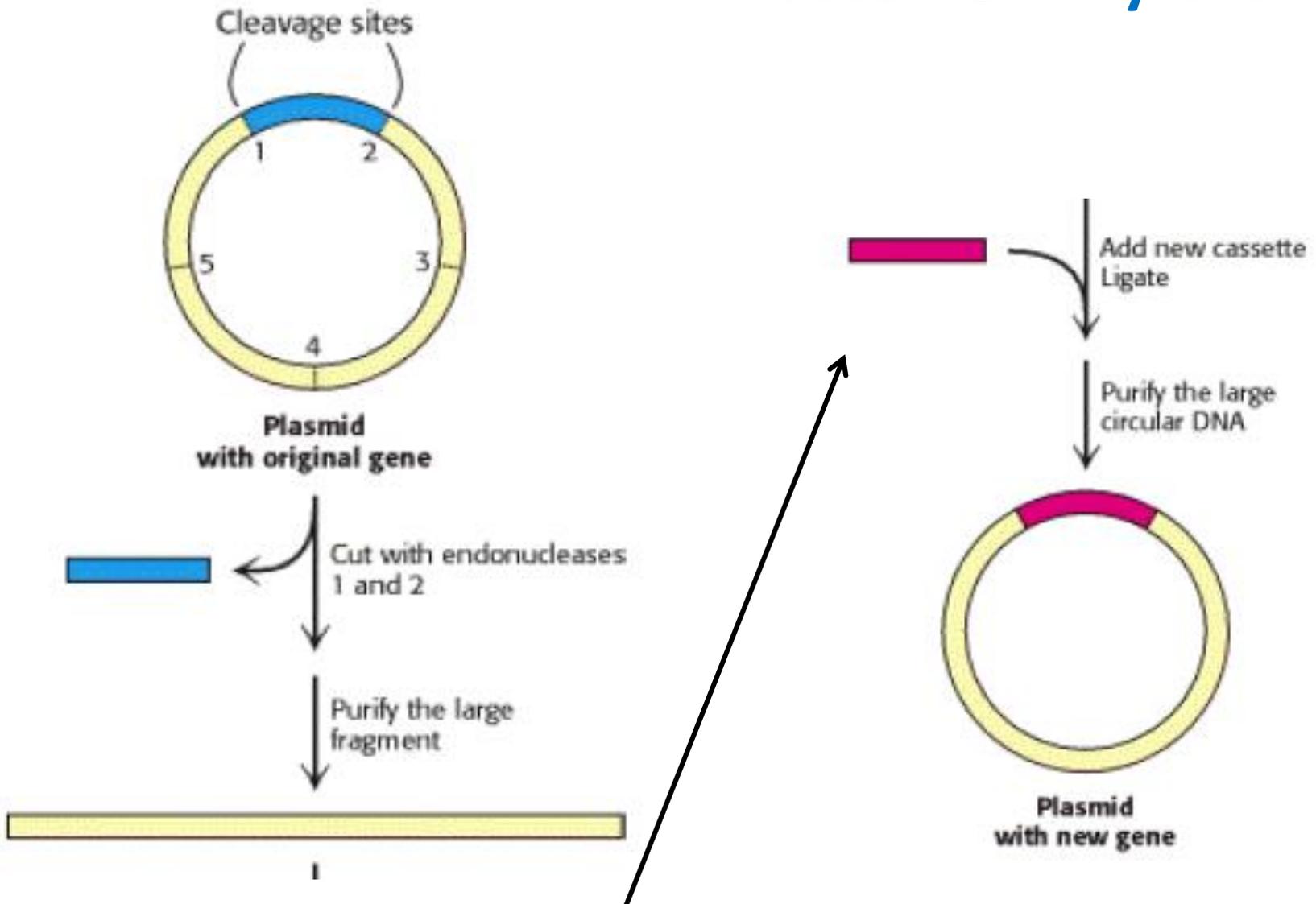
Направленный мутагенез с использованием мегапраймеров



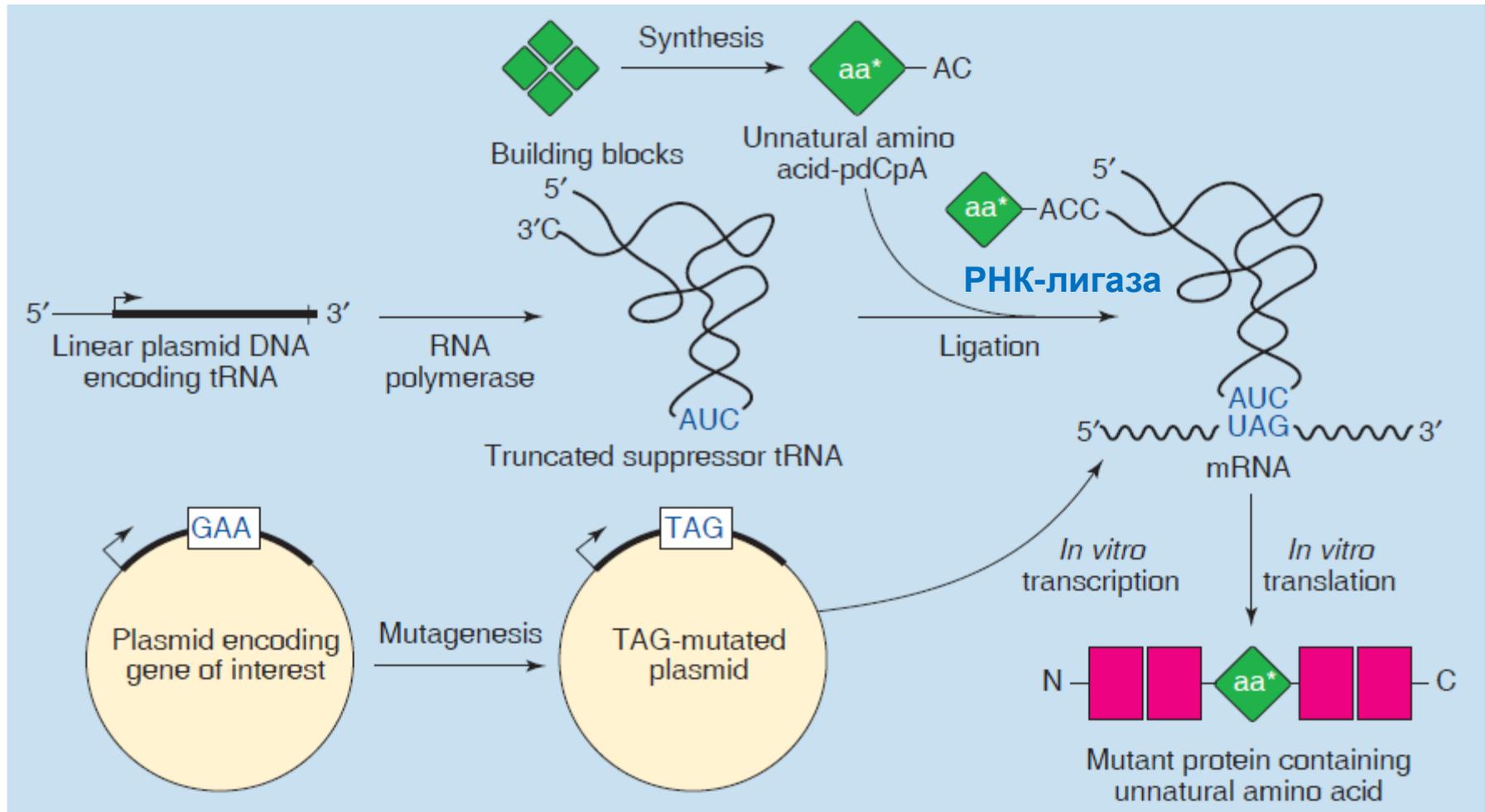
Вначале с помощью праймеров М (мутагенизирующий) и В синтезируют мегапраймер, который после повышения температуры отжига используется в ПЦР с праймером А или сам по себе



Кассетный мутагенез

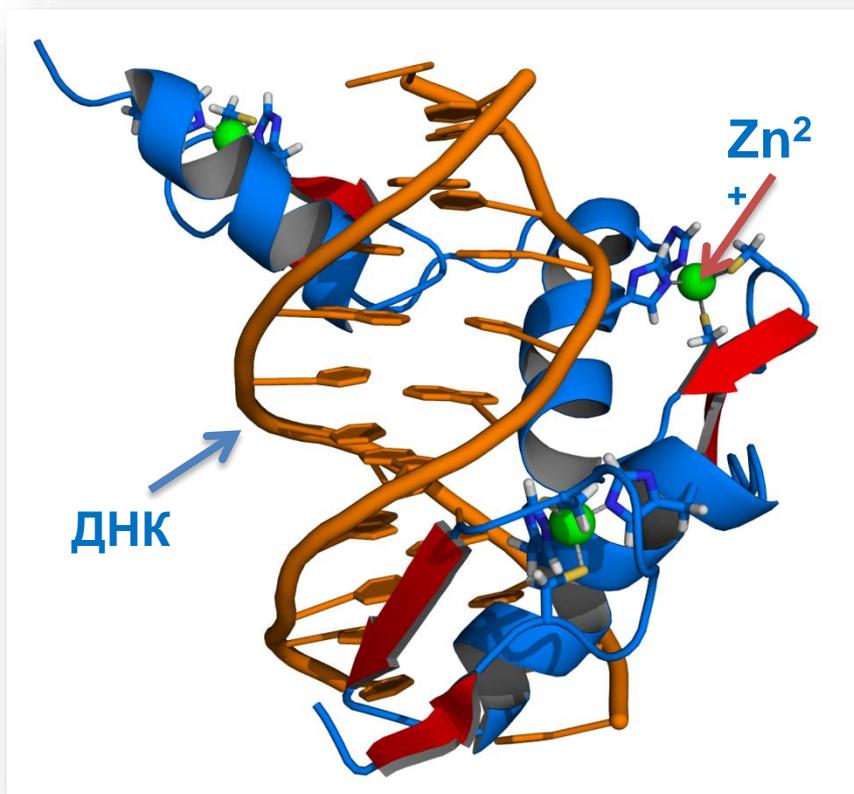


Введение неприродных аналогов аминокислот в белки *in vitro*



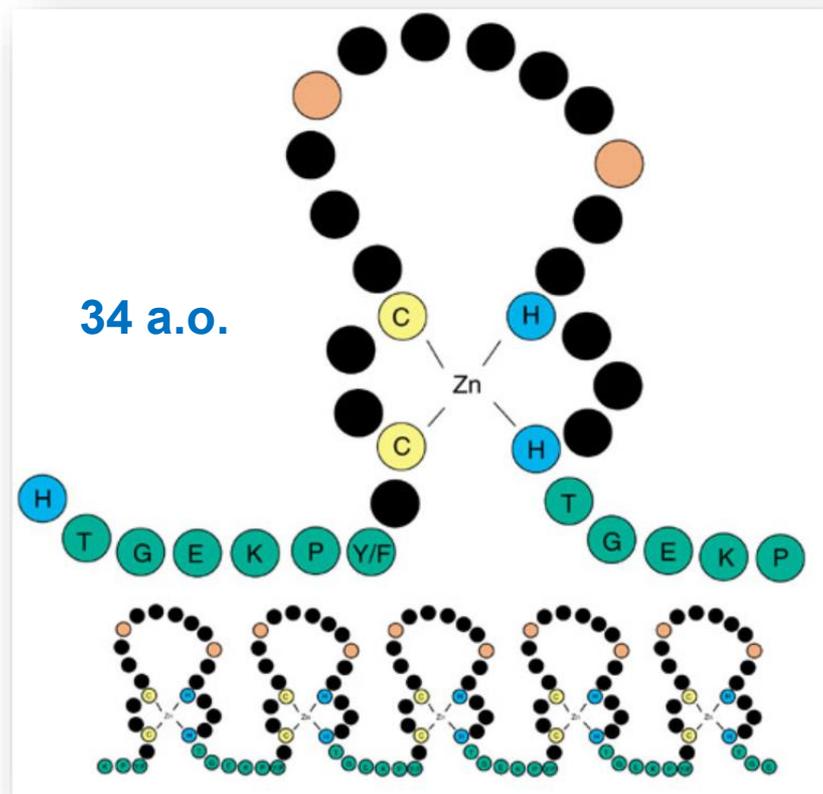
У Micrococcus luteus не задействованы 6 обычных кодонов

Белок Zif268, используемый при конструировании специфической эндонуклеазы



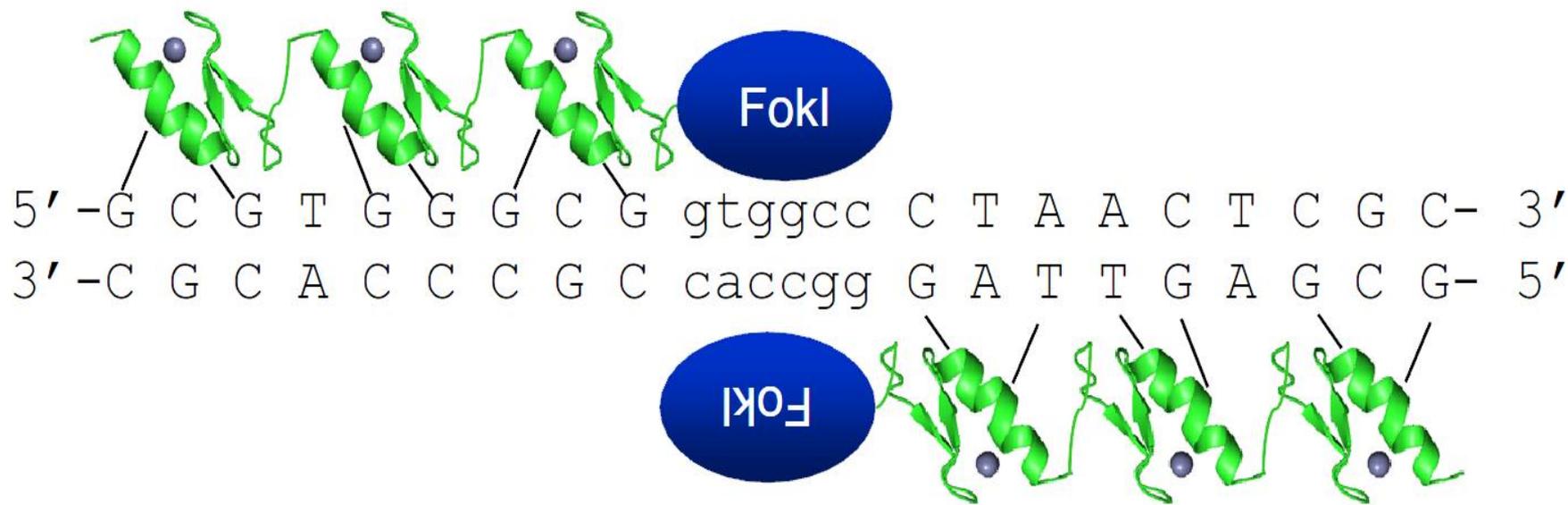
Пространственная структура комплекса белка Zif268 с ДНК. Показаны три домена типа «цинковые пальцы»

5'-GCG-TGG-GCG-3'



Домен типа «цинковые пальцы» C2H2. По два остатка цистеина (С) и гистидина (Н) координируют ион Zn^{2+} . Розовые АК-остатки – взаимодействие с ДНК.

Взаимодействие «цинковой» эндонуклеазы с ДНК-мишенью

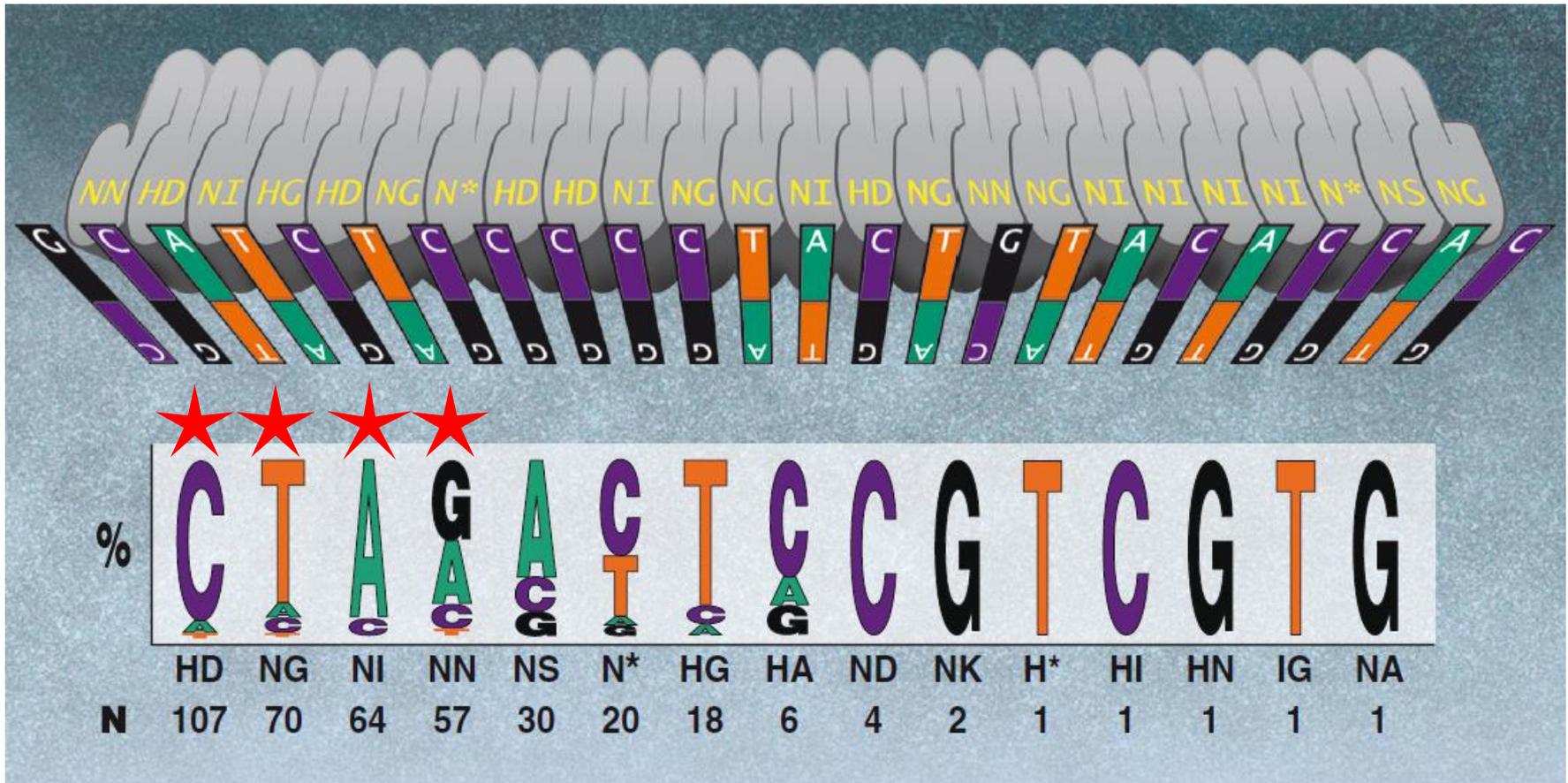


Для специфического разрезания ДНК требуется гетеродимеризация двух независимо сконструированных рекомбинантных «цинковых» эндонуклеаз

Функциональные домены, присоединяемые к «цинковым» белкам

Fusion	Function
VP16 ^a	Transcriptional activator
KRAB-A ^b	Transcriptional repressor
Progesterone Receptor and p65	Ligand dependent transcriptional activator
Protein methyl transferase (Suv39H1) ^c	Transcriptional repressor
DNA methyl transferase (M.SssI) ^d	Transcriptional repressor
DNA endonucleases (Fok1) ^e	DNA cleavage

Распознавание ДНК ТАЛ-эффе́кторами



В повторах длиной 34 а.о. в положениях 12 и 13 имеются два переменных а.о. (repeat-variable di-residue (RVD)), которые участвуют в распознавании нуклеотидов ДНК
 N – Asn, D – Asp, G – Gly, I – Ile

Cytoplasm

Engineered TAL effector protein



NUCLEUS

Targeted
DNA cleavage



FokI

FokI

Gene activation

AD

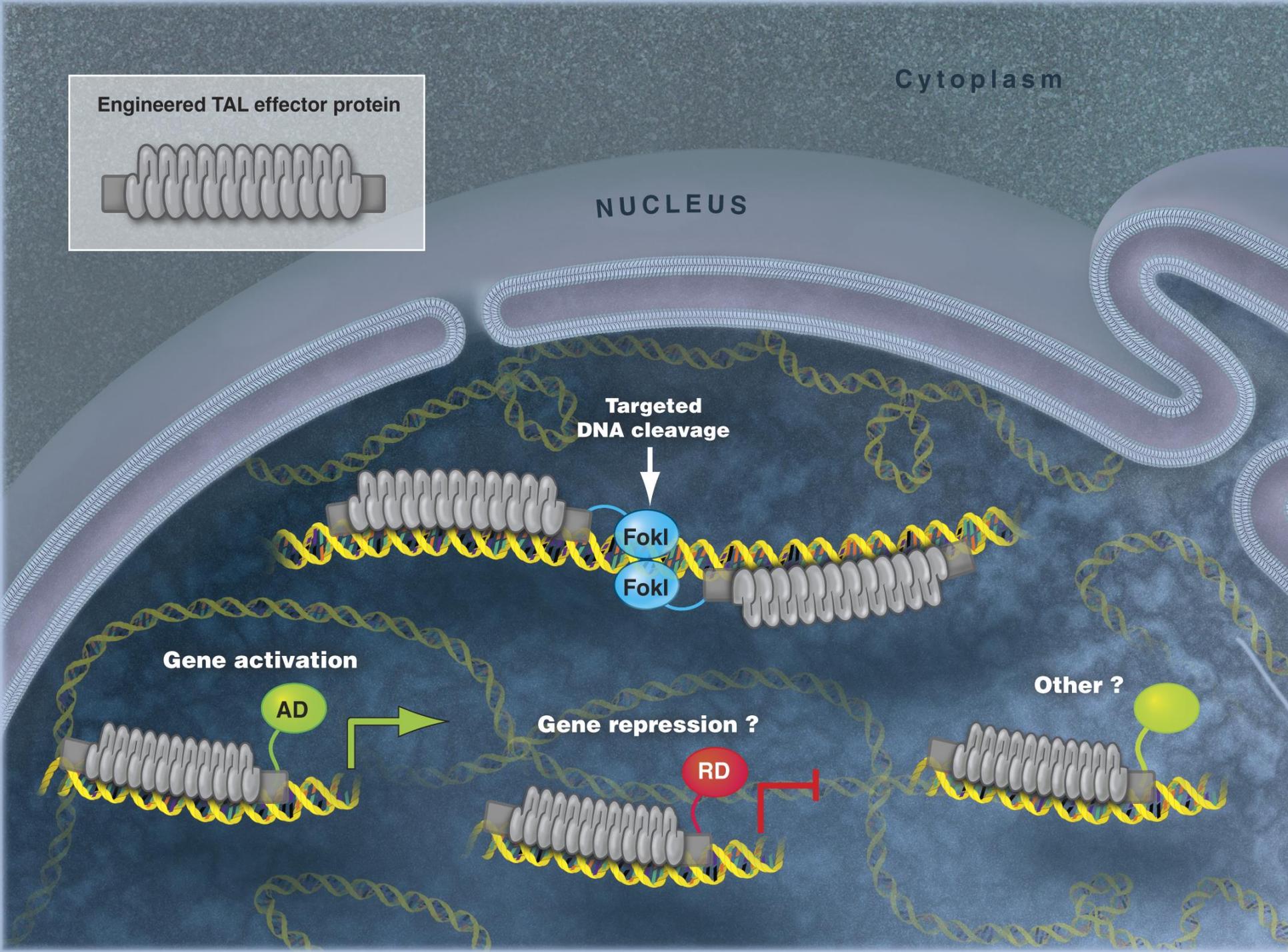


Gene repression ?

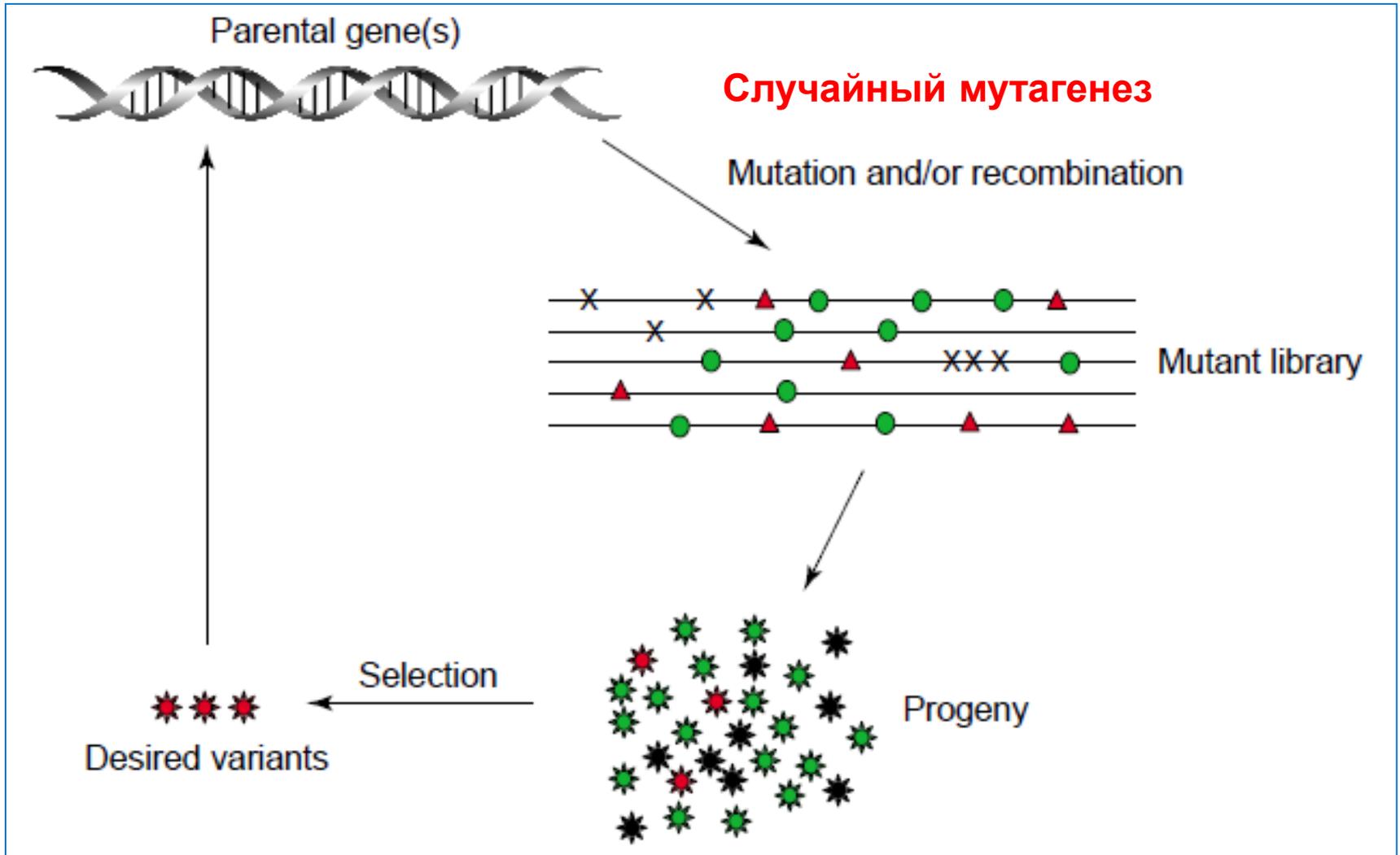
RD



Other ?



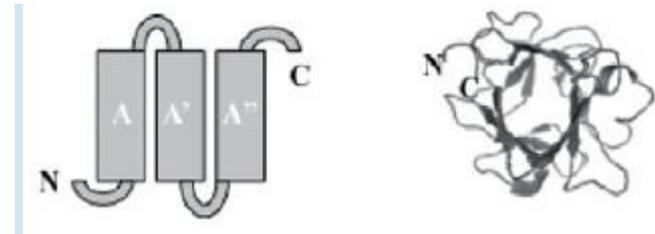
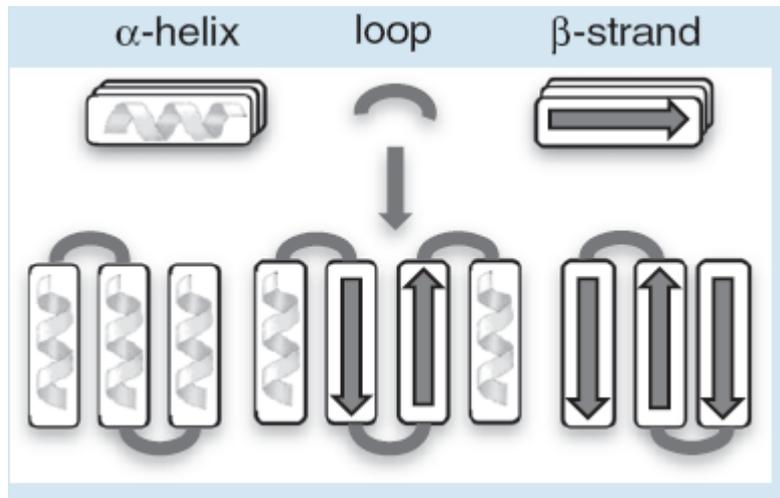
Стратегия проведения направленной эволюции макромолекул



Комбинаторные библиотеки искусственных белков

1. Библиотеки случайных полипептидов: 70-90 АК
...XXXXXXXXXXXXX...

2. Библиотеки модулей вторичной структуры: 5-10 АК

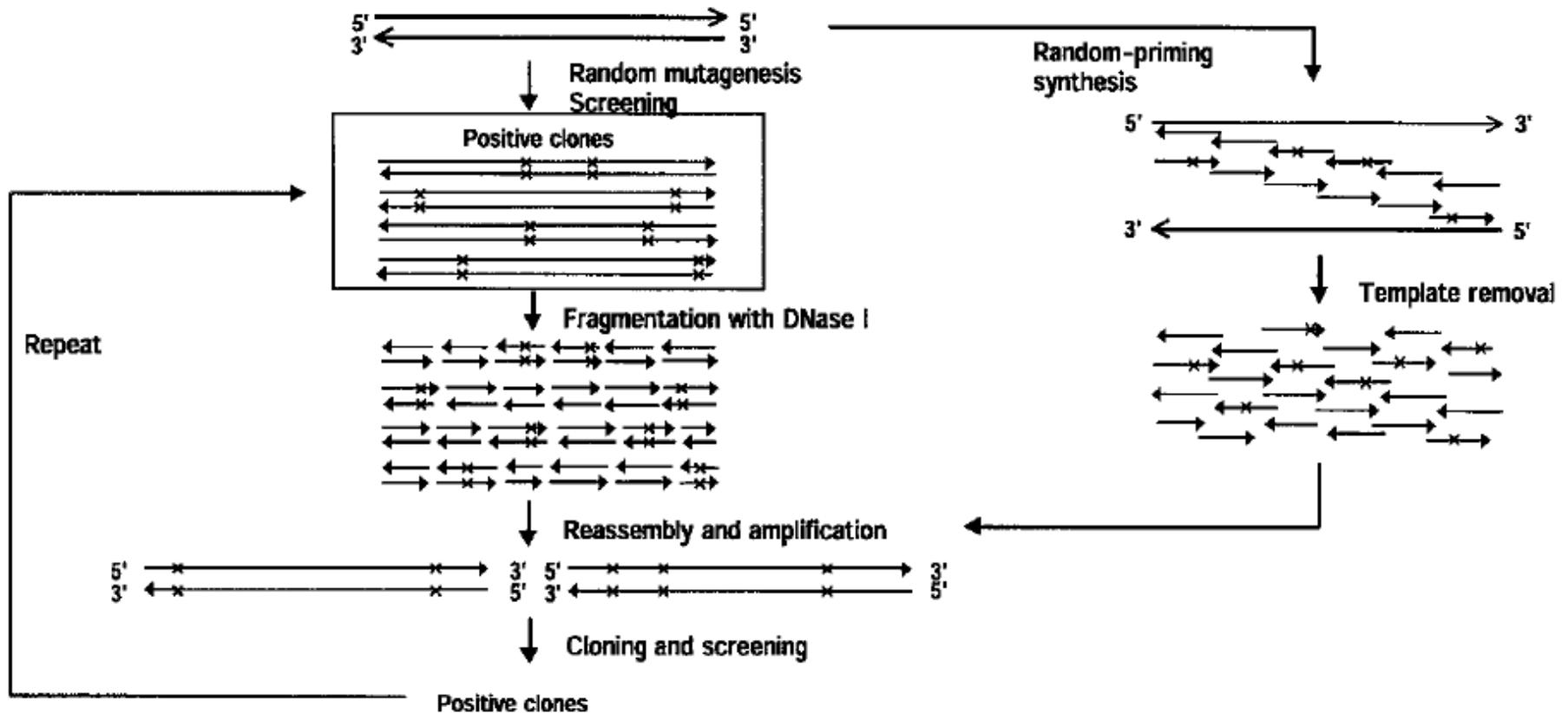


3. Библиотеки белков с внутренними повторами

Способы введения случайных мутаций

- ❖ **Химический мутагенез**
- ❖ **Синтез ДНК с ошибками**
- ❖ **Случайное объединение гомологичных участков генов (DNA shuffling)**
- ❖ **Удлинение ДНК с переменной матриц (Staggered Extension Process)**
- ❖ **Рекомбинирование фрагментов генов, *независимое от гомологии***

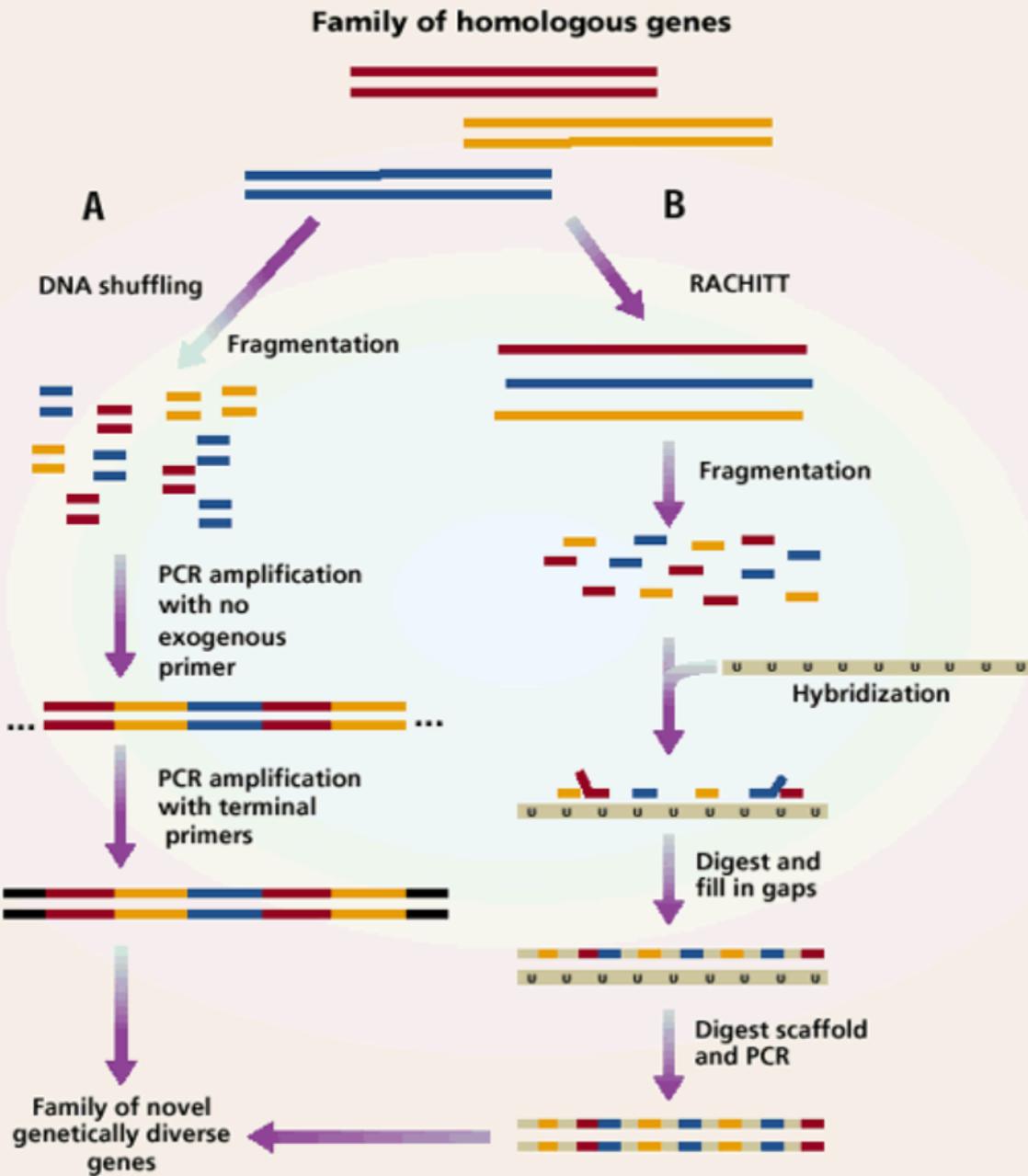
Два способа случайного объединения гомологичных мутантных фрагментов ДНК (DNA shuffling)



ДНКаза I

Случайные праймеры

DNA shuffling



A – Классический подход с фрагментацией ДНК ДНКазой I и двухступенчатой ПЦР

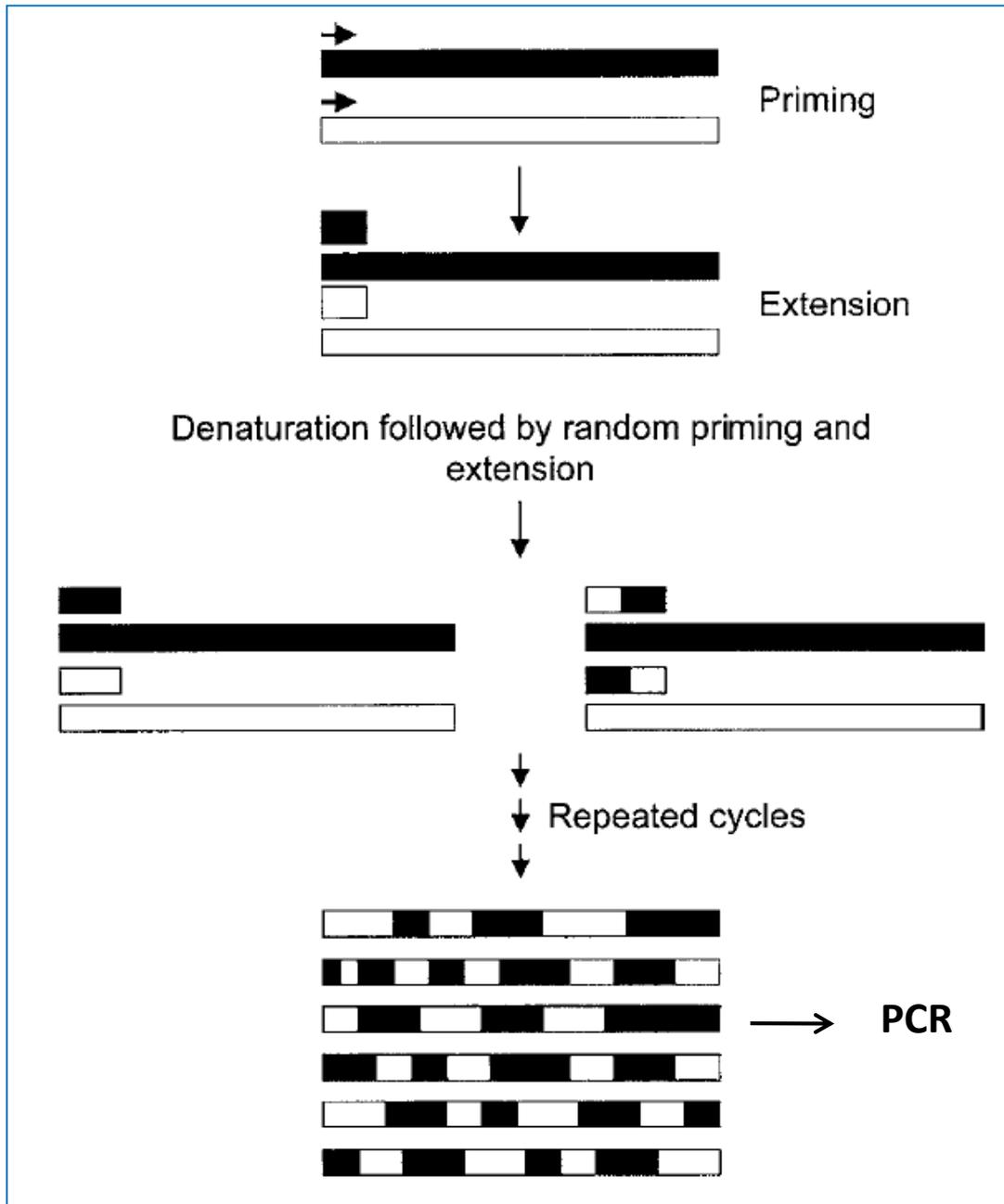
B – Сборка одноцепочечных фрагментов ДНК на ДНК-матрице

Удлинение ДНК с переменной матриц (Staggered Extension Process - StET)

Показаны две оцДНК-матрицы

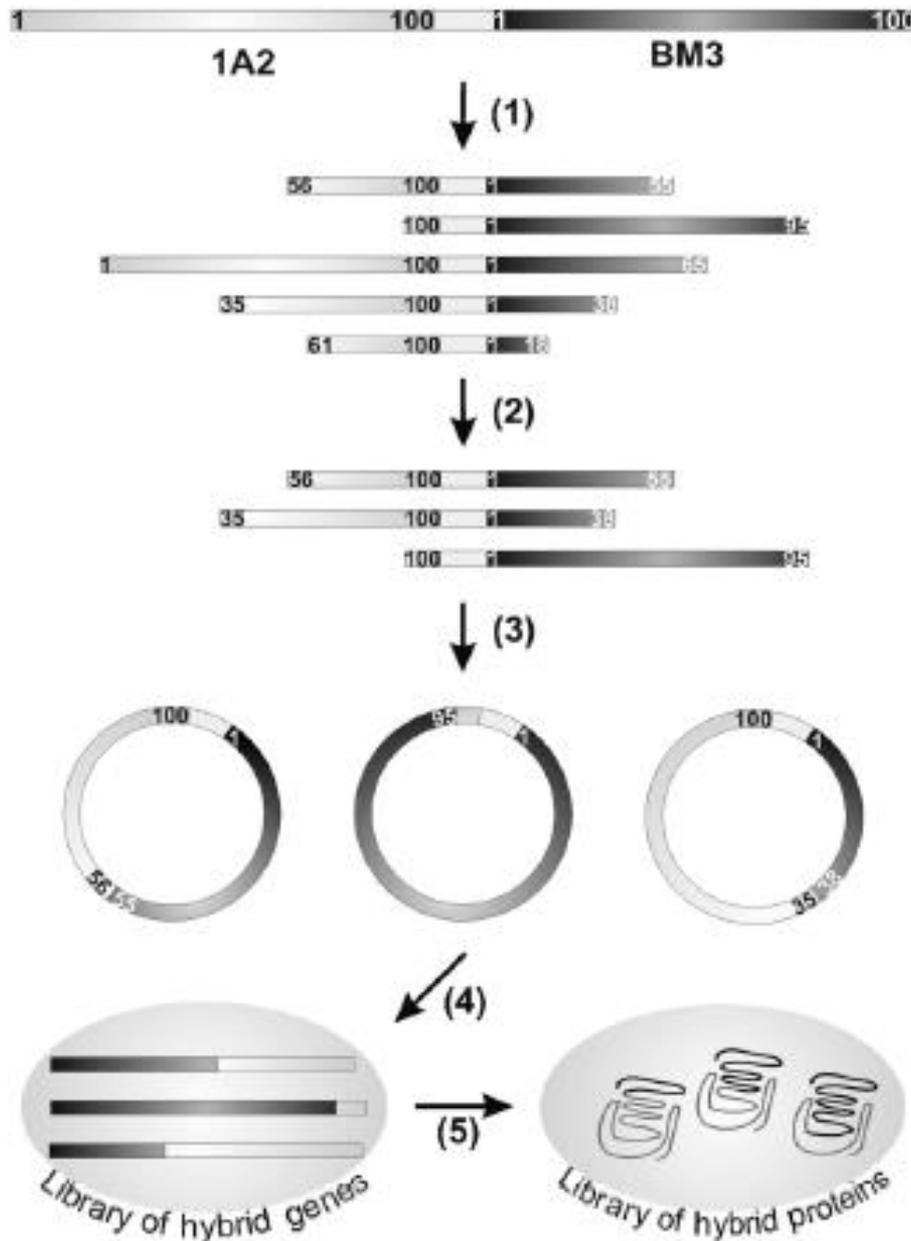
Повторяющиеся циклы кратковременных отжига-элонгации, которые прерываются денатурацией

Результат : после ПЦР полноразмерные химерные гены

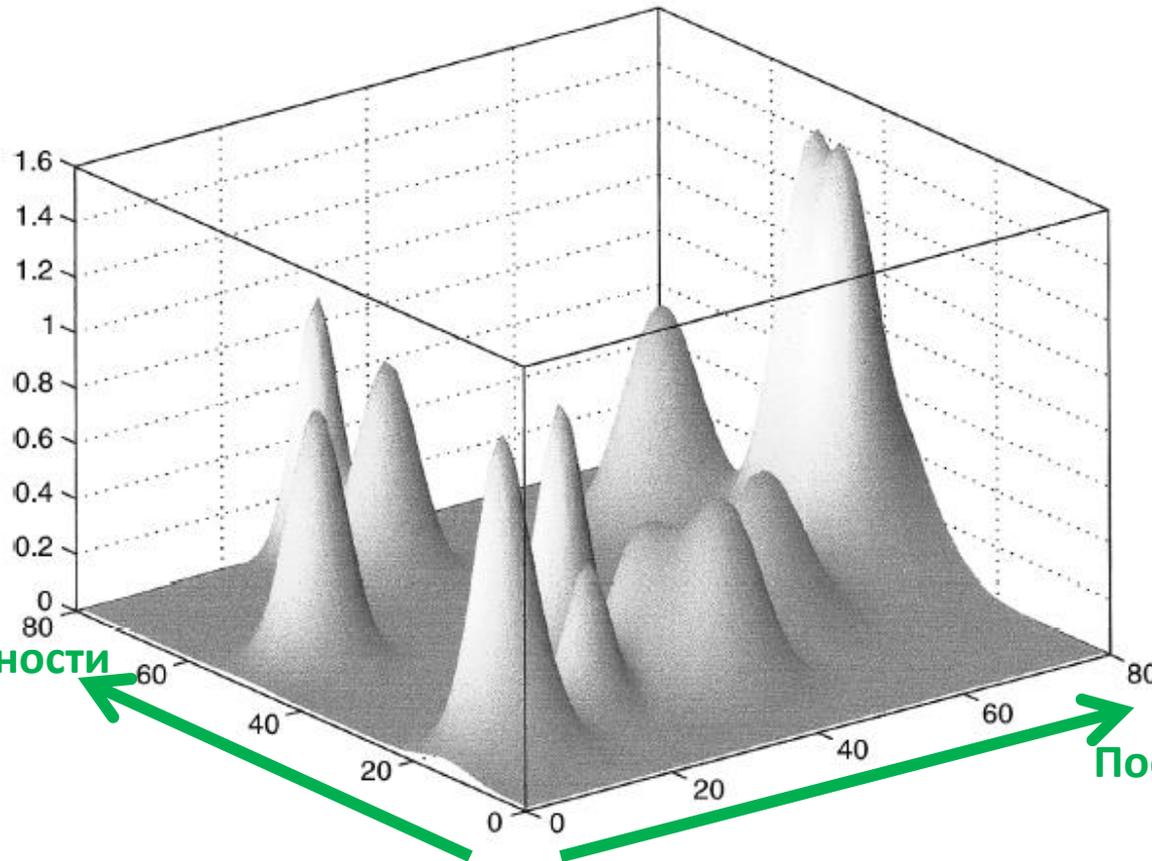


Объединение фрагментов генов, независимое от ГОМОЛОГИИ

- ❖ Объединение двух генов в виде димера «голова к хвосту» с помощью линкера
- ❖ Случайная фрагментация ДНКазой I; «затупление» концов S1-нуклеазой, фракционирование по размерам, близким к исходным размерам генов
- ❖ Внутримолекулярное лигирование по «тупым концам с образованием кольцевых молекул
- ❖ Линеаризация с помощью рестриктаз по последовательностям линкера



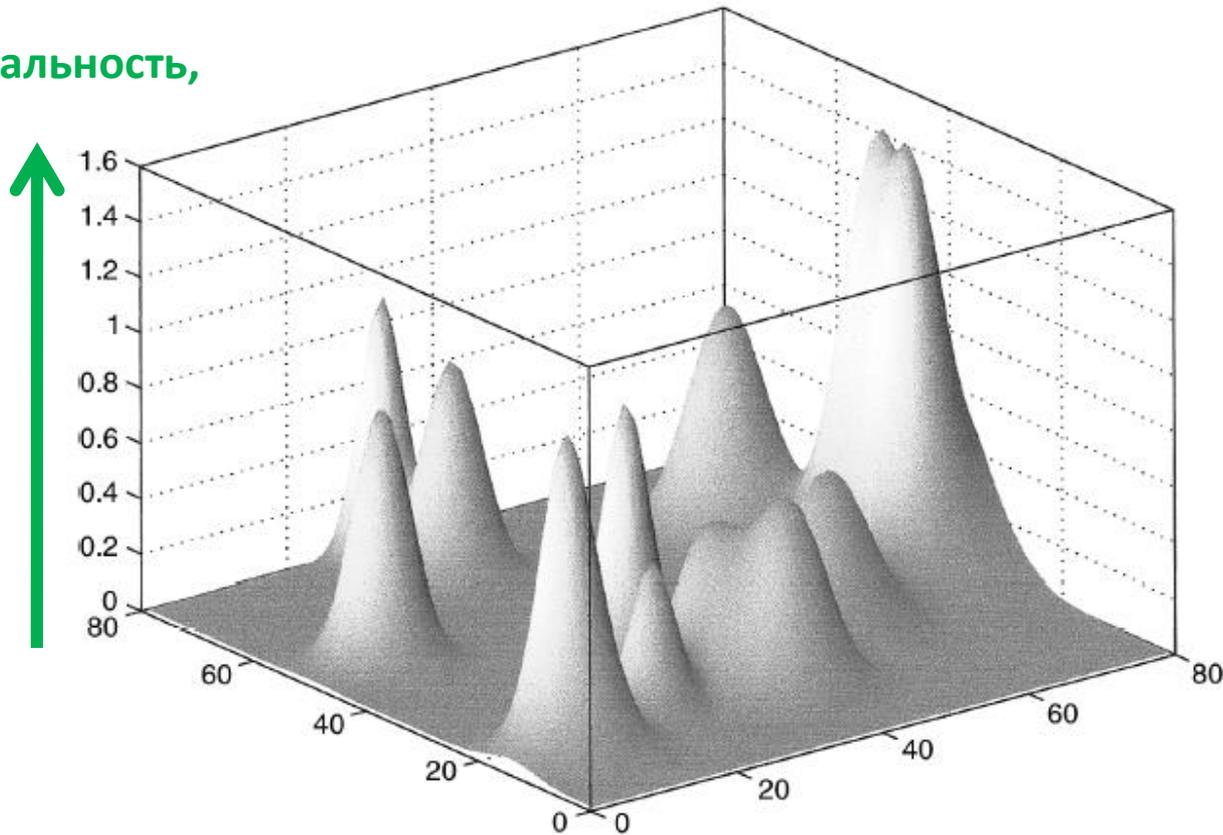
Ландшафт функциональности среди пространства последовательностей белковых молекул.



Пространство последовательностей (sequence space) - Совокупность всех возможных последовательностей аминокислотных остатков полипептидной цепи (или полинуклеотида) определенной длины (100-звенный полипептид: $20^{100} \sim 10^{130}$)

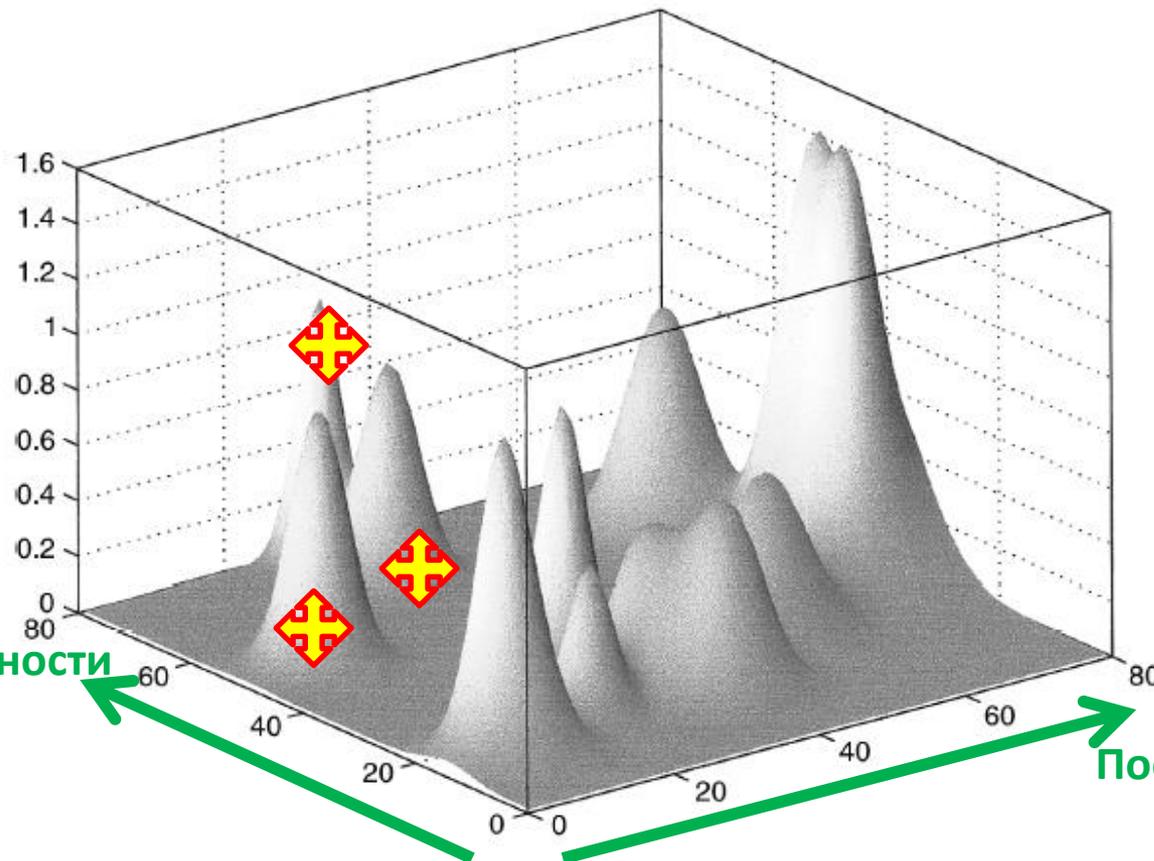
Ландшафт функциональности среди пространства последовательностей белковых молекул.

Функциональность,
 K_M и т.д.



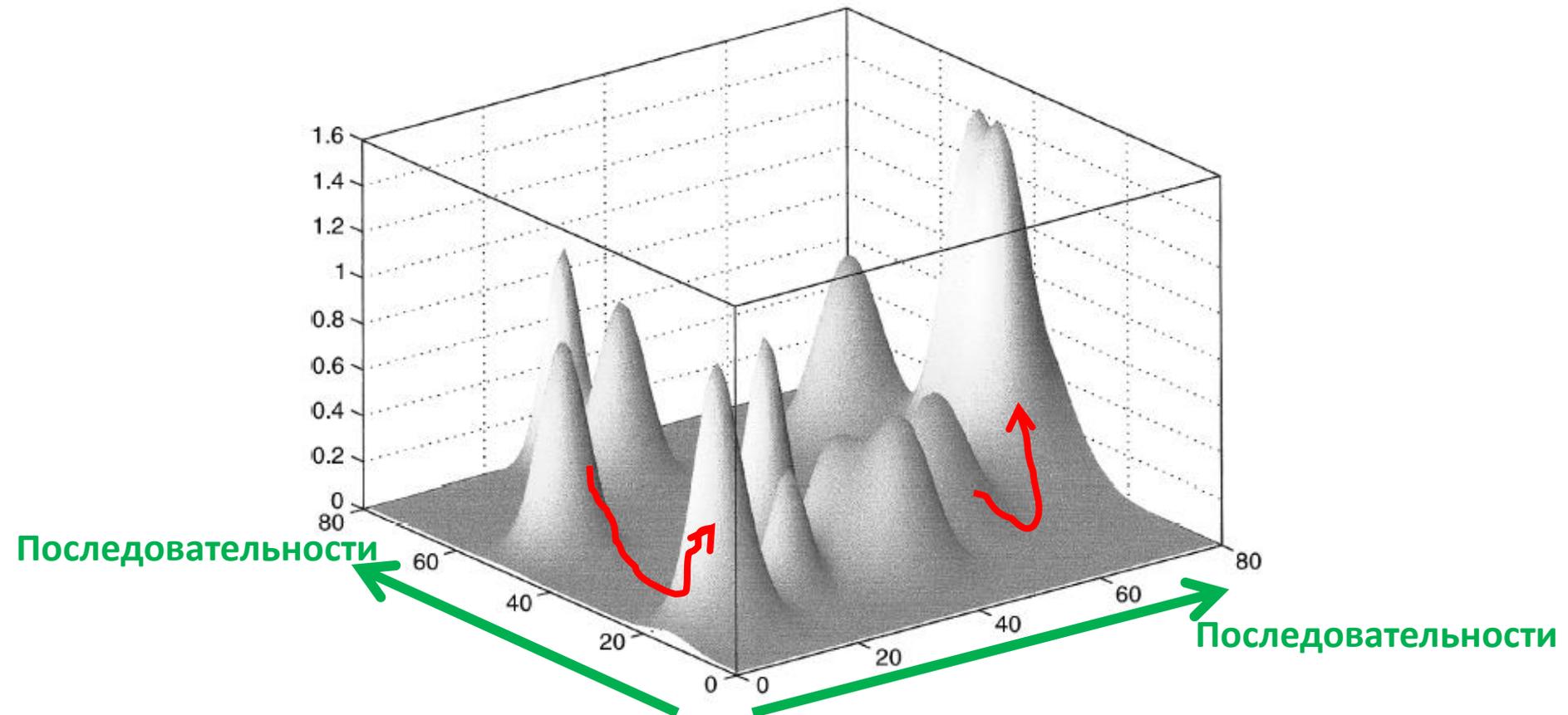
Ландшафты функциональности (fitness landscapes) - отдельные холмы представляют разные функции белков анализируемого пространства последовательностей. *Вершины холмов соответствуют макромолекулам с максимальной функциональностью*

Ландшафт функциональности среди пространства последовательностей белковых молекул.



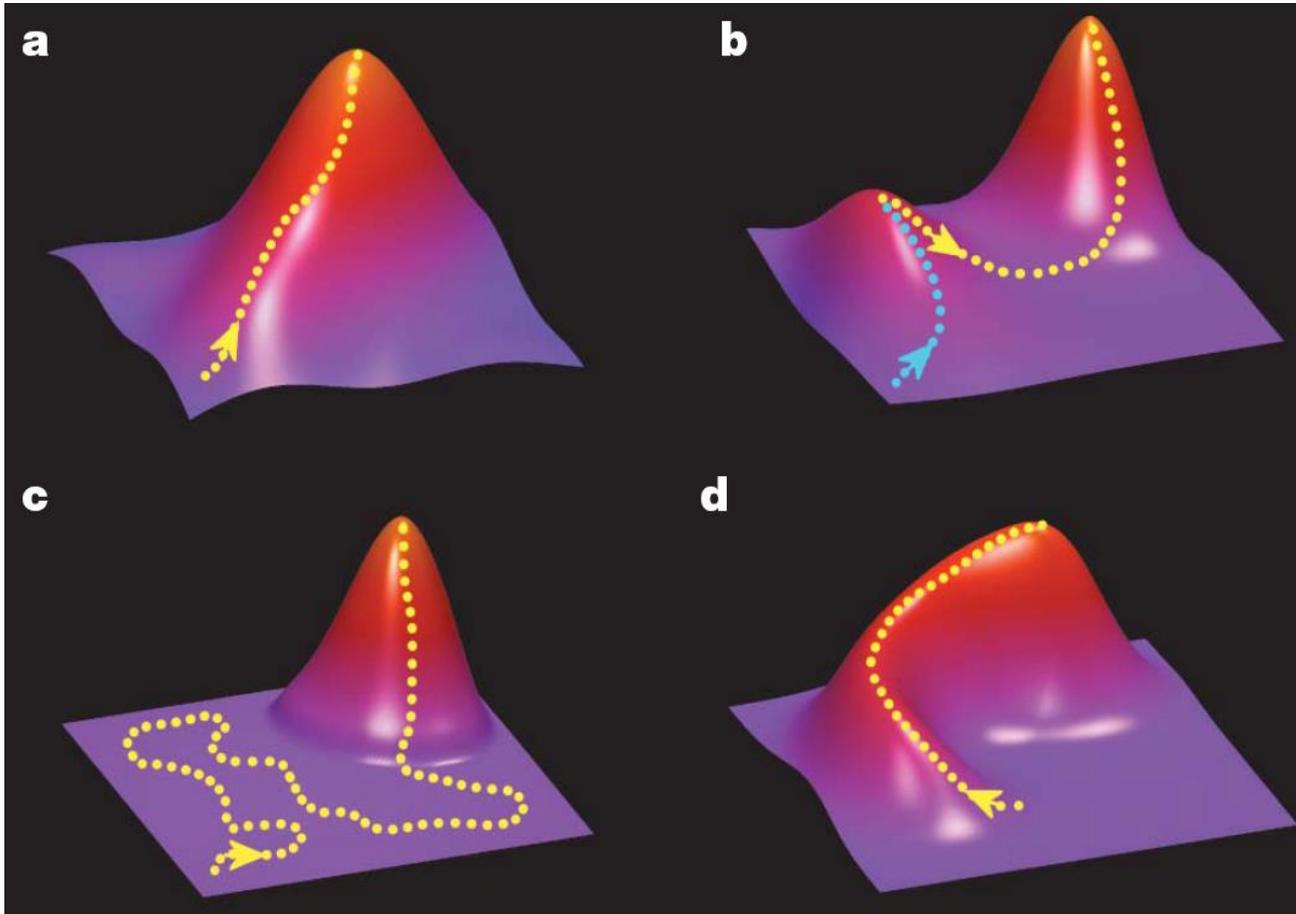
Природные последовательности составляют отдельную немногочисленную группу общего пространства

Ландшафт функциональности среди пространства последовательностей белковых молекул.



Введение множественных мутаций позволяет **пересекать биологически-инертные пространства последовательностей** и попадать в зоны новых холмов, на их склоны)

Эволюционные способы достижения максимальной функциональности белка



Точки – новые мутантные последовательности

a – Все прямые пути к вершине повышают функциональность

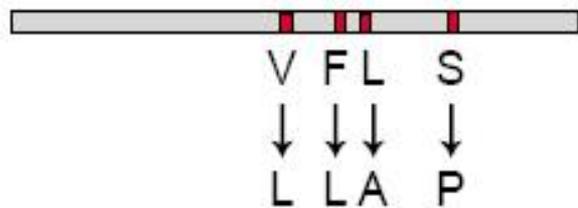
b – Множественные пики. Эволюционная ловушка

c – Ландшафт с нейтральными мутациями

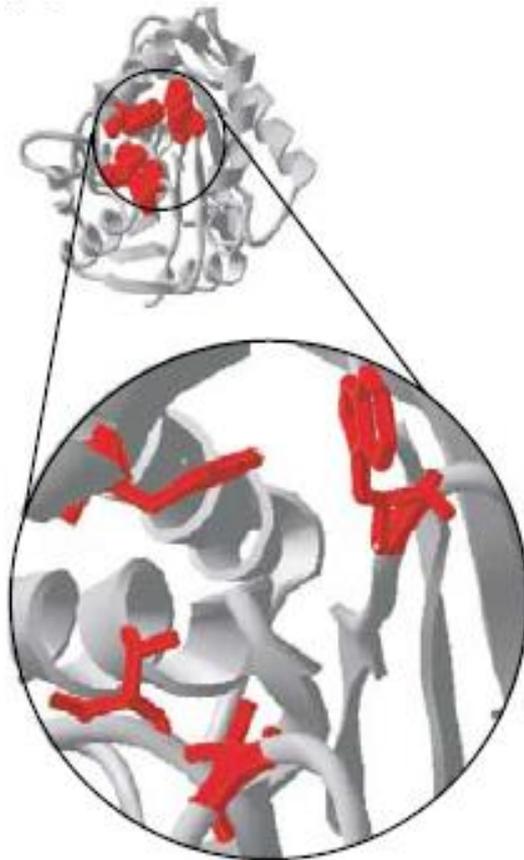
d – Ландшафт с обходным путем. Анализ аминокислотной последовательности не приводит к выявлению последовательности возникновения полезных мутаций

Последствия мутагенеза разного типа для белковых молекул

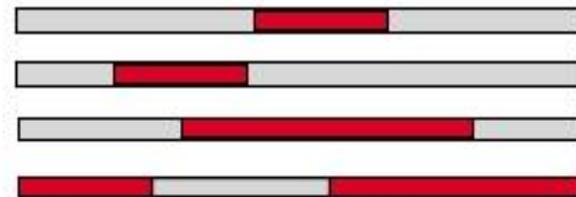
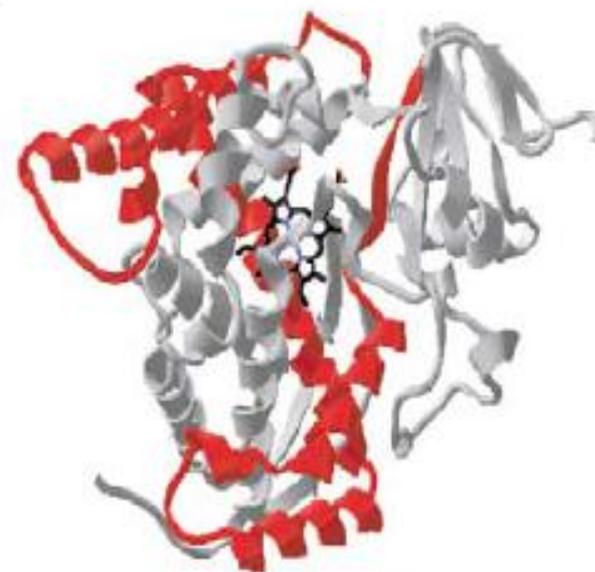
(a)



(b)



(c)



Тип мутагенеза:

а) случайный

б) направленный

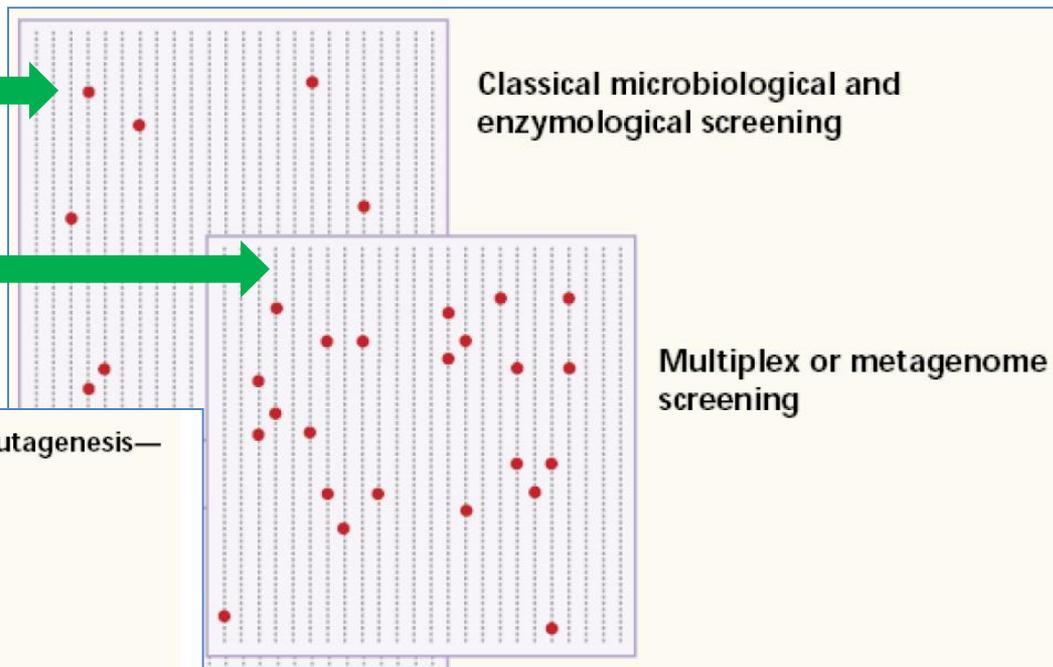
с) ДНК-шаффлинг

Перемещение по пространству последовательностей белковых молекул с помощью разных методов отбора и белковой инженерии

Классический
микробиологический отбор

Множественный метагеномный
отбор

Направленный или случайный
мутагенез – локальное движение



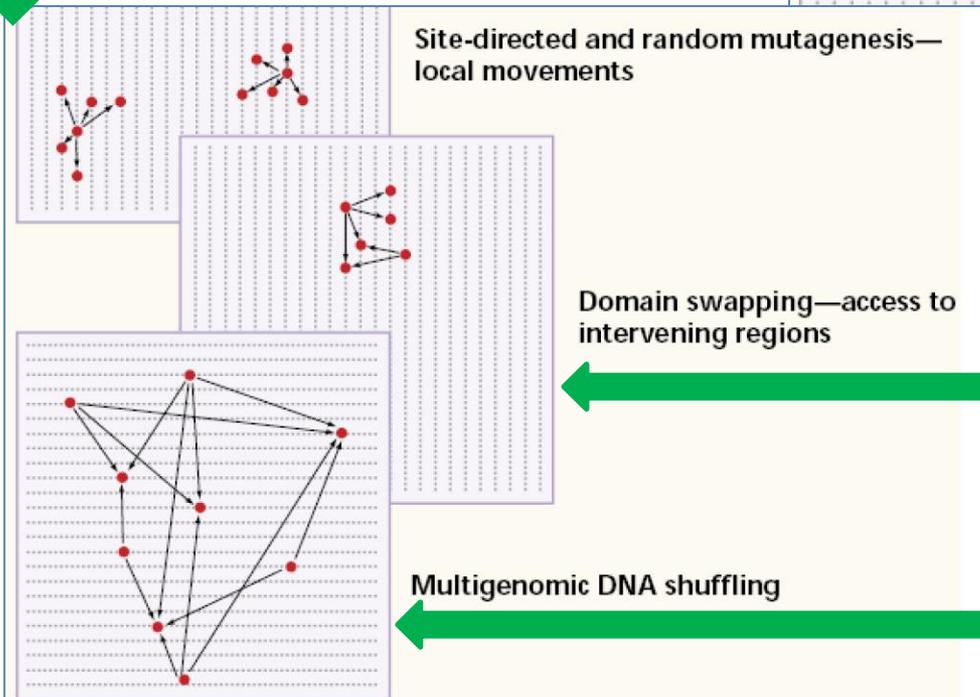
Site-directed and random mutagenesis—
local movements

Domain swapping—access to
intervening regions

Multigenomic DNA shuffling

Шаффлинг (перетасовка) доменов
– доступ к внутренним доменам

Мультигеномный шаффлинг
(перетасовка) фрагментов ДНК



Локализация мутаций в полипептидных цепях ферментов при разной направленности отбора

Мутации локализуются вблизи активного центра при отборе:

Энантиселективности

Субстратной специфичности

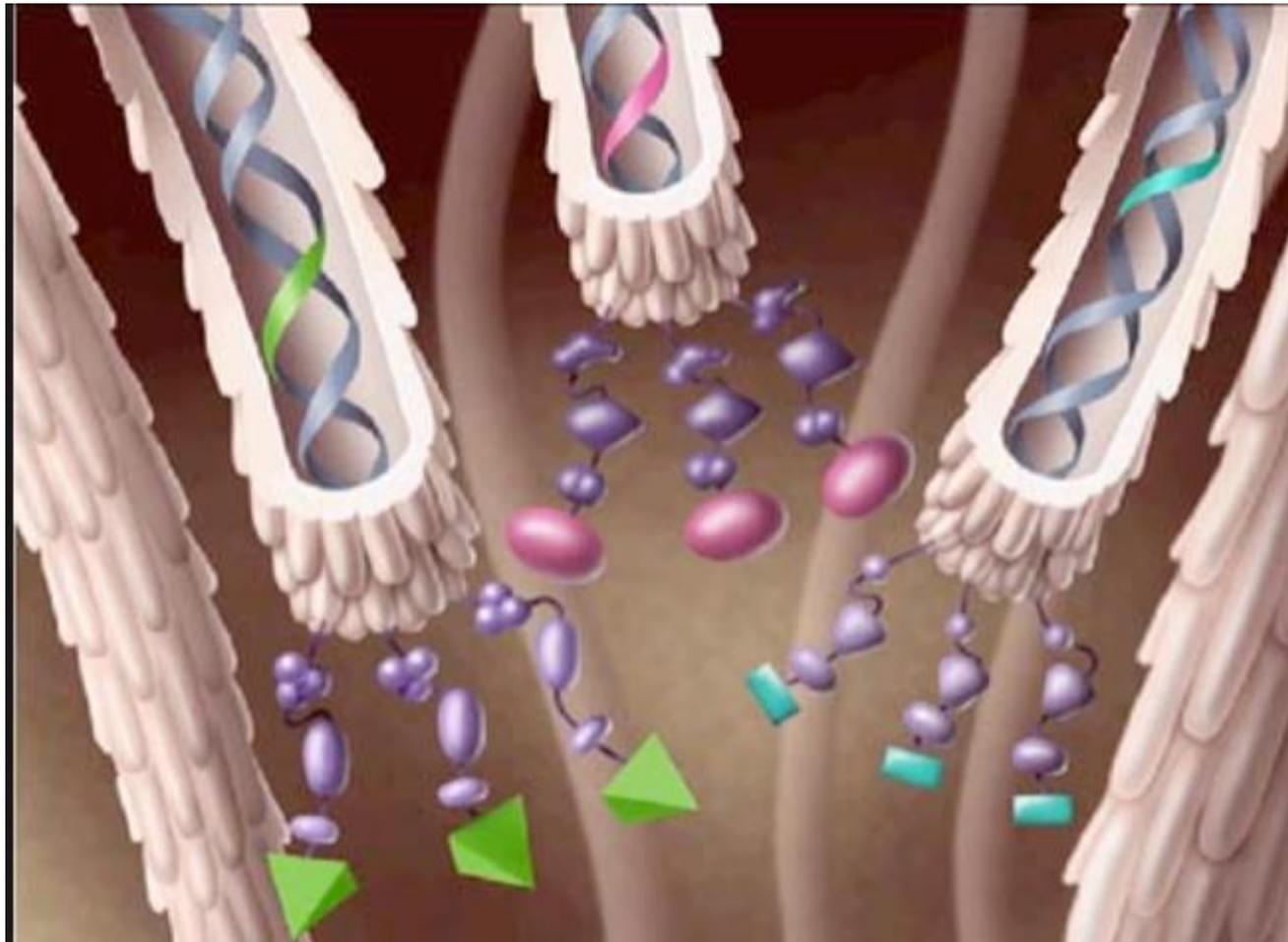
Альтернативной каталитической активности

Мутации локализуются как вблизи активного центра, так и вдали от него при отборе:

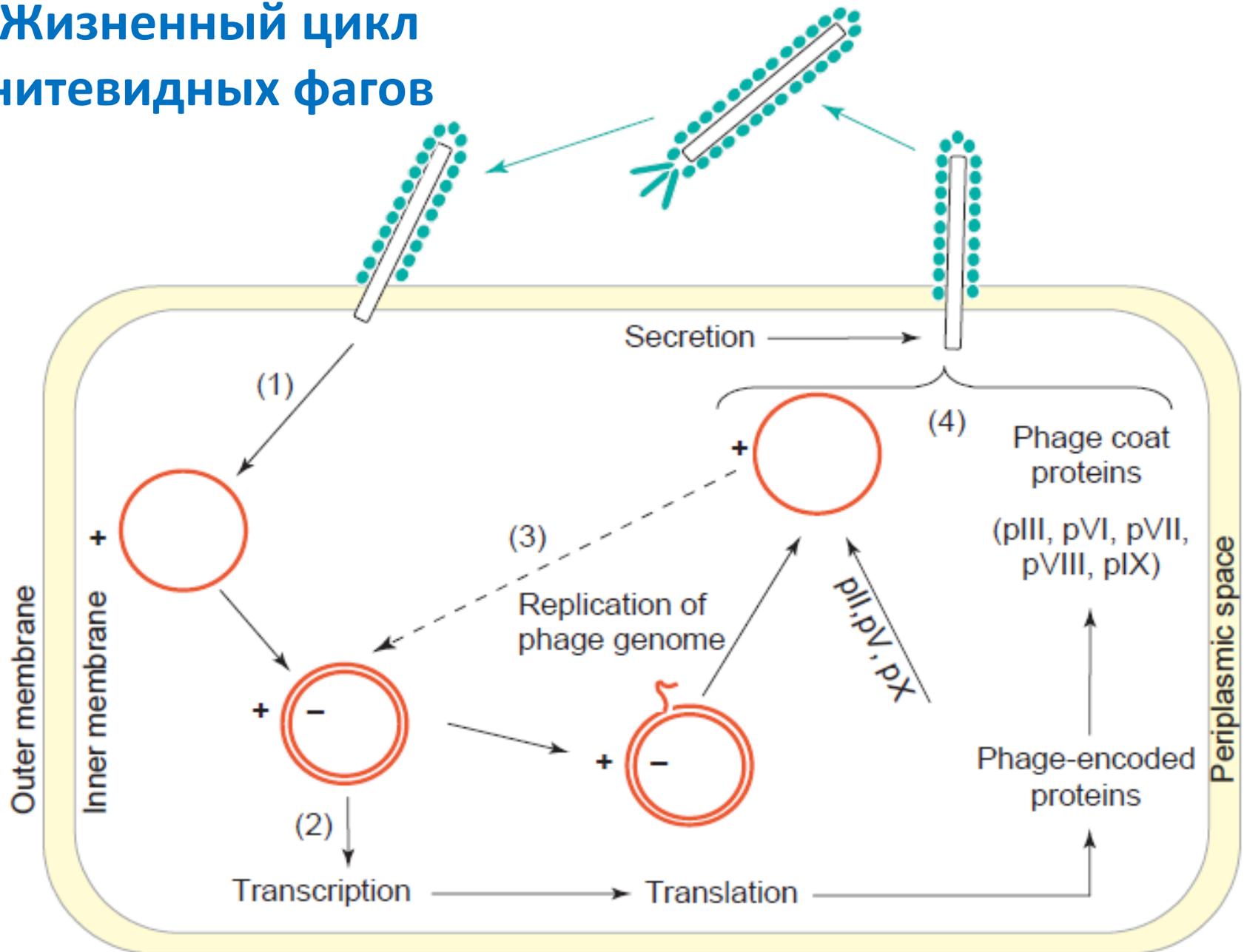
Удельной активности

Термостабильности

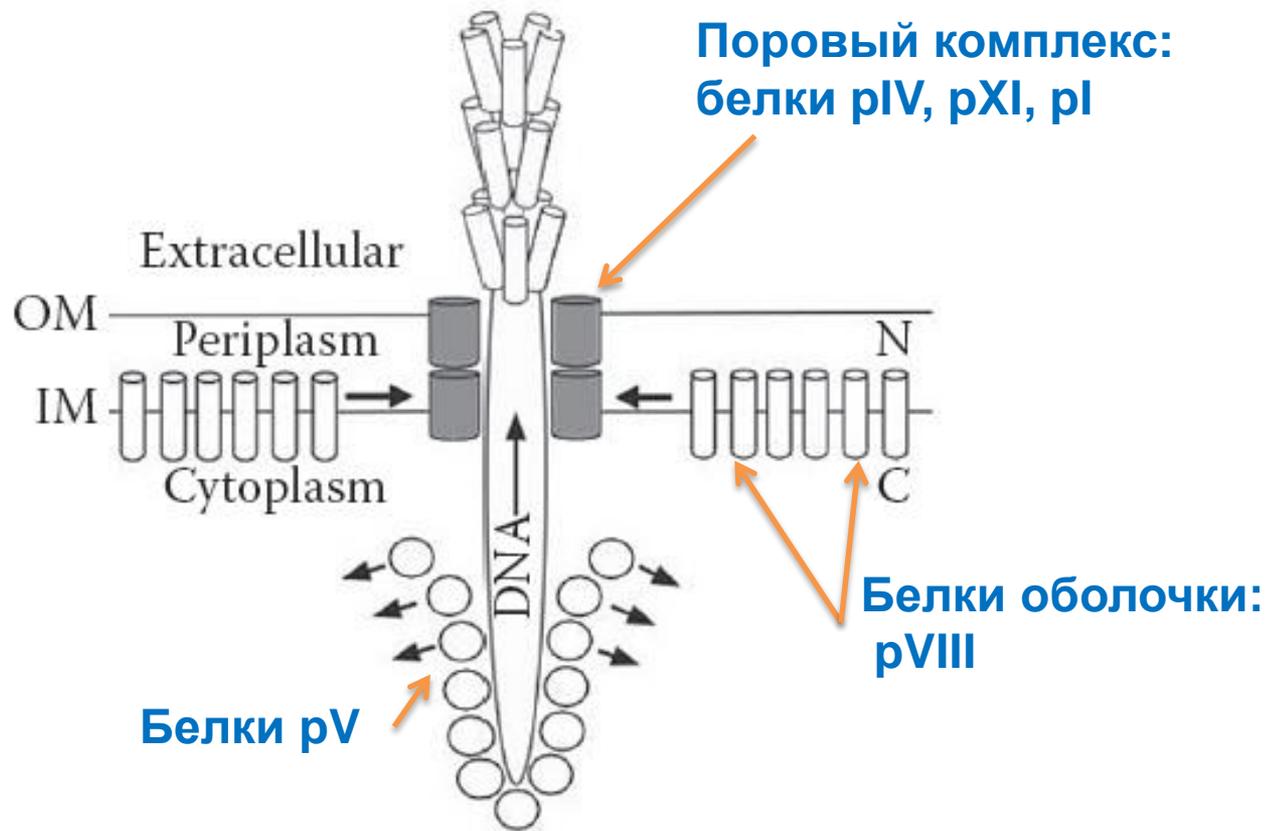
Методы отбора белков при их направленной эволюции: *фаговый дисплей*



Жизненный цикл нитевидных фагов

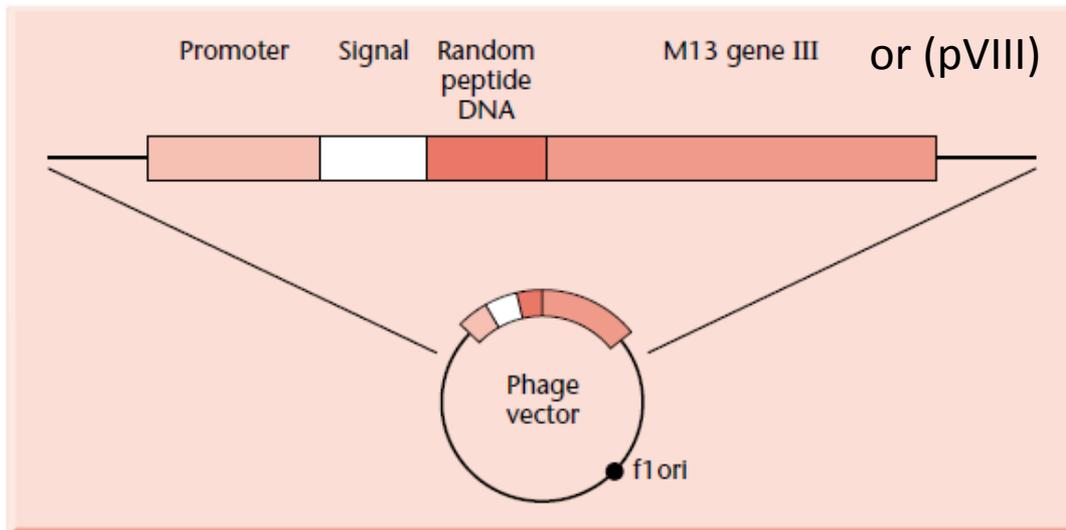


Сборка капсида нитевидного бактериофага



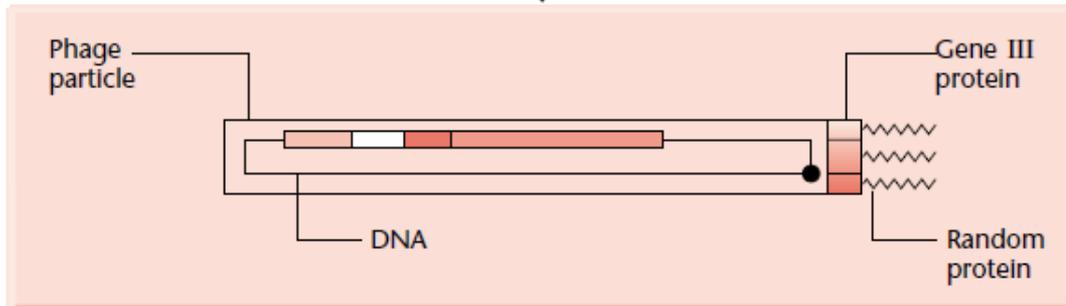
При переносе
через пору
оцДНК фага
освобождается
от белков pV и
покрывается
белками
оболочки pVIII

Фаговый дисплей



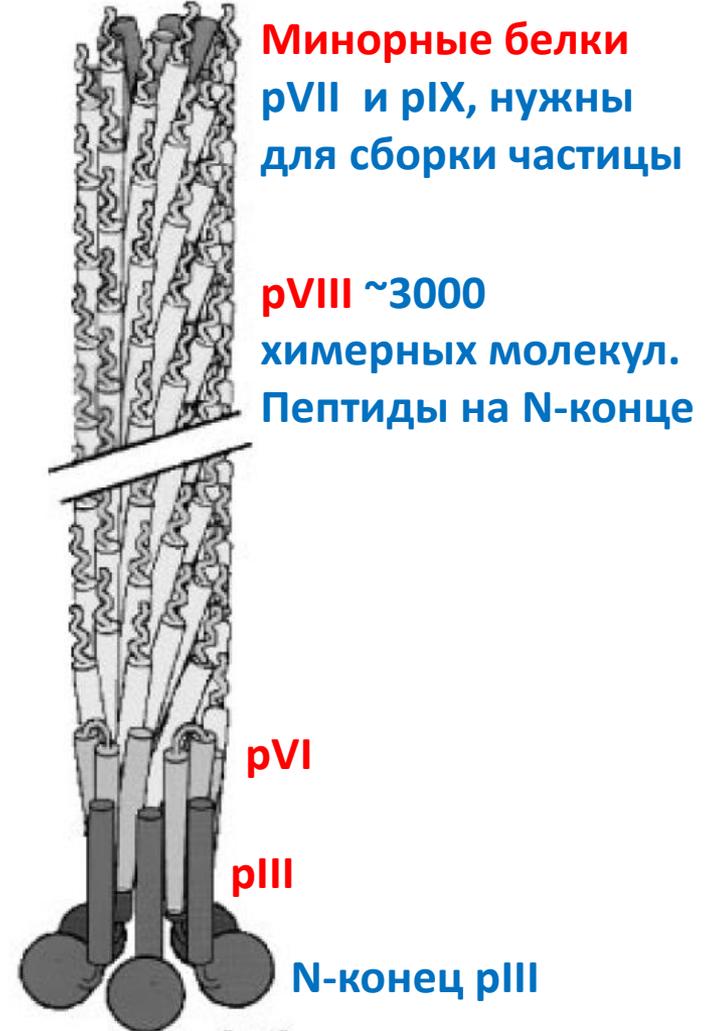
Заражение мужских клеток *E.coli*

Infect male *E. coli*



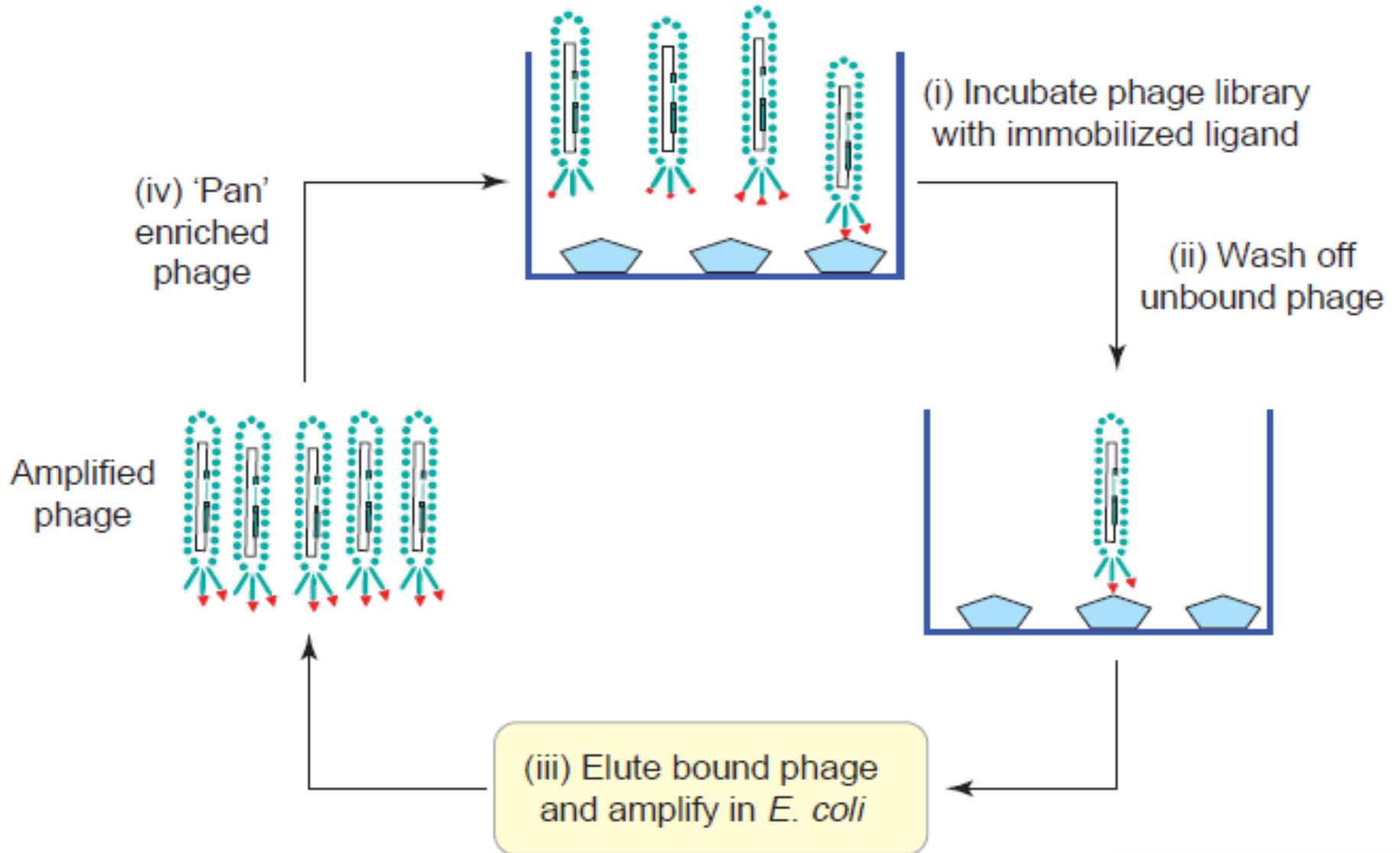
Связывание с рецептором

Test binding to antibody or receptor

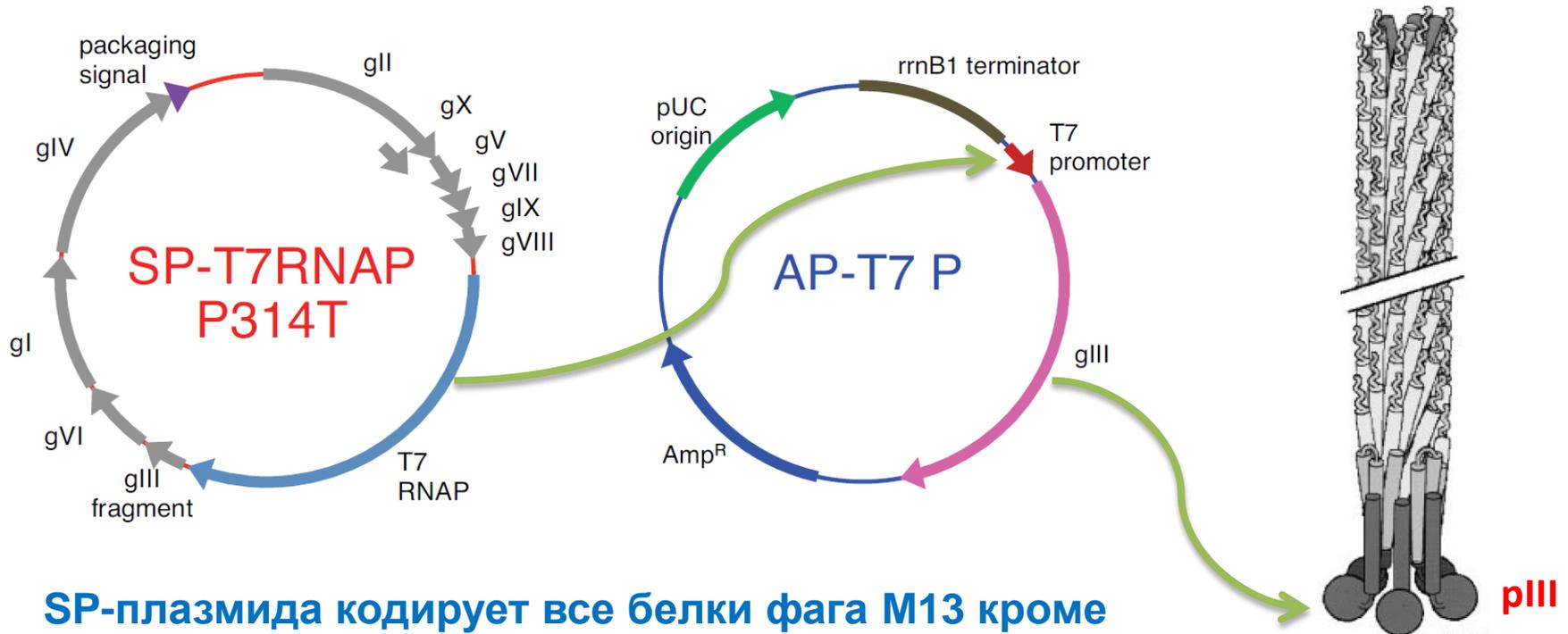


Вирусная частица (вирион) фага M13

Отбор пептидов из библиотеки методом фагового дисплея



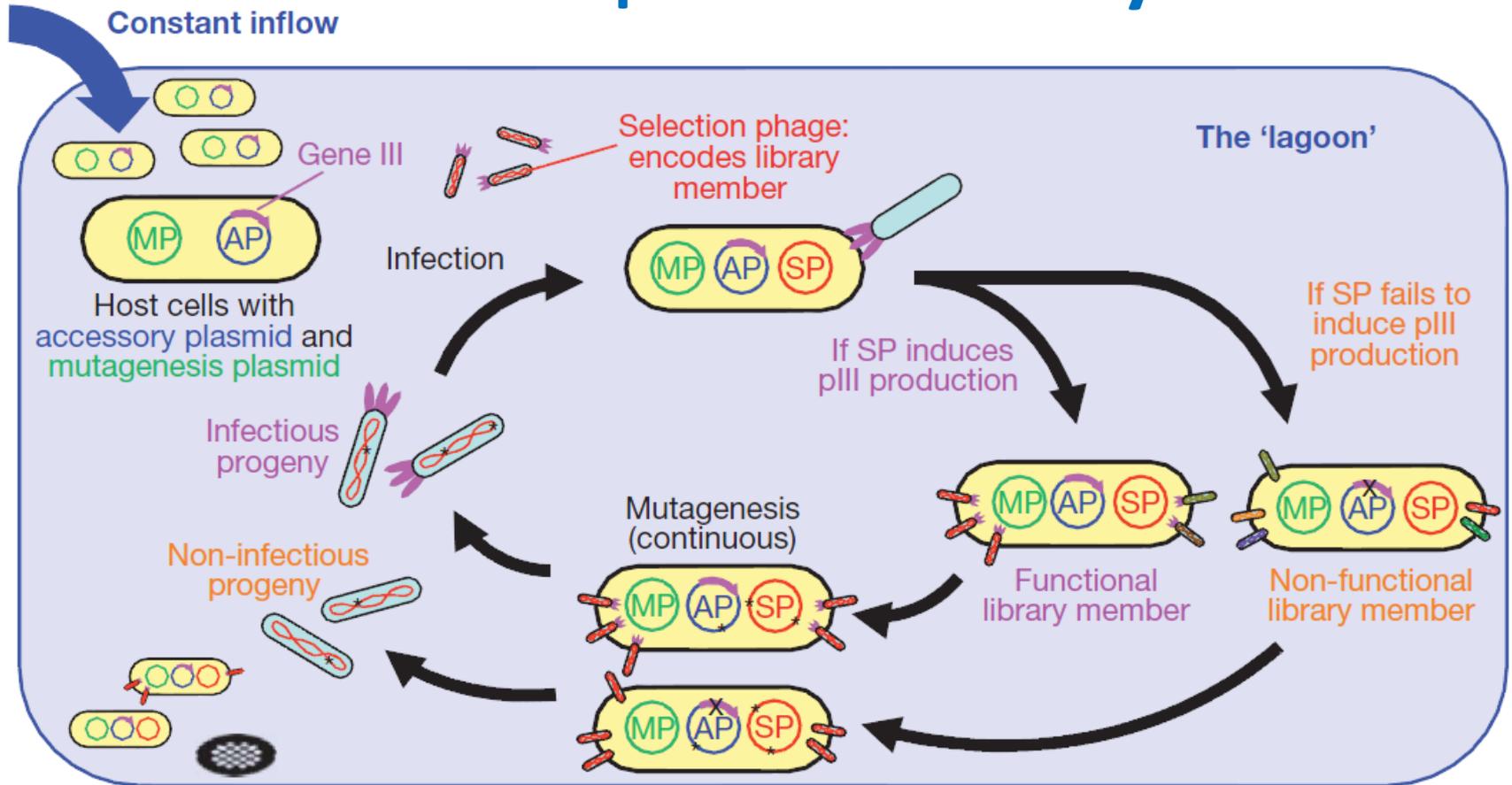
Получение T7-РНК-полимеразы, узнающей новый промотор



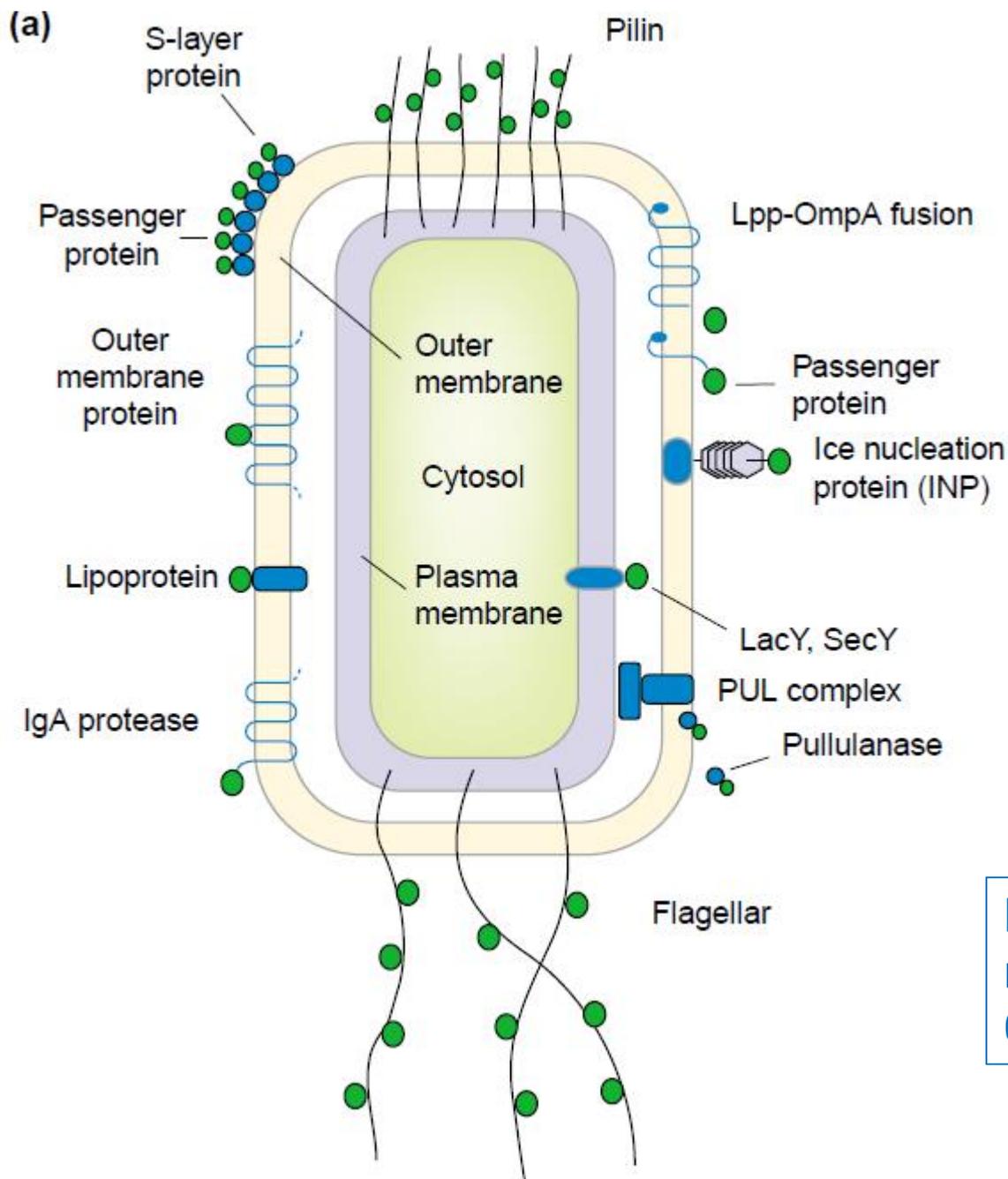
SP-плазида кодирует все белки фага M13 кроме pIII, а также мутантную T7-РНК-полимеразу

Если мутантная T7-РНК-полимераза узнает промотор на AP-плазмиде, то синтезируется недостающий белок pIII и образуются жизнеспособные фаговые частицы, способные заражать новые клетки

Система непрерывной направленной эволюции биомолекул

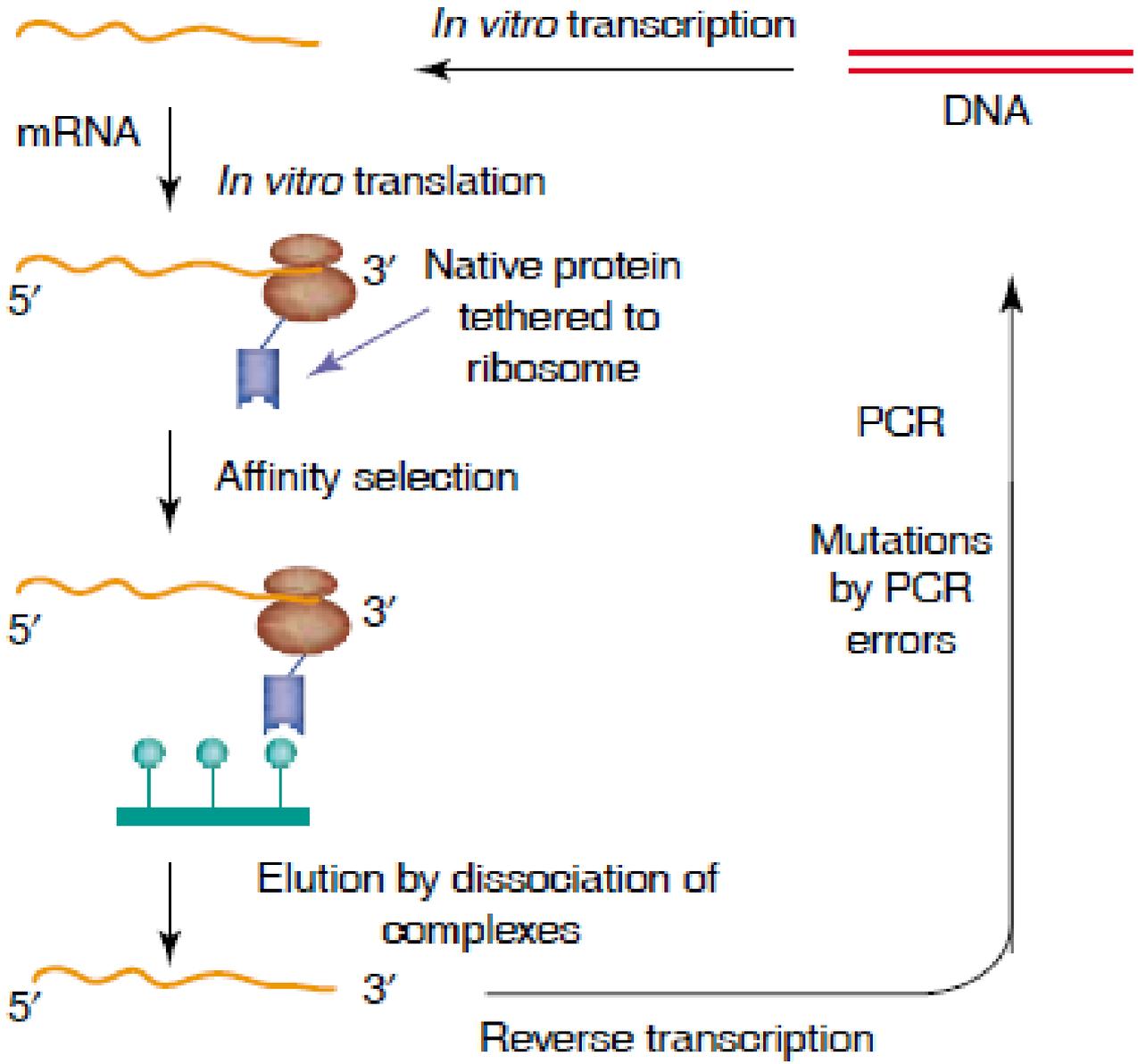


MP – мутагенизирующая плаزمида, **AP** – плазмида с геном, комплементирующим мутацию у фага (белок pIII), **SP** – фаговый геном с селектируемым геном T7RNA-Pol



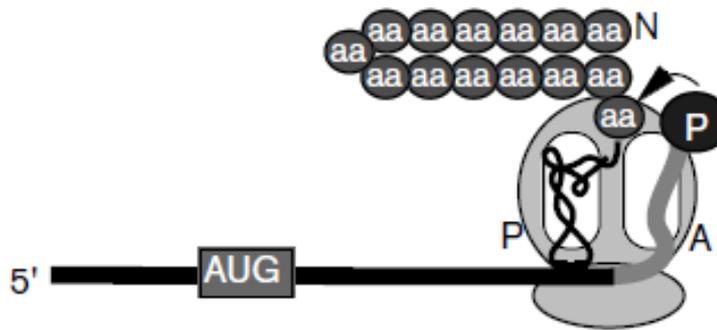
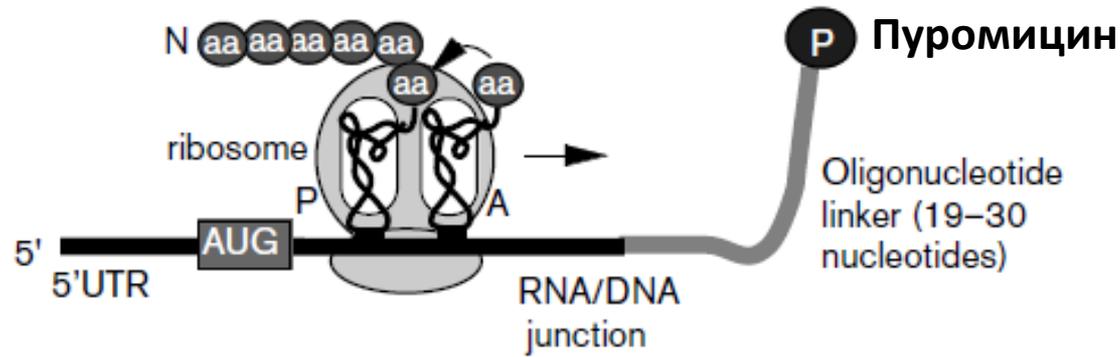
Бактериальный дисплей (*E. coli*)

Разработан также для грамположительных бактерий и дрожжей



Рибосомный дисплей

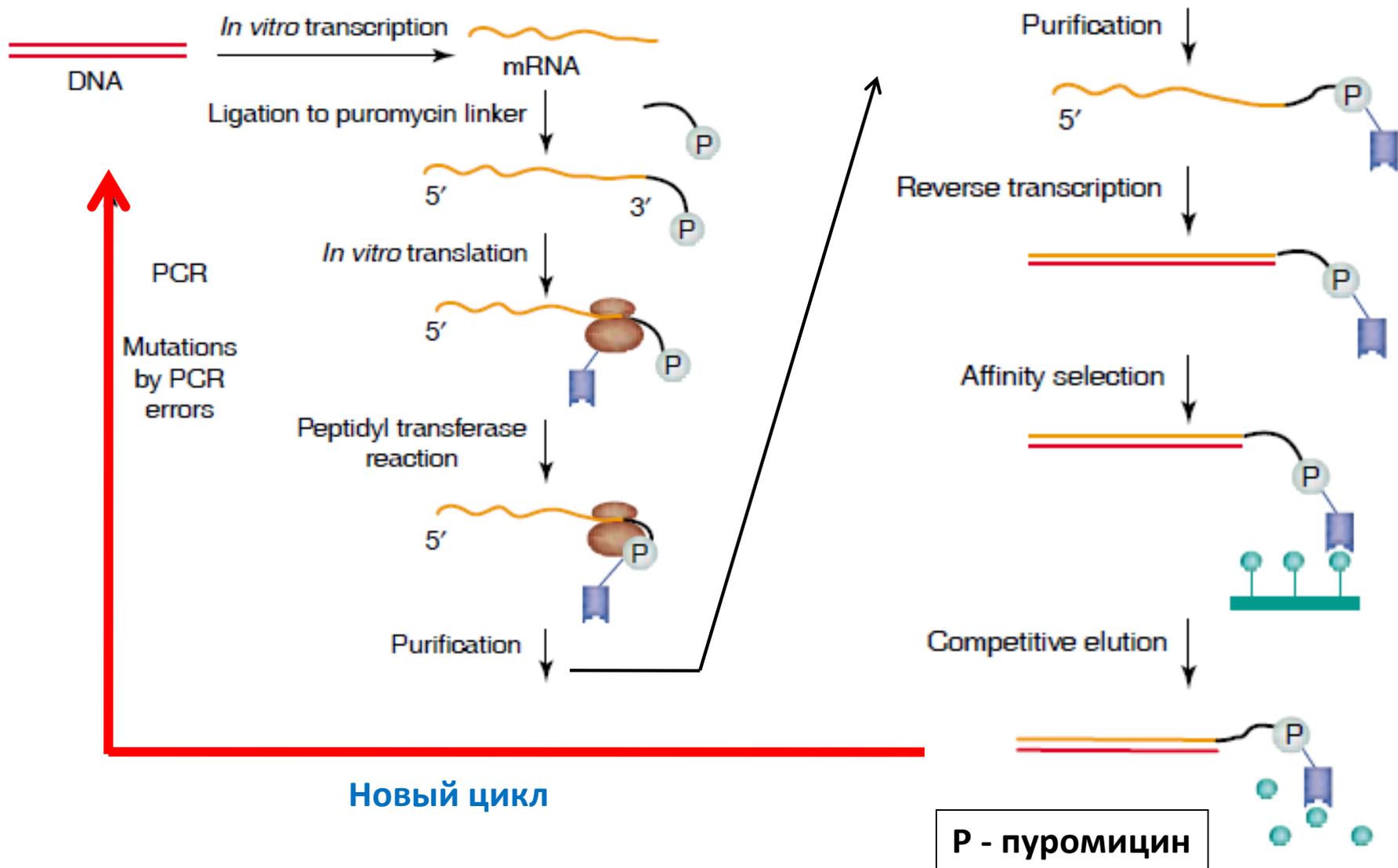
Соединение строящегося полипептида с мРНК



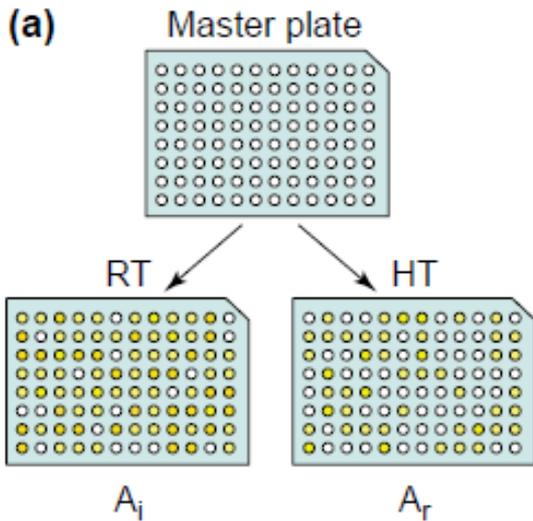
Пурамицин попадает в пептидил-трансферазный центр рибосомы и соединяется с синтезируемым белком



мРНК-дисплей



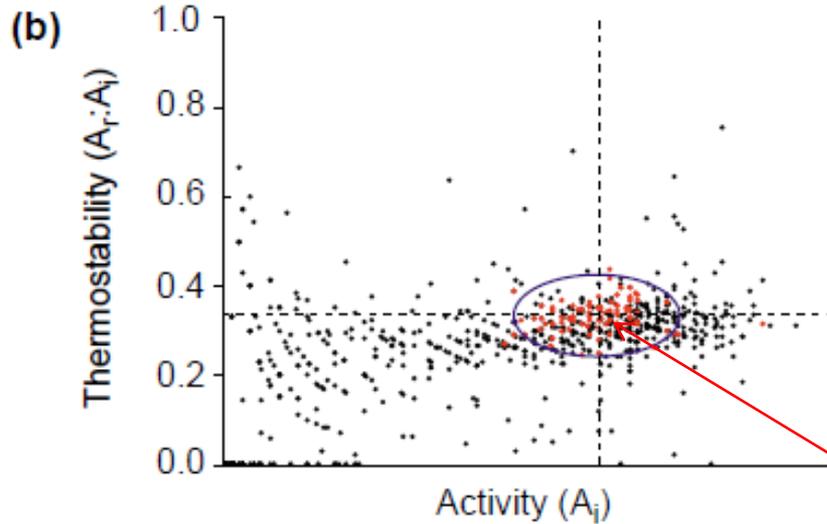
Получение экстремозима (субтилизин S41) методом направленной эволюции



Остаточная активность

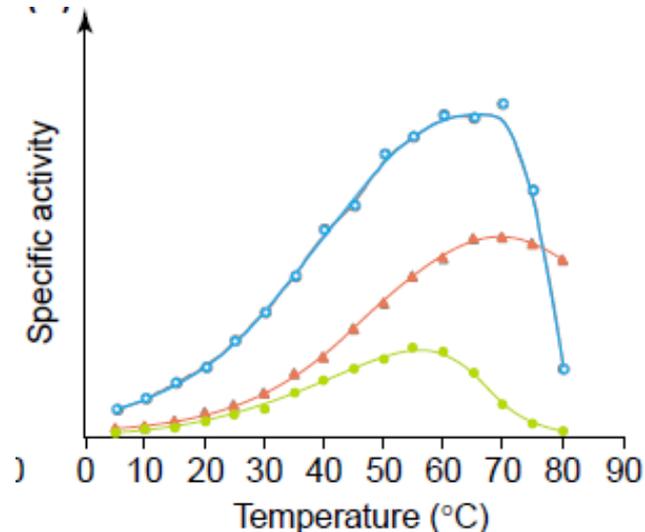
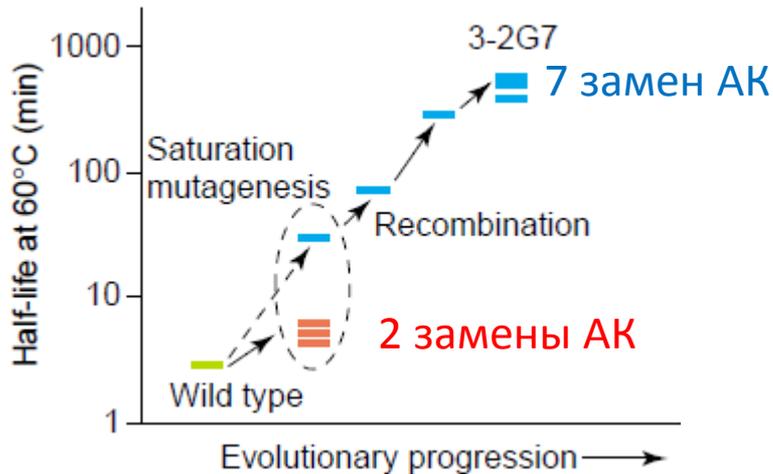
Комнатная т-ра

Высокая т-ра

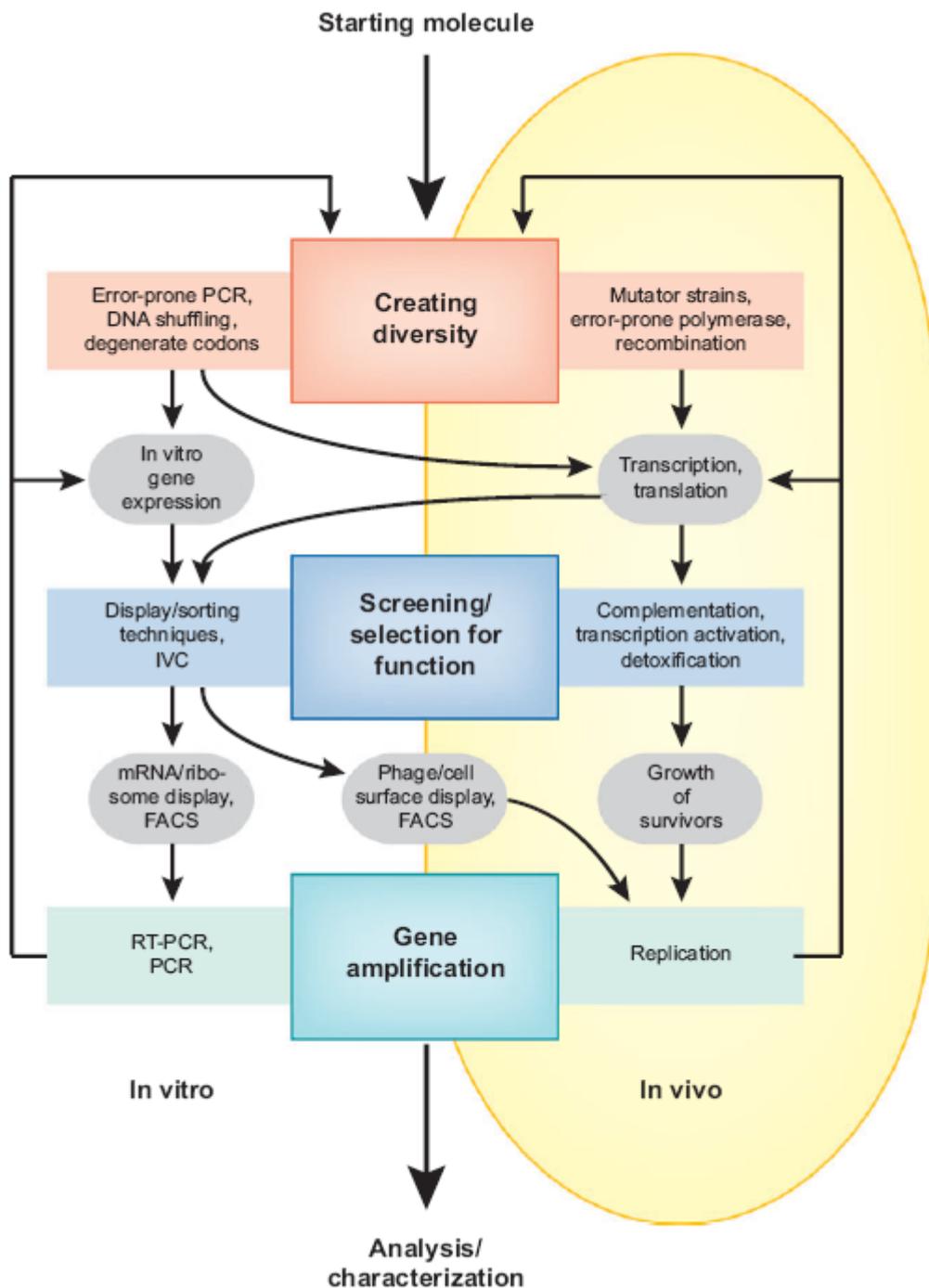


Исходно взят субтилизин антарктической бактерии (психрофил)

Исходные клоны (дикий тип)



A_r - оставшаяся активность
 A_i - начальная активность



Основные процессы, стратегии и методы направленной эволюции белков

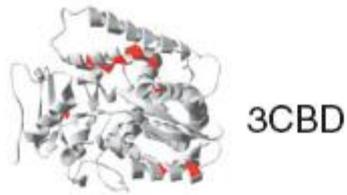
Дарвиновская эволюция в лаборатории

IVC - in vitro compartmentalization

Панорама современных искусственных белков

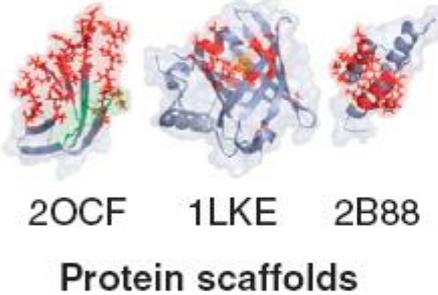
Cyt P450 octane monoxygenase

(b)

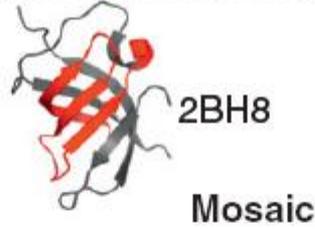


Enzyme directed evolution
**Monobodies, Anticalins
and Affibodies**

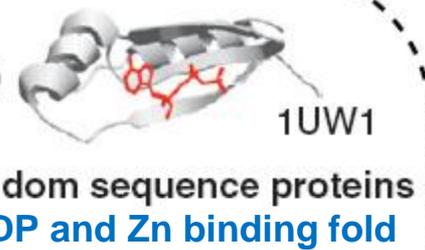
(c)



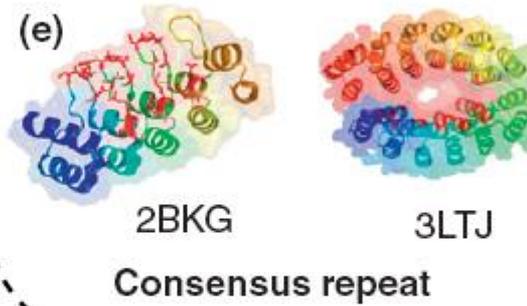
(f)



(h)



(e)



(i)



Origin of sequence change

(a)



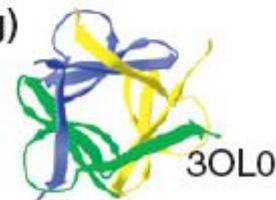
Site directed mutagenesis

(d)



Kemp eliminase

(g)



Symmetric deconstruction

(j)



Fold design

Top7 - non-natural fold.

Selection

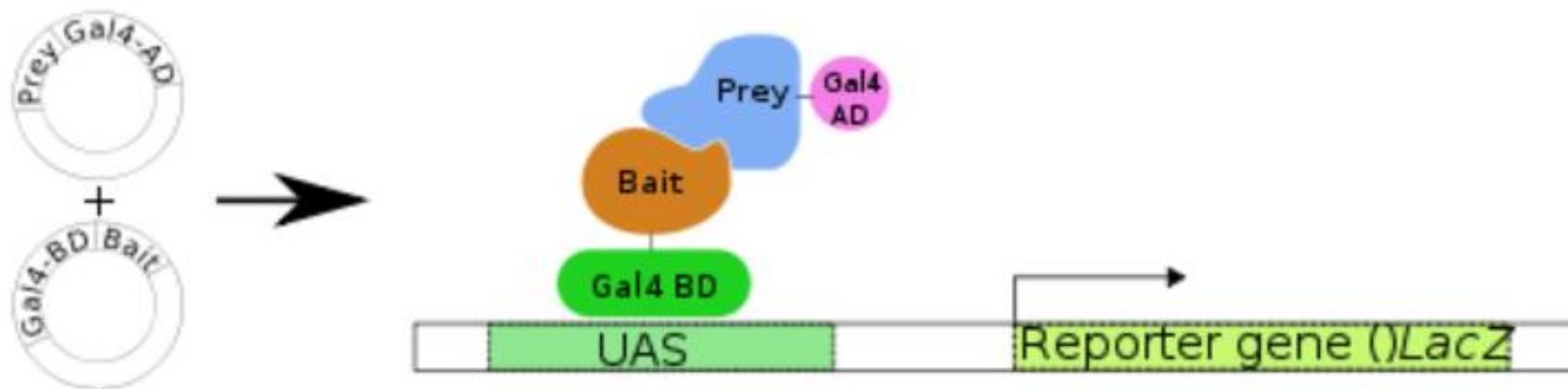
Design

Natural

Synthetic

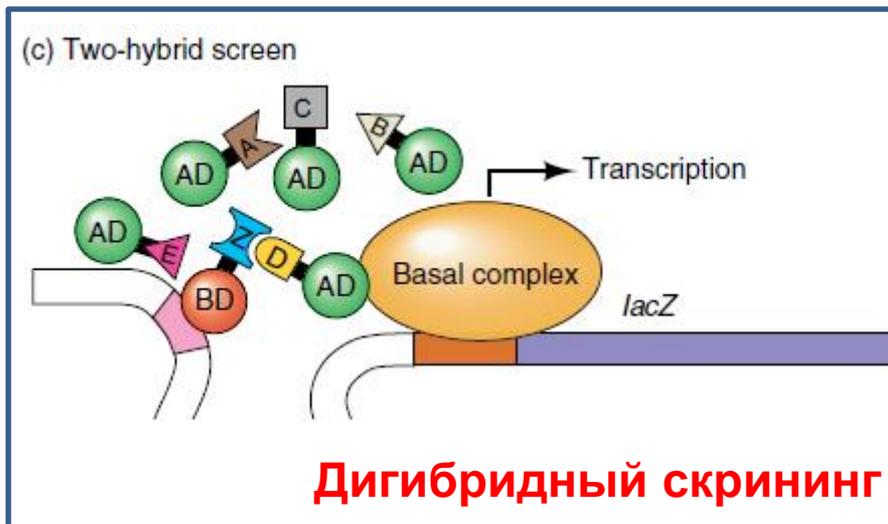
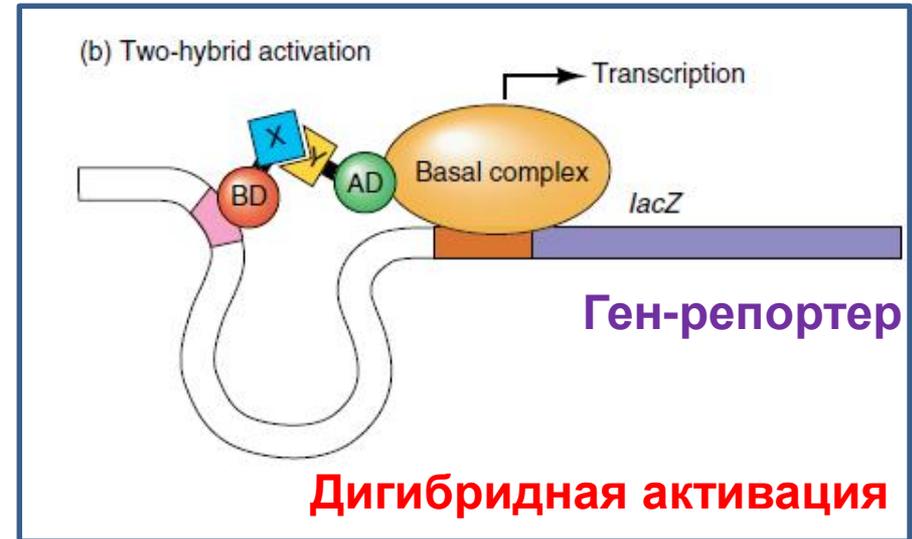
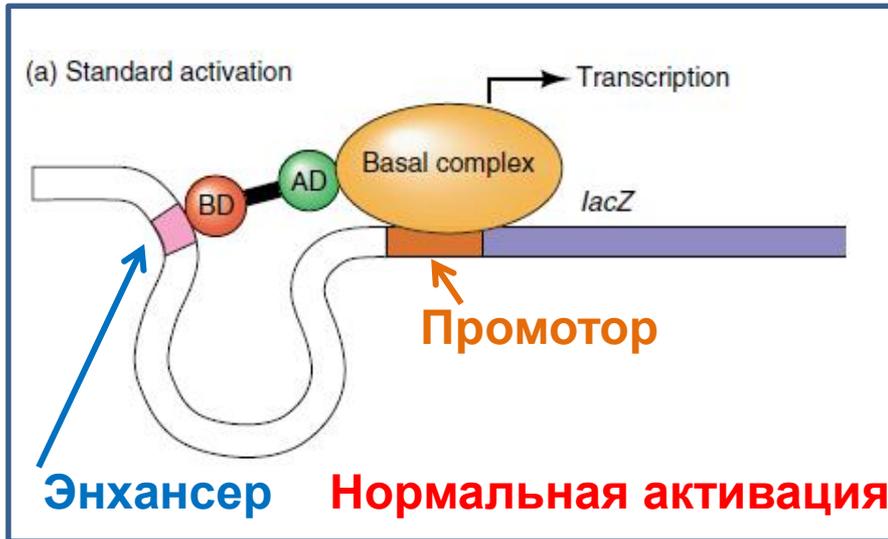
Mutational distance from a natural protein

Исследование белок-белковых взаимодействий в дигибридной системе



D. Two fusion proteins with interacting Bait and Prey

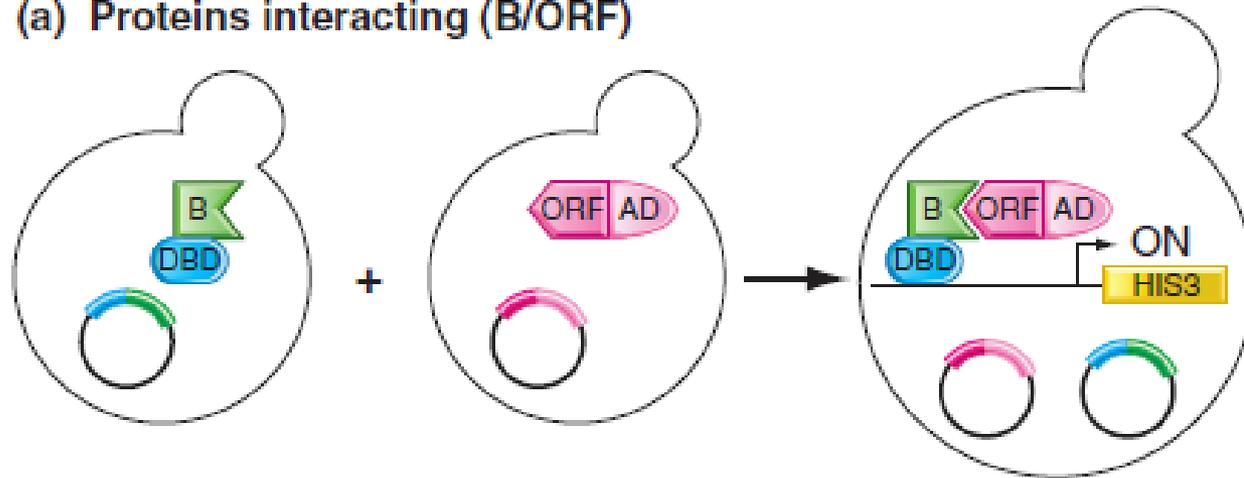
Принцип работы дрожжевой дигибридной системы



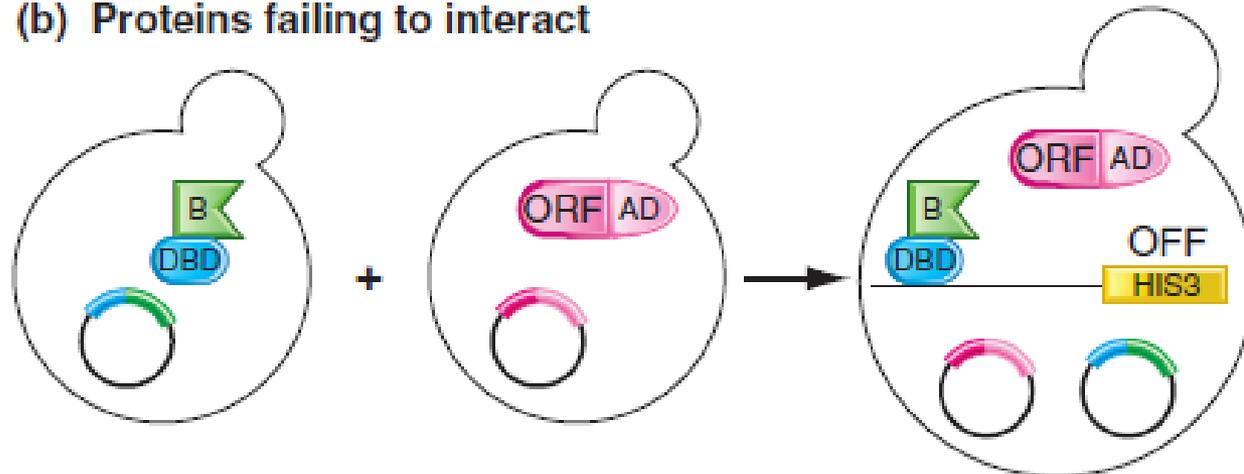
BD – ДНК-связывающий домен
AD – активирующий домен
X – белок-“приманка” (“bait”)
Y – белок-“добыча” (“prey”)
Basal complex – базальный комплекс, содержит РНК-полимеразу II и основные факторы транскрипции

Результат скрещивания клеток дрожжей в дигибридной системе

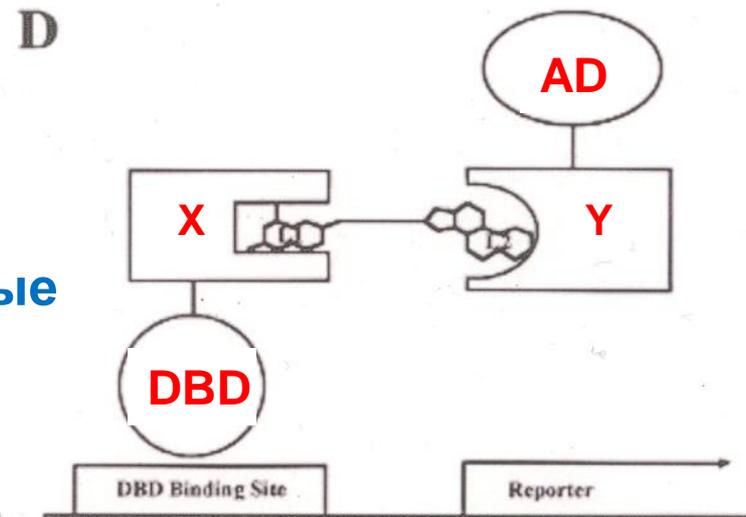
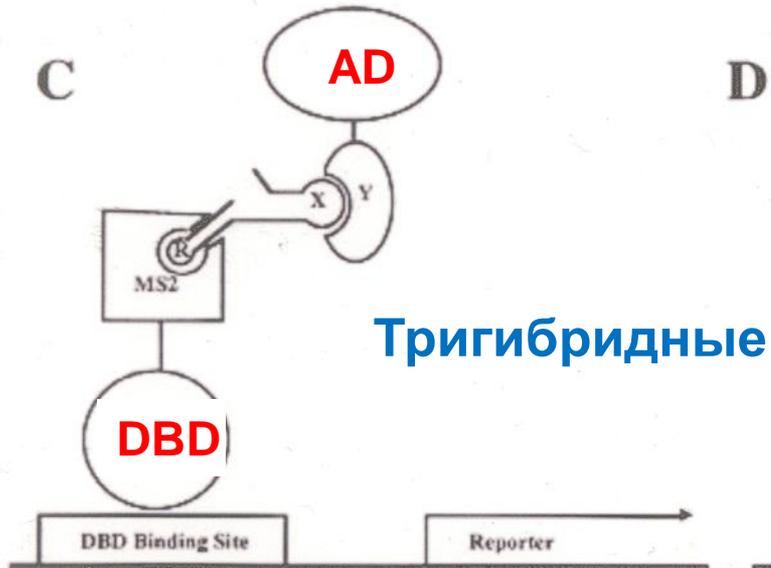
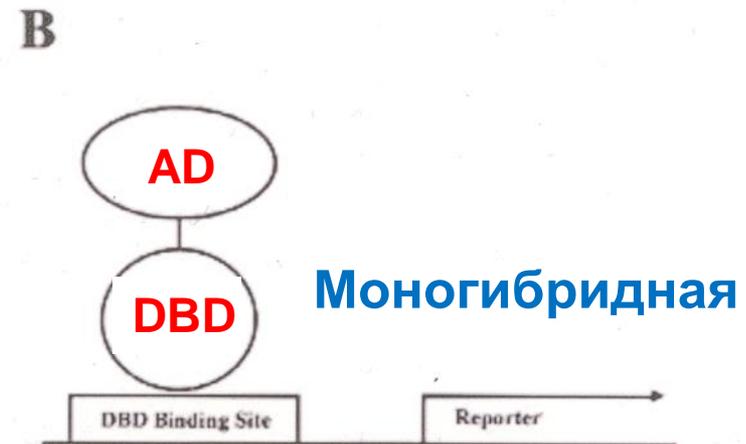
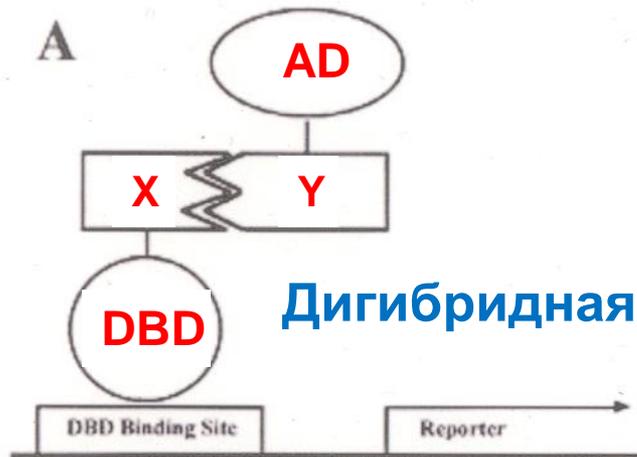
(a) Proteins interacting (B/ORF)



(b) Proteins failing to interact



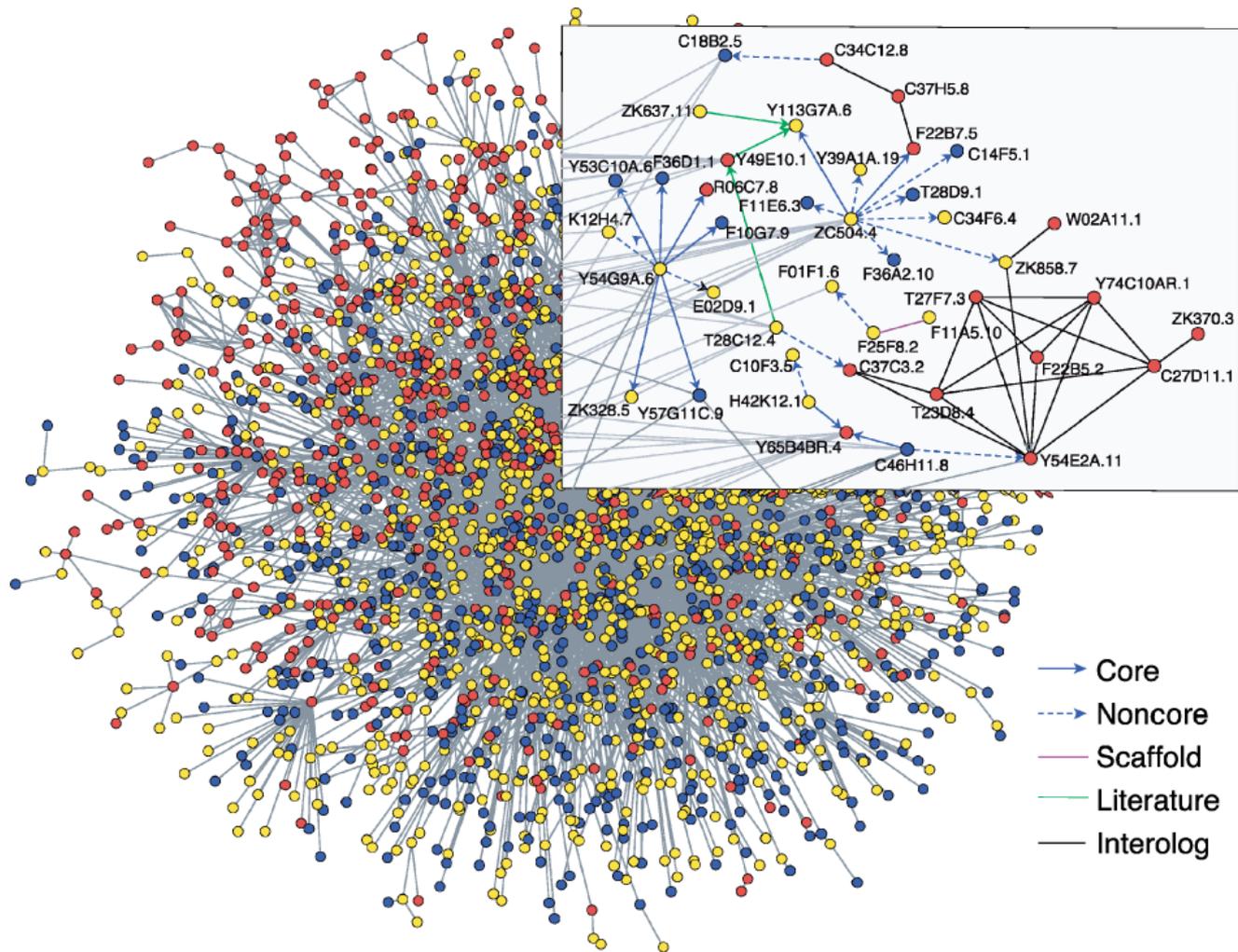
n-Гибридные дрожжевые системы

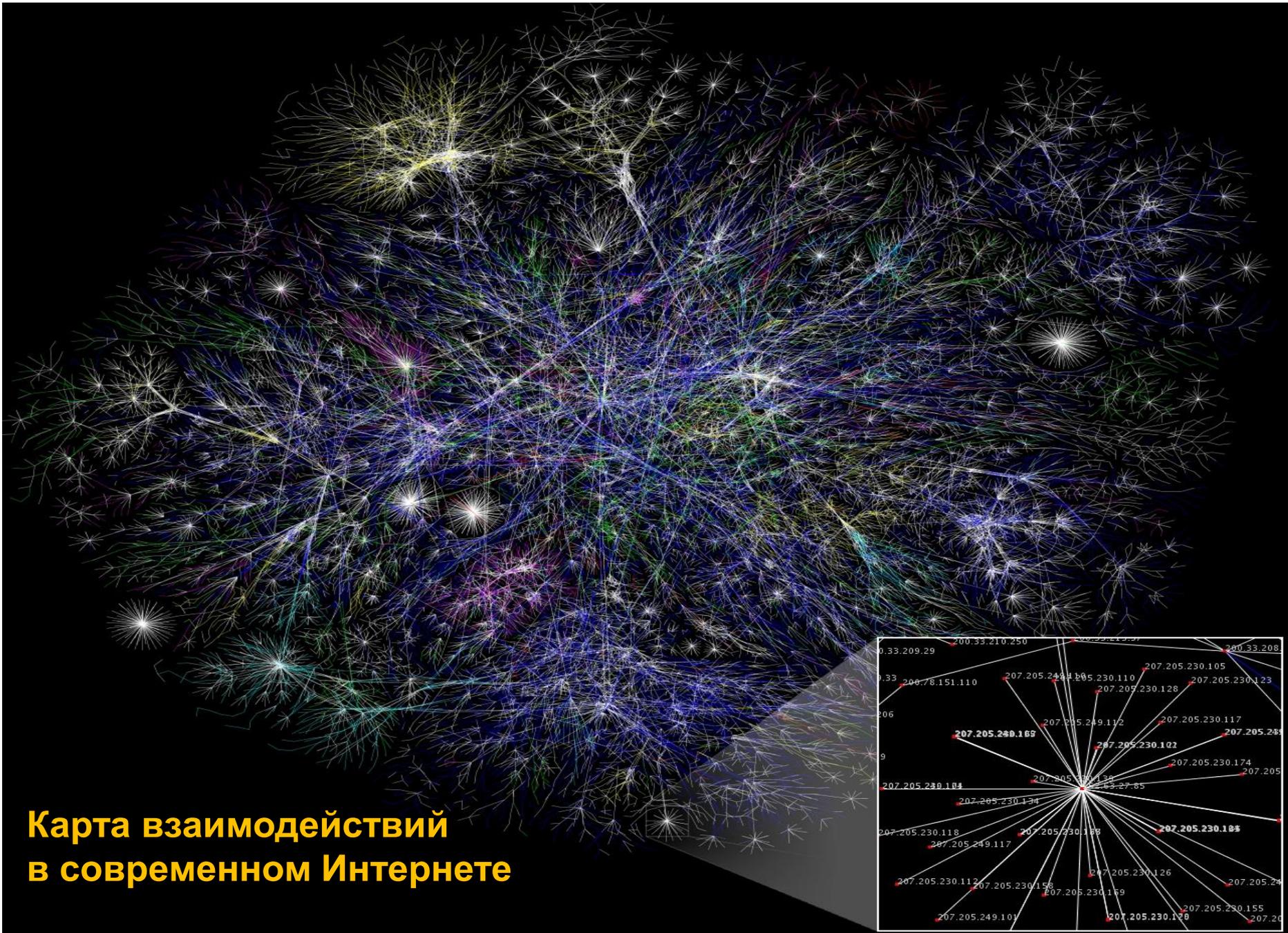


Преимущества n -гибридных систем в исследовании белок-белковых взаимодействий

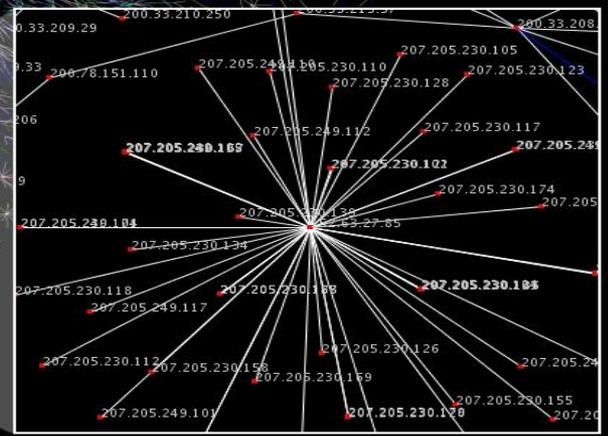
- ❖ Исследования проводятся *in vivo*
- ❖ Не требуется предварительная информация о взаимодействующих белках
- ❖ Легко идентифицировать взаимодействующие белки через плазмиды и базы данных нуклеотидных последовательностей

Карта белок-белковых взаимодействий (интерактом) *C. elegans*





**Карта взаимодействий
в современном Интернете**



Биоинформатика становится интегральной частью белковой инженерии

- ❖ Анализ больших массивов данных о последовательностях белков, полученных новыми методами секвенирования ДНК. Метагеномика.
- ❖ Выравнивание множественных последовательностей позволяет выявлять ключевые аминокислотные остатки у белков одного класса
- ❖ Использование баз данных о пространственной структуре известных белков (RCSB Protein Data Bank, <http://www.pdb.org> – 77 000 структур)

**В направленной эволюции должно быть
и зерно рационального дизайна**



Интеллект исследователя незаменим