

Proteinski inženiring

Spreminjanje strukture proteinov, tako da dobimo različice s spremenjenimi ali novimi lastnostmi ali načrtovanje *de novo* proteinov.

V osnovi lahko metode razdelimo na:

- racionalen dizajn proteinov
- usmerjeno evolucijo proteinov:

Skupina metod, ki omogoča oponašanje naravnih evlucijskih procesov v laboratoriju.



Selekcija: in vitro testiranje, predstavitev na fagih, predstavitev na ribosomih,

Usmerjena evolucija

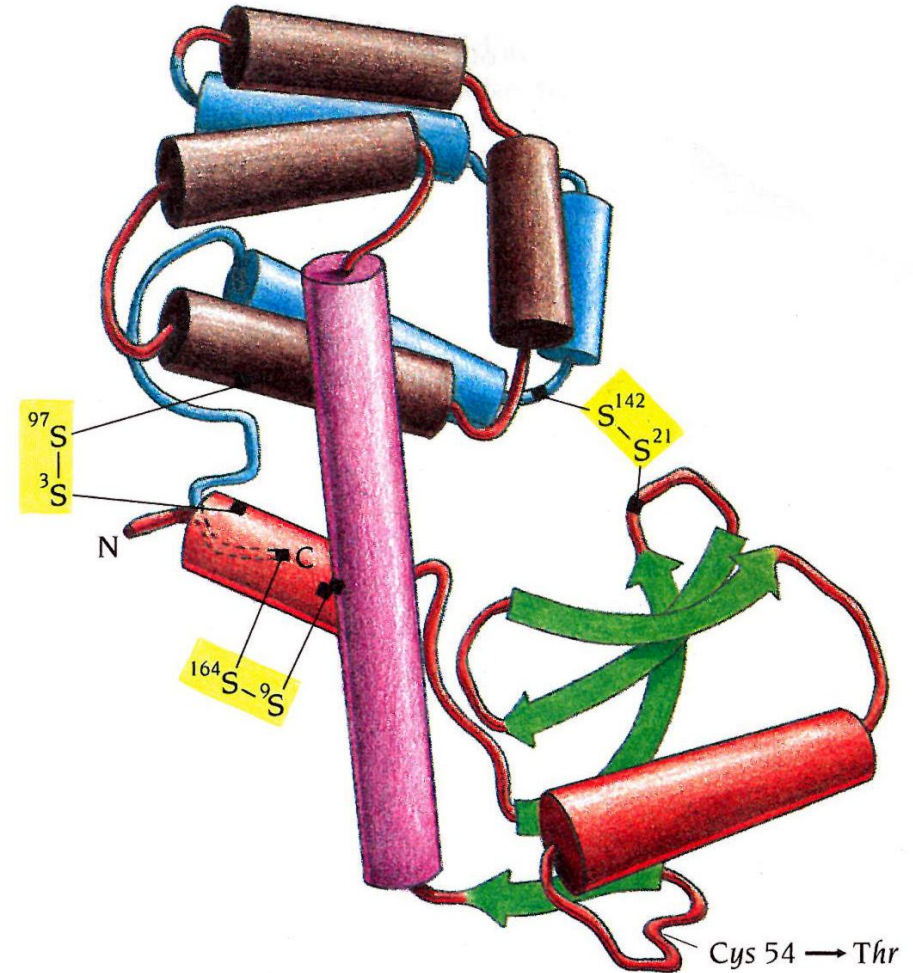
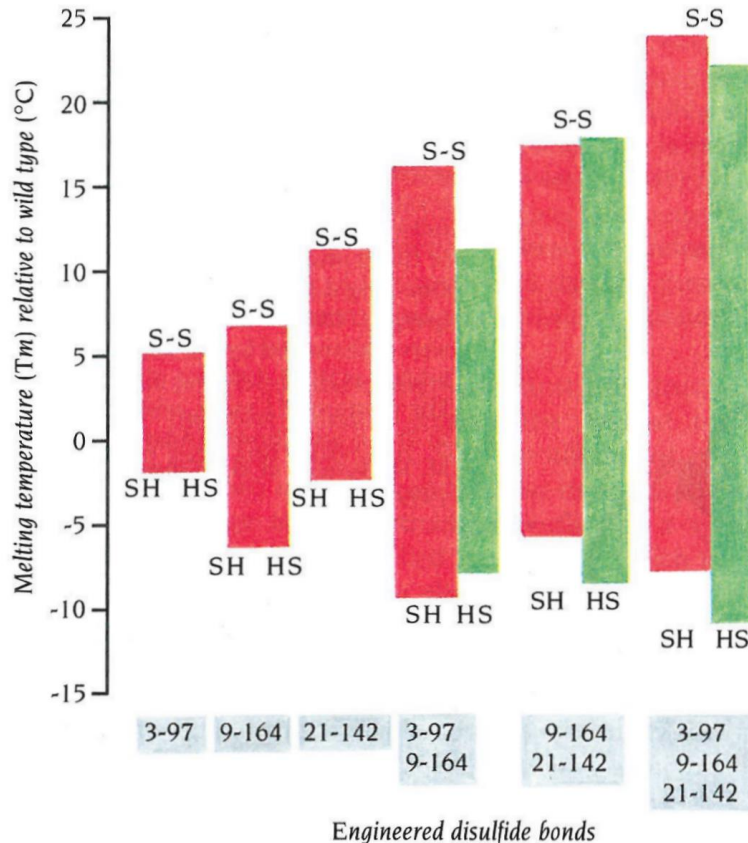
Metode usmerjene evolucije:

- **naključna mutageneza** → knjižnica naključnih mutant
- **rekombinacija** → himere zaporedij iz več obstoječih proteinov
- **usmerjena naključna mutageneza**
 - mestno usmerjena saturacijska mutageneza → knjižnica vseh mutant na določeni poziciji
 - iterativna saturacijska mutageneza
 - kasetna mutageneza → mutiranje več zaporednih mest
 - CASTing → mutiranje dveh zaporednih mest
 - B-FIT → mutiranje fleksibilnih mest (zvižanje termostabilnosti)
 - uvedba nenaravnih aminokislin
- **racionalen dizajn**
 - uvedba vezavnih mest za kovinske ione, organsko-kovinske komplekse,...
 - uvedba aktivnih mest

Stabilizacija proteinov

Uvedba disulfidov stabilizira protein.

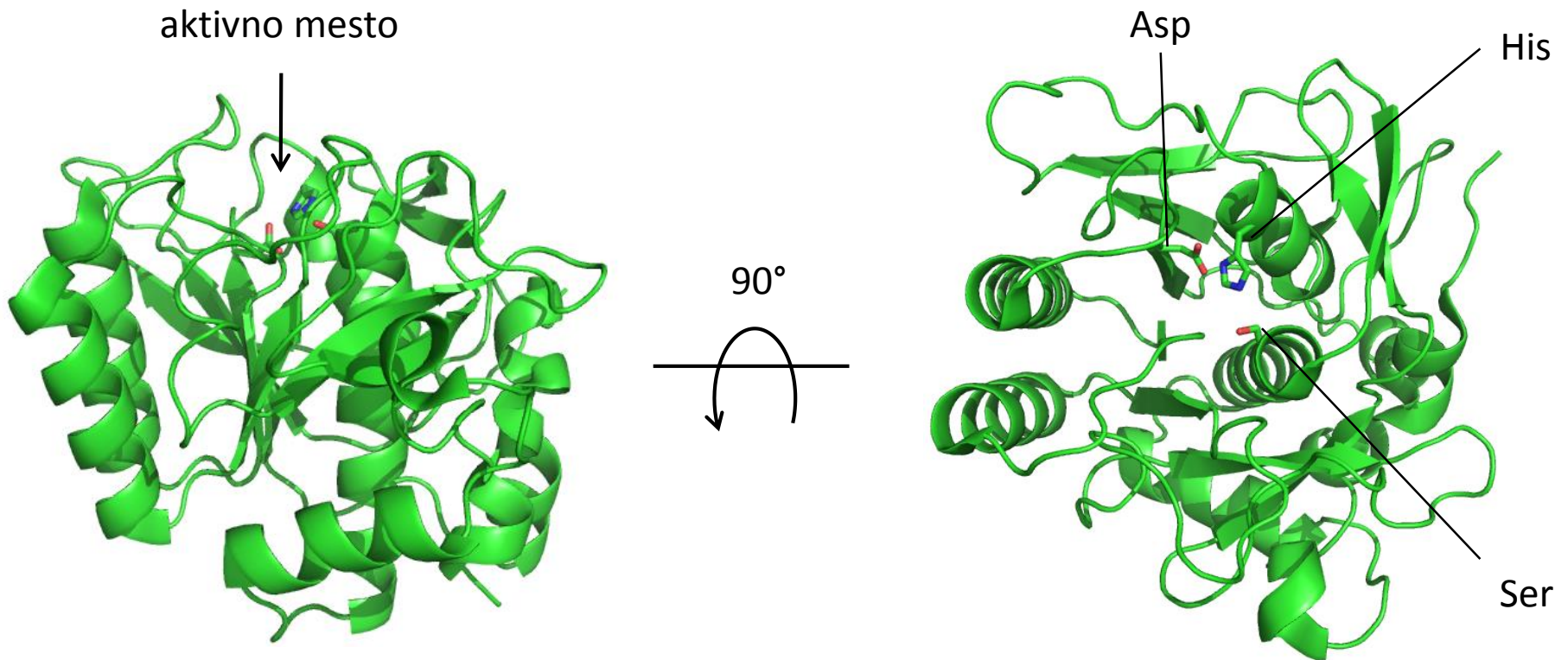
Primer: T4 lizocim je sestavljen iz dveh domen. Divji tip vsebuje Cys⁹⁷ in Cys⁵⁴. Protein so dodatno stabilizirali z uvedbo treh disulfidnih mostičkov med obema domenama, tako da so uvedli Cys ostanke na mestih, kjer so si ostanki dovolj blizu.



Zamenjali so tudi Cys⁵⁴.

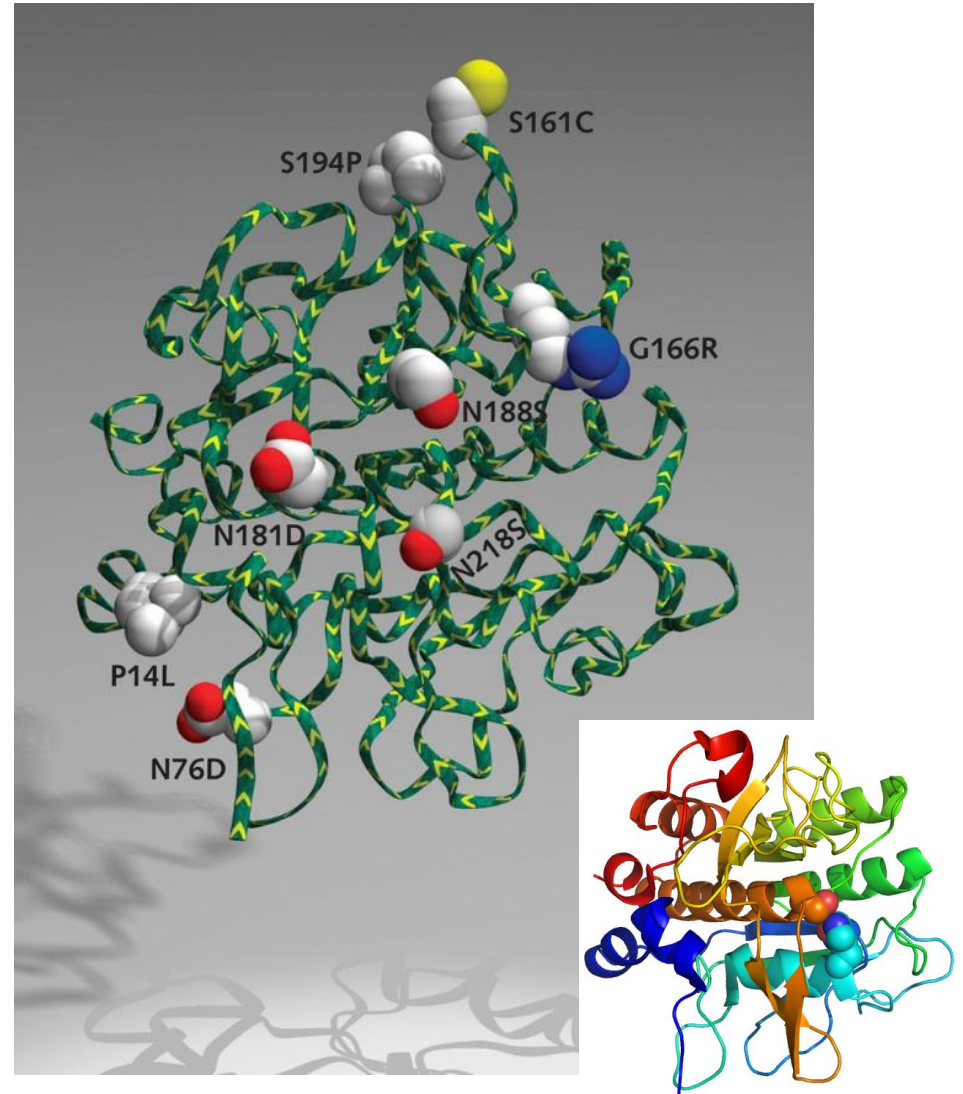
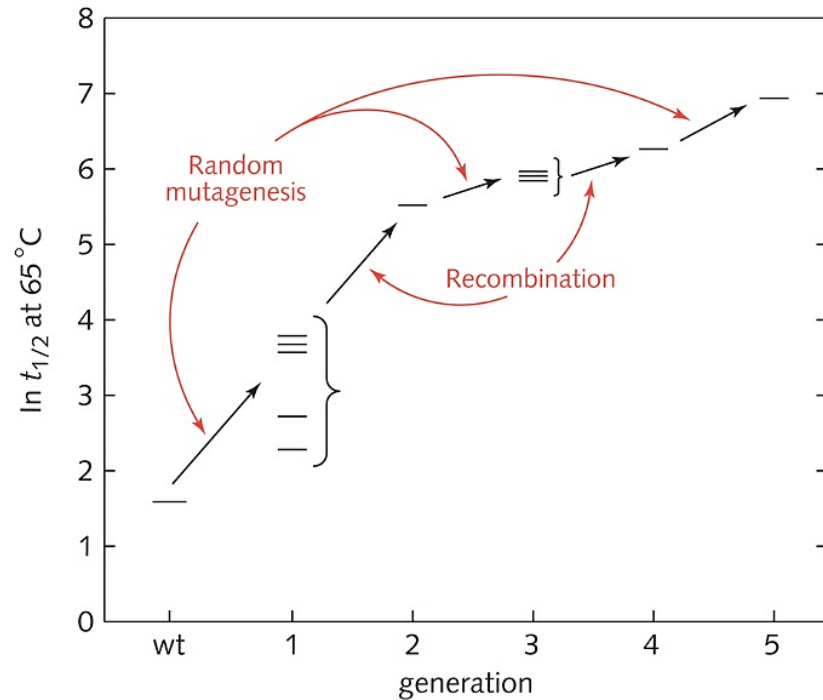
Stabilizacija proteinov

Subtilizin je bakterijska serinska proteaza, zanimiva tako z industrijskega kot znanstvenega vidika (nima S-S vezi, neglikoziliran).



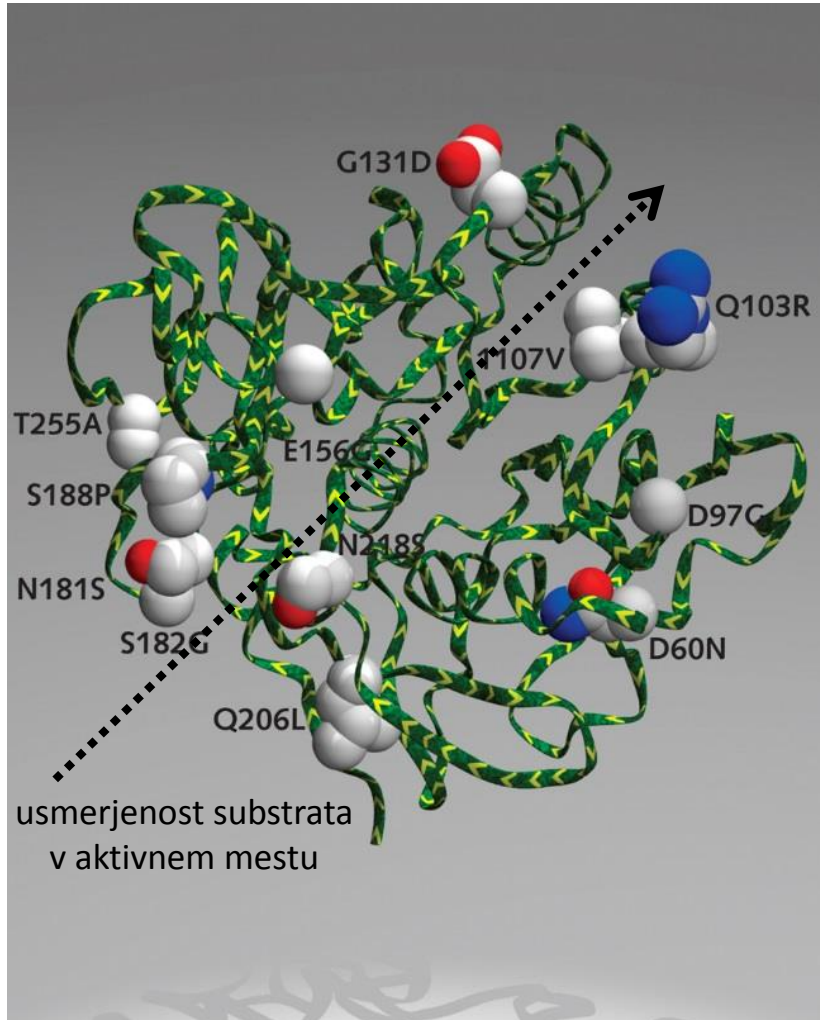
Stabilizacija proteinov

Optimizacija termične stabilnosti subtilizina z usmerjeno evolucijo: optimalno stabilna mutanta je vsebovala 8 točkovnih mutacij glede na divji tip. Mutacije niso omejene na aktivno mesto.



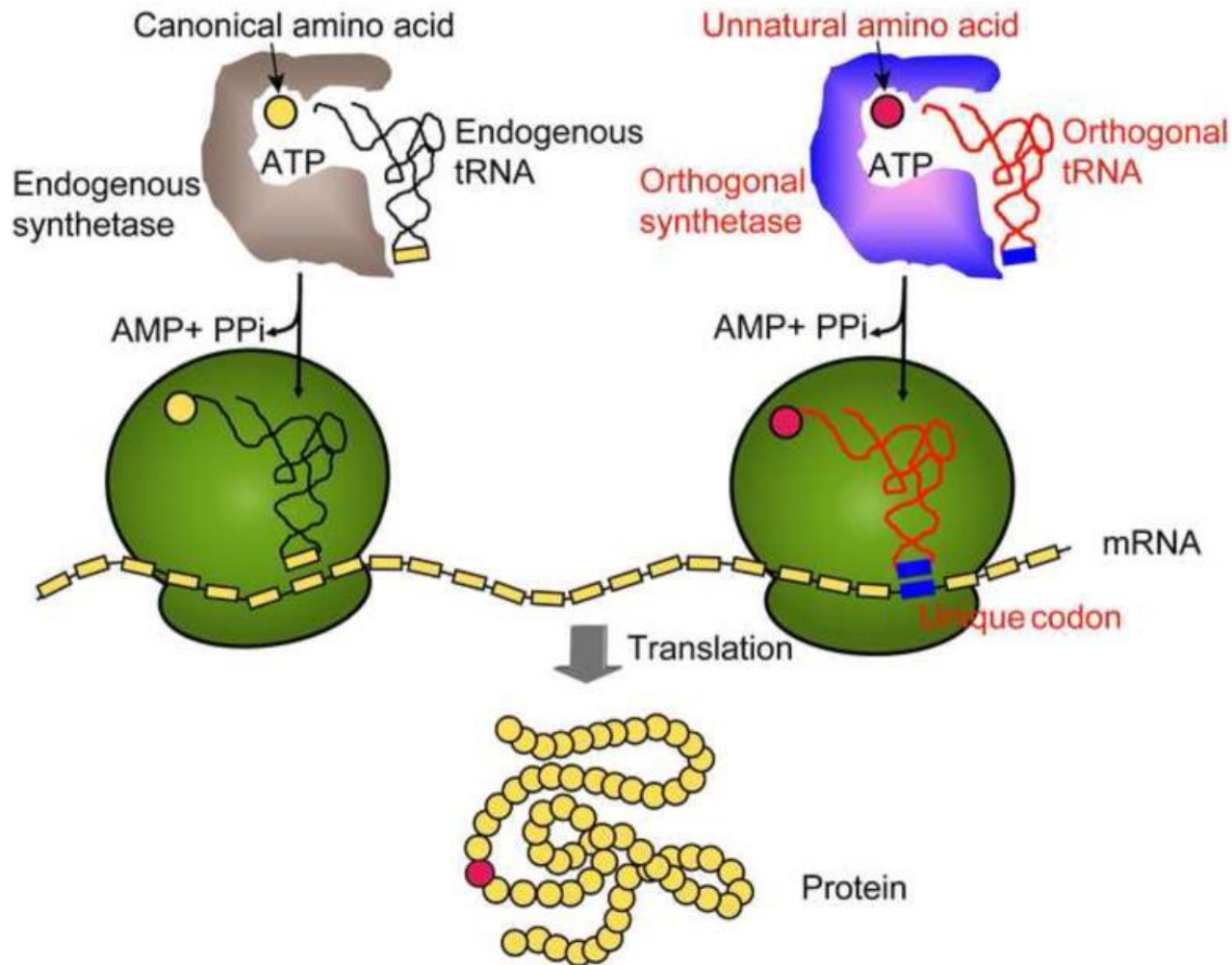
Stabilizacija proteinov

Subtilizin so v industrijske namene optimizirali tudi tako, da je aktiven v 60% DMF. Protein z 12 točkovnimi mutacijami je imel 471-krat boljšo aktivnost kot divji tip. Mutacije so skoncentrirane okoli aktivnega mesta.



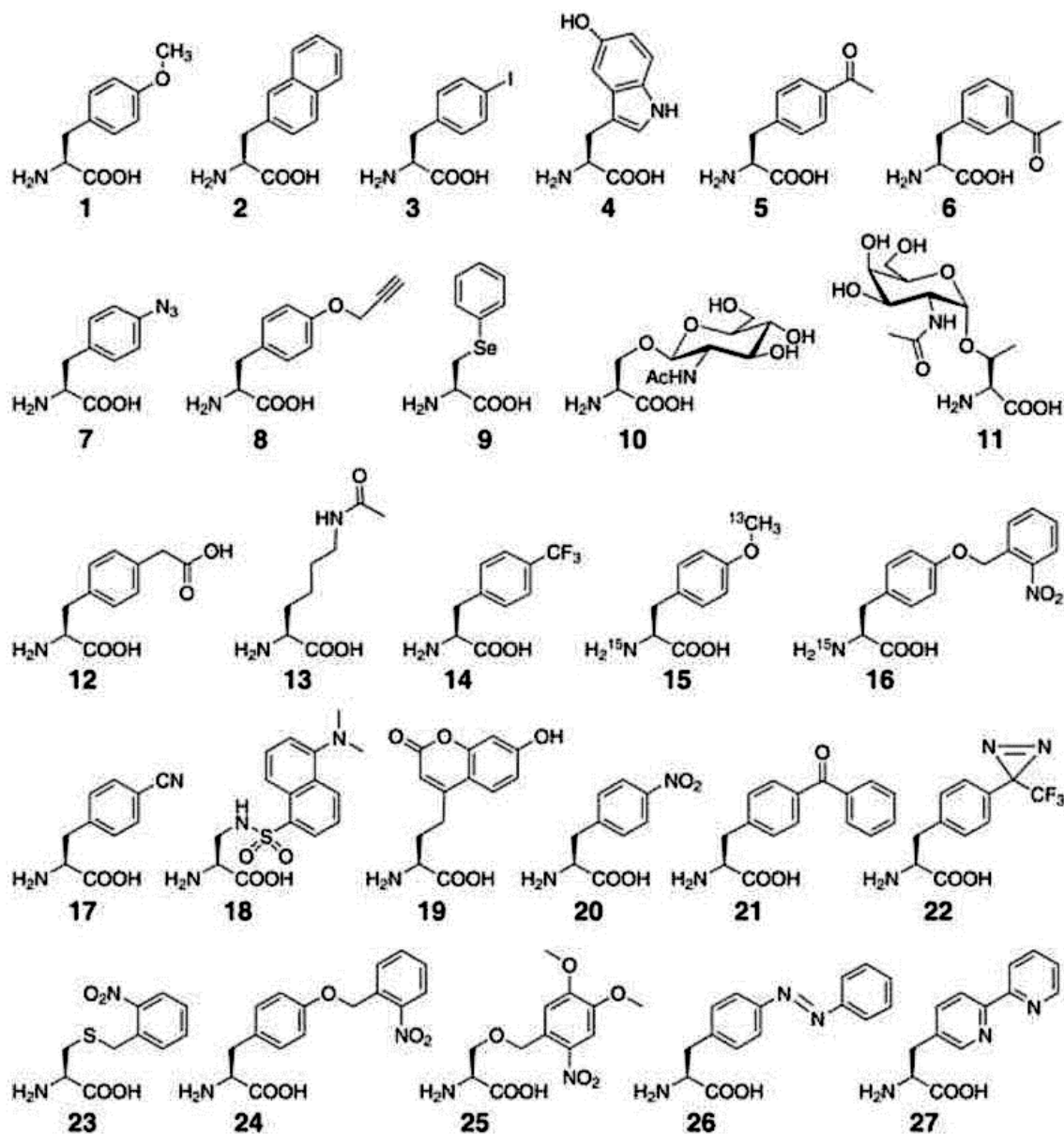
Nenaravne aminokisliline

Eden izmed načinov spreminjanja lastnosti proteinov je tudi uvedba nenaravnih aminokislilin. To dosežemo z reinterpretacijo genetskega koda – uvedbo novih tRNA, ki bodo prepoznale specifičen kodon (ponavadi enega izmed stop kodonov) in ustreznih tRNA-sintetaz.



Nenaravne aminokisline

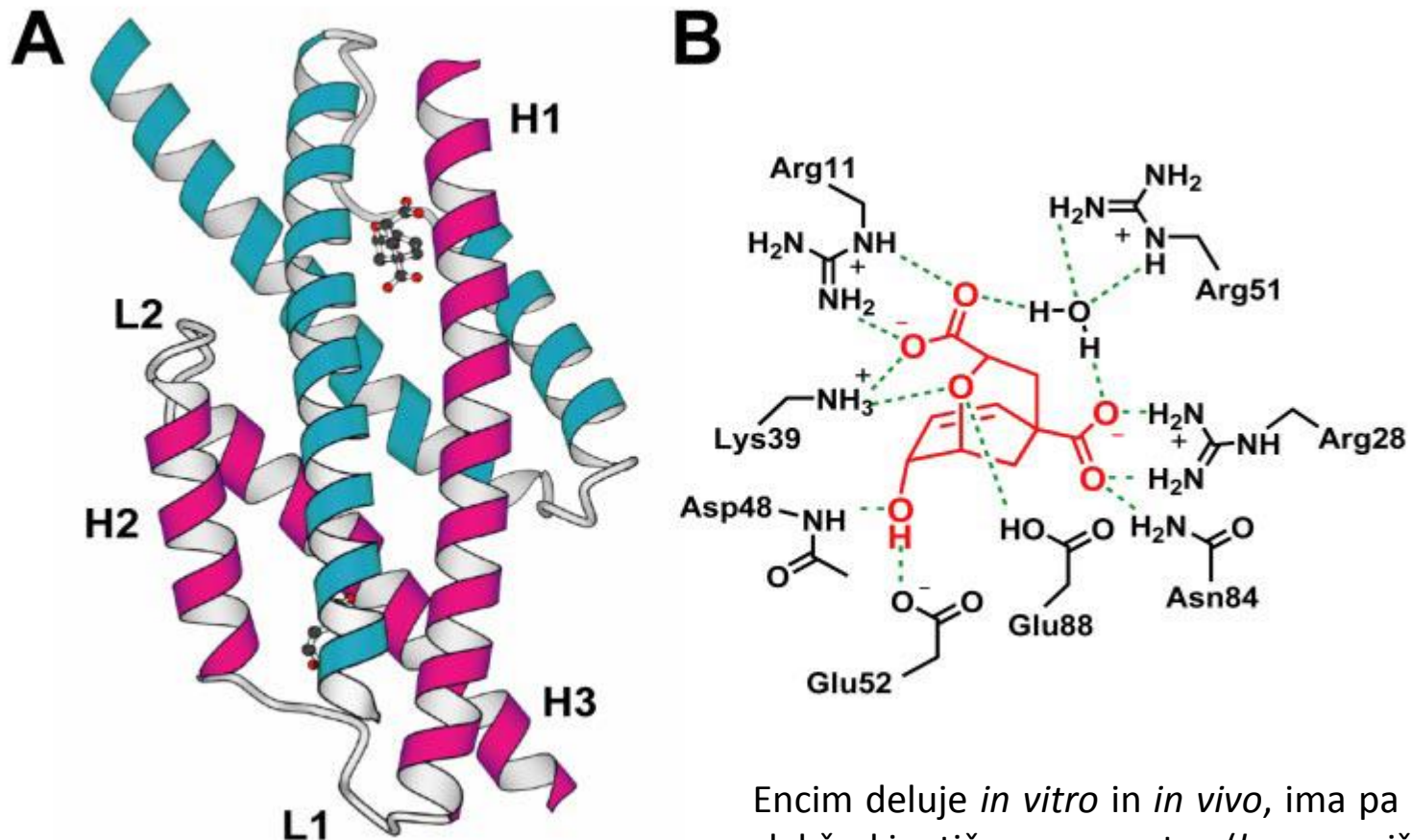
Primeri nenaravnih aminokislin, ki so bile uspešno vgrajene v proteine.



Kontrakcija genetskega koda

Ustvarimo lahko tudi proteine, ki so zgrajeni iz manj kot 20 aminokislin.

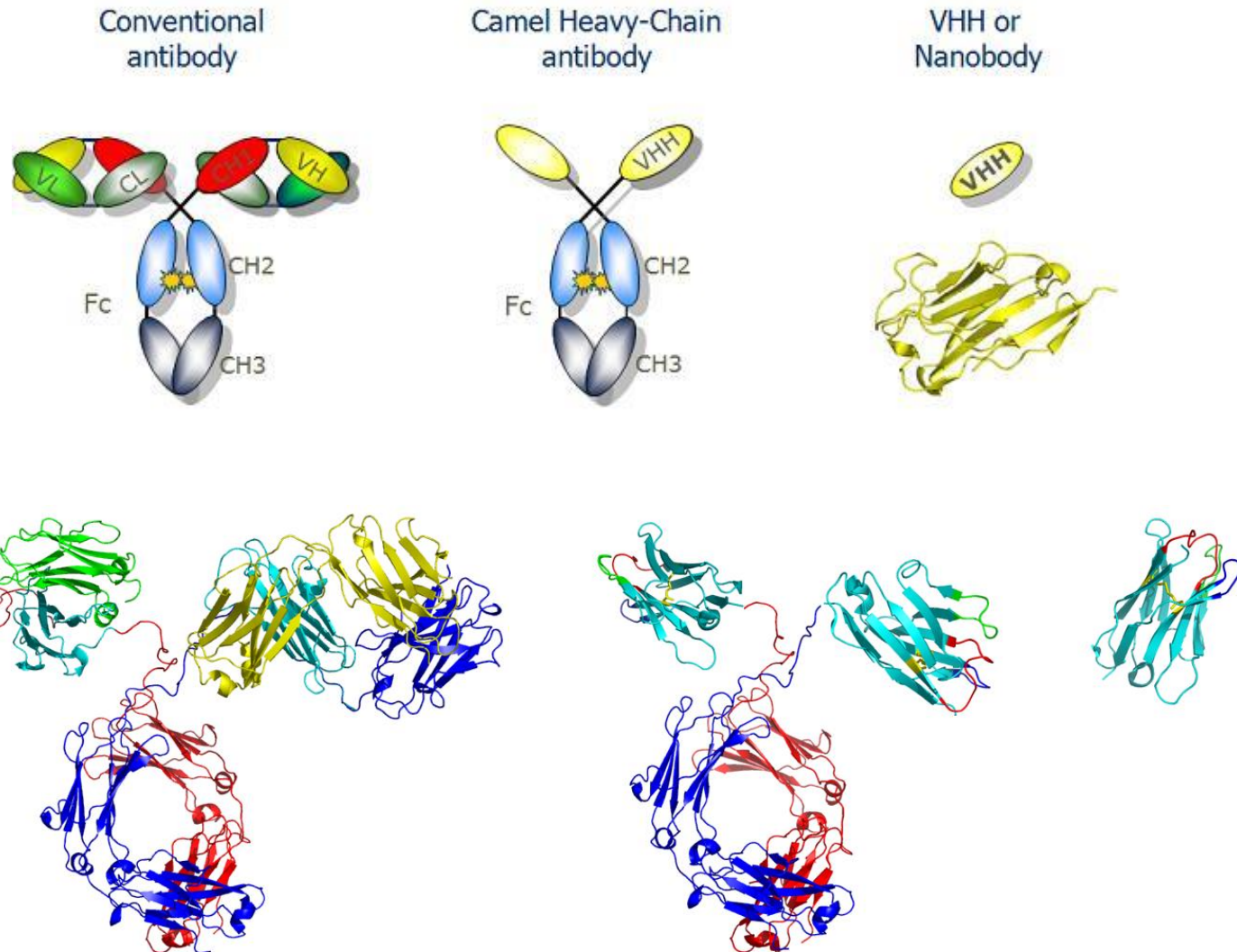
Primer: korizmat mutaza zgrajena iz 9 različnih aminokislin.



Encim deluje *in vitro* in *in vivo*, ima pa nekoliko slabše kinetične parametre (k_{cat} zmanjšan s 3.1 na 0.9 s^{-1} , K_m povečan z $20 \mu\text{M}$ na $830 \mu\text{M}$)

Minimalizacija strukture

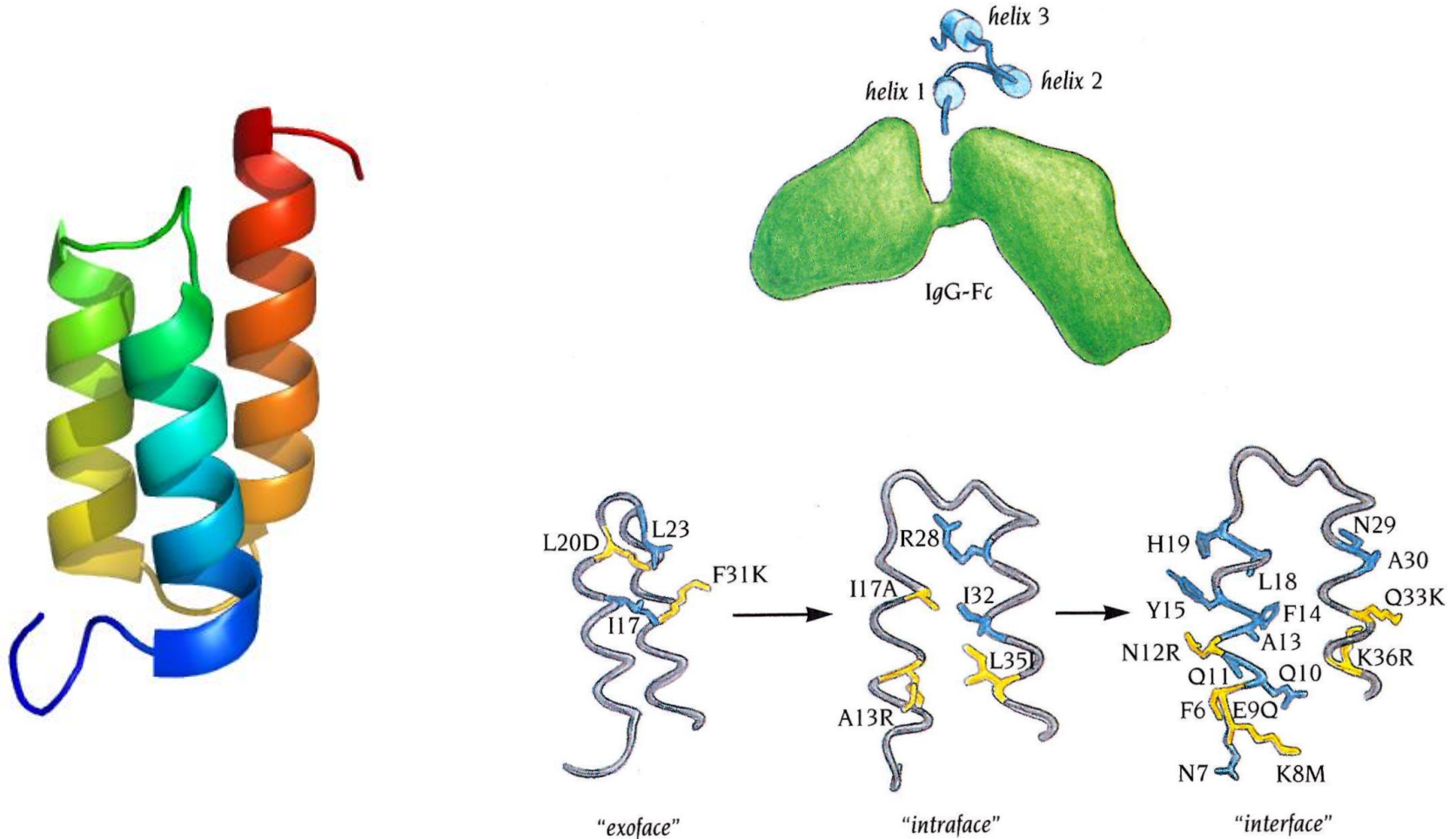
Popularen način optimizacije proteinov je minimizacija strukture brez izgube funkcije. Tipičen primer take optimizacije so **nanotelesa** kot alternativa klasičnim protitelesom.



Minimalizacija strukture

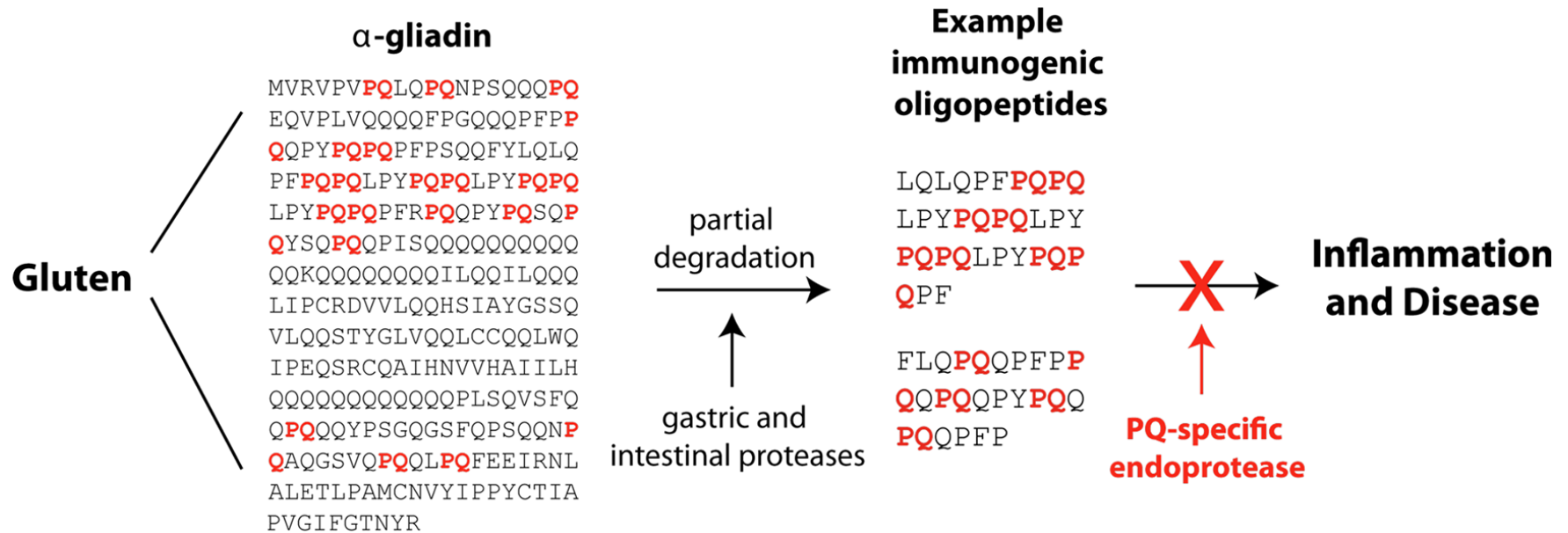
Popularen način optimizacije proteinov je minimizacija strukture brez izgube funkcije. Tipičen primer take optimizacije so **nanotelesa** kot alternativa klasičnim protitelesom.

Primer: minimizacija domene Z stafilokoknega proteina A, ki veže Fc regijo IgG, s predstavitvijo na fagu.



Sprememba funkcije encima

Z računalniškim dizajniranjem je bil razvit encim z aktivnostjo α -gliadin peptidaze kot potencialen encimski terapevtik za zdravljenje celiakije.



Cilj: razviti encim, ki specifično cepi za motivom -P-Q-↓- in deluje v kislem okolju (želodec).

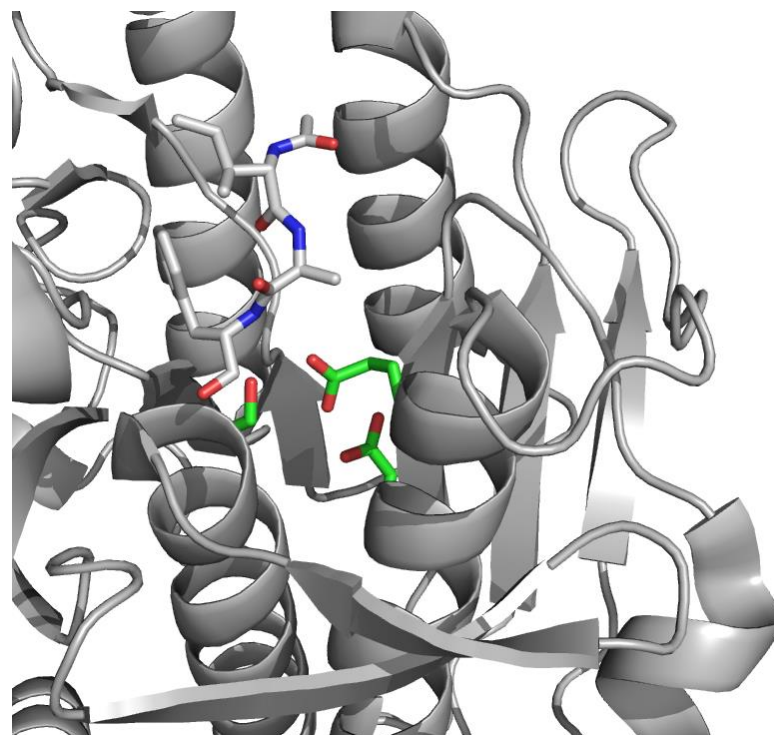
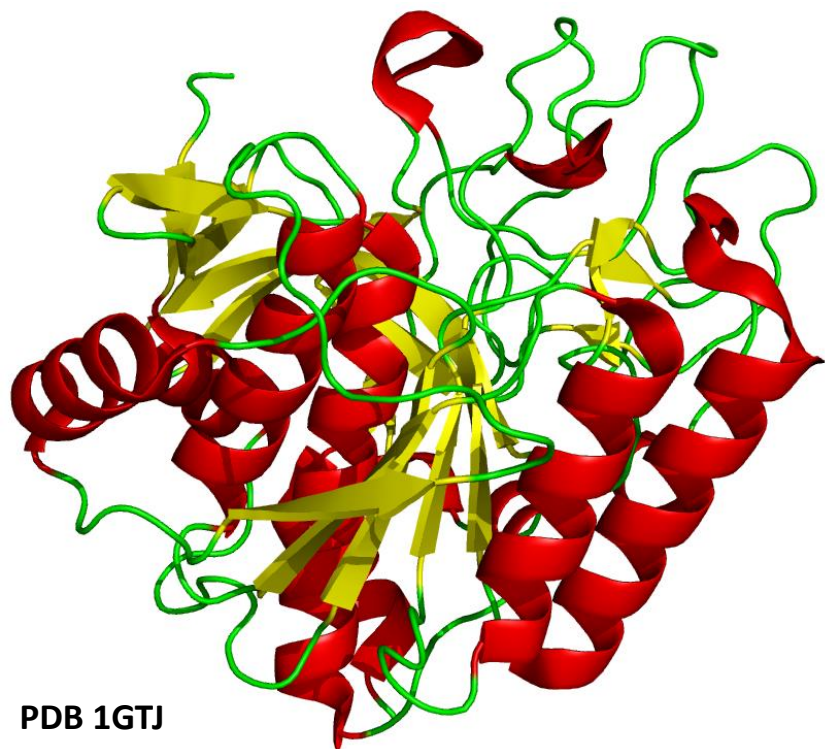
α -gliadin peptidaza

Iskanje naravnega izhodnega encima po bazi znanih peptidaz *MEROPS* s kriteriji:

- naravna endopeptidaza
- stabilna in aktivna v kislem okolju
- specifičnost za dipeptidni motiv podoben -P-Q-↓-
- možnost proizvodnje v topni obliki v *E. coli*
- Znana kristalna struktura, po možnosti v kompleksu s substratom

α -gliadin peptidaza

Izhodni encim: kumamolisin iz *Alicyclobacillus sendaiensis*.



serinska peptidaza s katalitično diado Ser-Glu-Asp, optimalno aktivna pri pH 2 - 4

α -gliadin peptidaza

Kumamolizin v kompleksu z
dipeptidom PRxx
(*model*)



zamenjava peptida za PQLP



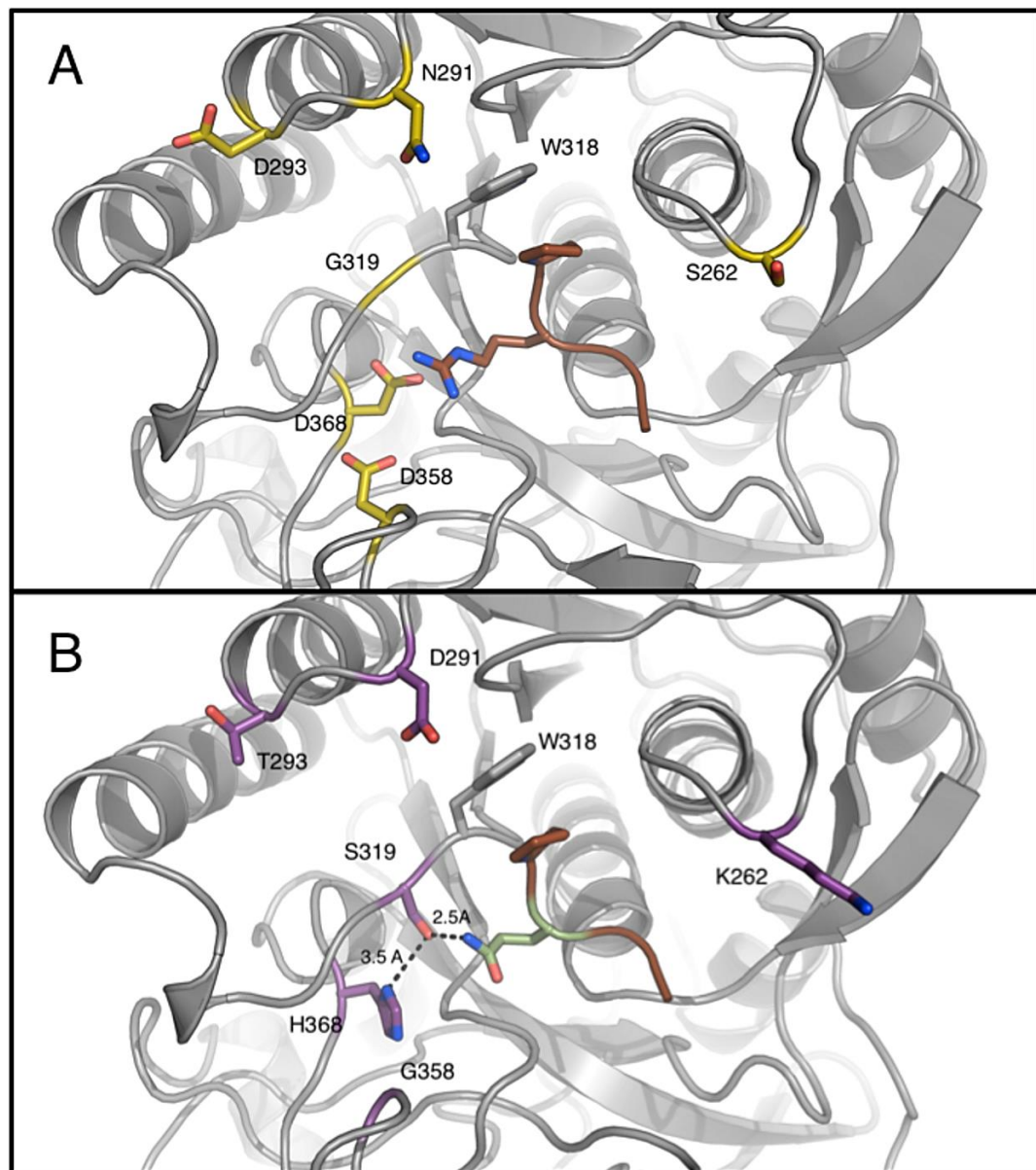
in silico mutageneza



testiranje 261 mutant (1 do 7 mutacij)



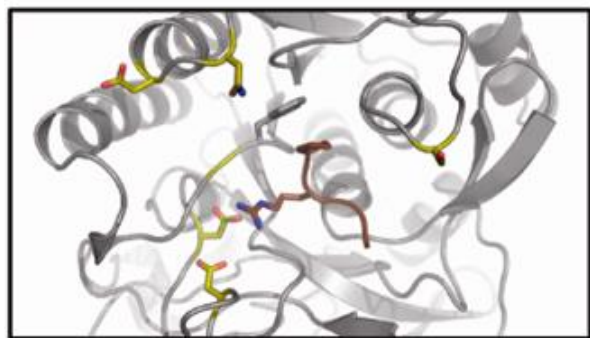
Najboljša mutanta KumaMAX v
kompleksu z dipeptidom PQLP
(*model*)



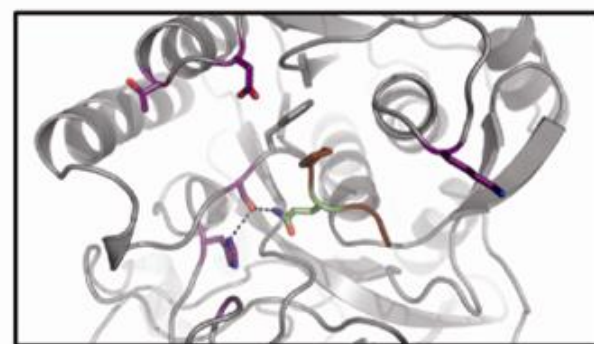
α -gliadin peptidaza

Aktivnost KumaMAX:

Native Enzyme



Engineered Enzyme



..xxPRxx.. $k_{cat}/K_M=132 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$



Native Motif



..xxPRxx.. no activity

..xxPQxx.. $k_{cat}/K_M=5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

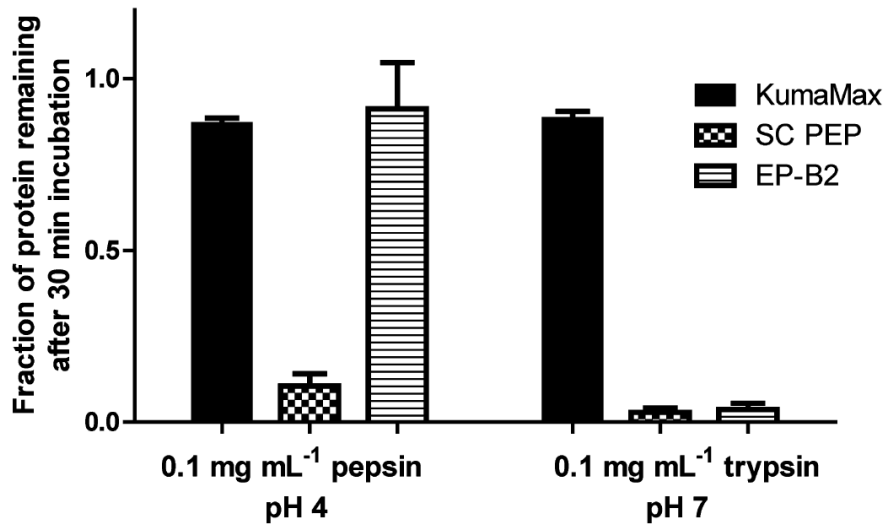


α -gliadin Motif

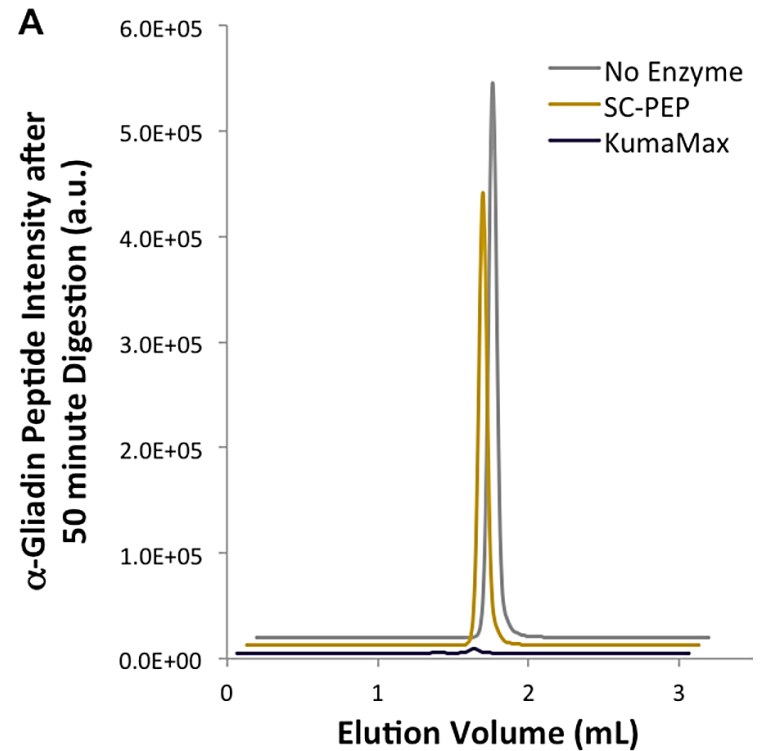


..xxPQxx.. $k_{cat}/K_M=569 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

α -gliadin peptidaza



SC PEP ... protil endopeptidaza
EP-B2 ... za glutamin specifična endopeptidaza



De novo proteini

Eden prvih primerov ab initio dizajna je bilo načrtovanje motiva cinkovega prsta, ki je stabilen brez vezave cinkovega iona (FSD-1). Definirali so tri tipe pozicij: jedro, površina, meja.

V jedru so lahko: A, V, L, I, F, Y, W

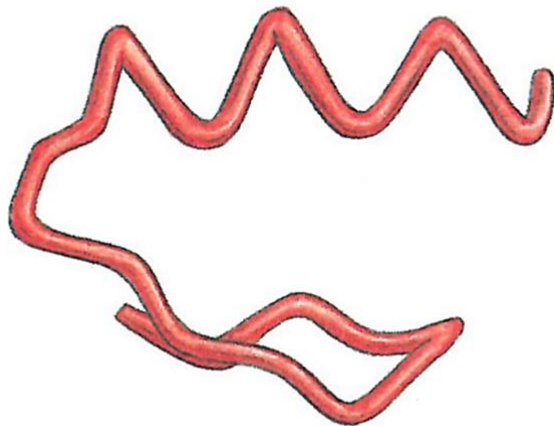
Na površini so lahko: A, S, T, H, D, E, N, Q, K, R

Na meji so lahko oboji.

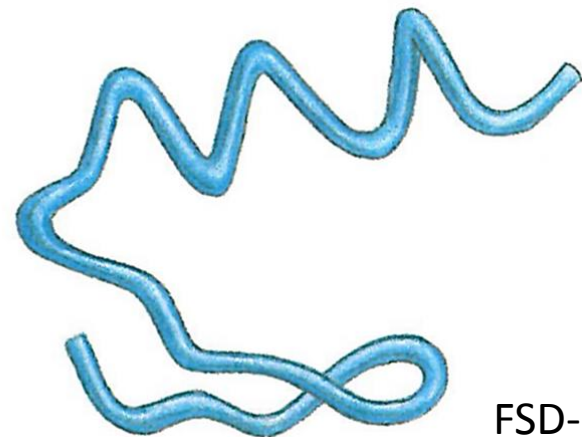
Ni C, M in P. G je na posebnih pozicijah, da zmanjša torzijsko napetost.

	1									11											21						28																												
FSD-1	Q	-	Q	-	Y	-	T	-	A	-	K	-	I	-	K	-	G	-	R	-	T	-	F	-	R	-	N	-	E	-	K	-	E	-	L	-	R	-	D	-	F	-	I	-	E	-	K	-	F	-	K	-	G	-	R
Zif 268	K	-	P	-	F	-	Q	-	C	-	R	-	I	-	C	-	M	-	R	-	N	-	F	-	S	-	R	-	S	-	D	-	H	-	L	-	T	-	T	-	H	-	I	-	R	-	T	-	H	-	T	-	G	-	E

Residues in the hydrophobic core of FSD-1 are green.



Zif 268

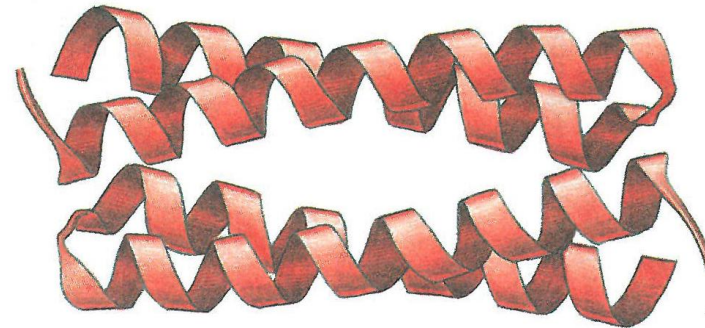
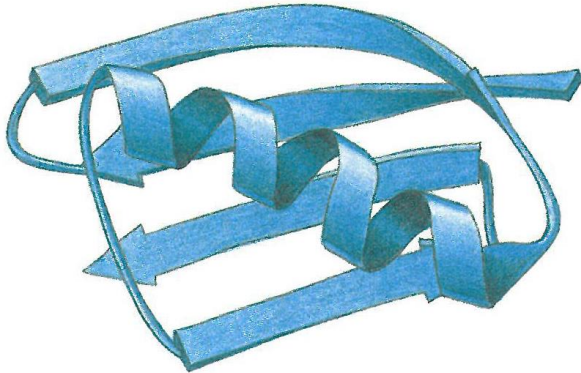


FSD-1

De novo proteini

Sprememba zvitja s spremembo 50% ostankov proteina. Ab zvitje proteina B1 so spremenili v zvitje snopa vijačnic proteina Rop, tako da so zamenjali polovico ostankov.

B1



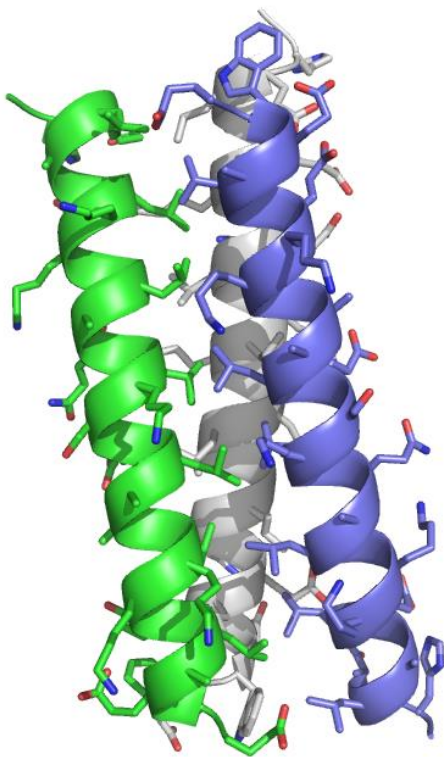
Rop
Janus

	I		II																
B1	M	T	Y	K	L	I	L	N	G	K	T	L	K	G	E	T	T	T	E
Janus	M	T	K	K	A	I	L	A	L	N	T	A	K	F	L	R	T	Q	A
Rop	G	T	K	Q	E	K	T	A	L	N	M	A	R	F	I	R	S	Q	T
	21		31																
B1	A	V	D	A	A	T	A	E	K	V	F	K	Q	Y	A	N	D	N	G
Janus	A	V	L	A	A	K	L	E	K	L	G	A	Q	E	A	N	D	N	A
Rop	L	T	L	L	E	K	L	N	E	L	D	A	D	E	Q	A	D	I	C
	41		51																
B1	V	D	G	E	W	T	Y	D	D	A	T	K	T	F	T	V	T	E	
Janus	V	D	L	E	D	T	A	D	D	L	Y	K	T	L	L	V	L	A	
Rop	E	S	L	H	D	H	A	D	E	L	Y	R	S	C	L	A	R	F	

De novo proteini

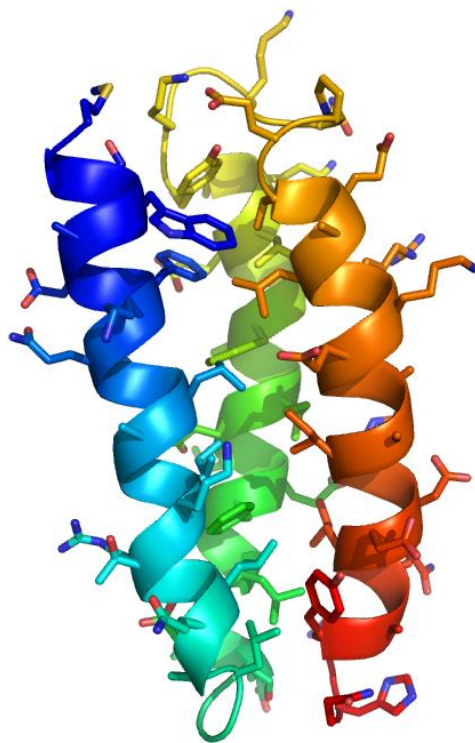
Začetni poskusi *de novo* dizajna so bili usmerjeni tudi v α -vijačnice, tvorijo zadrge ali snope.

snop treh vijačnic z
interakcijami levcinske
zadrge



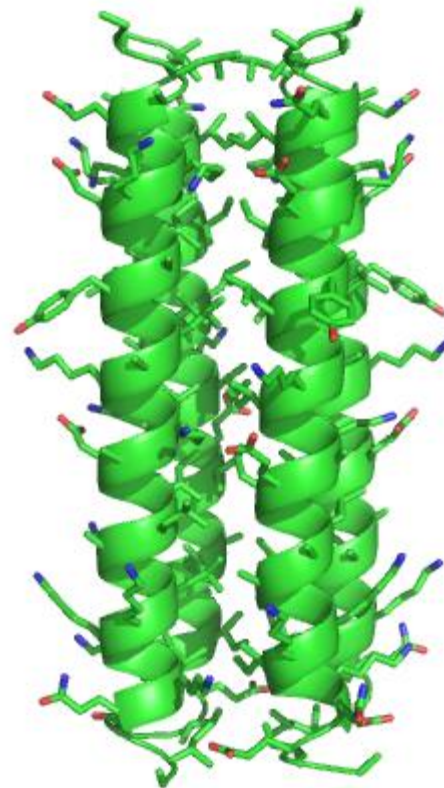
PDB 1COS

snop treh vijačnic



PDB 2A3D

motiv, ki tvori snop
štirih ravnih vijačnic

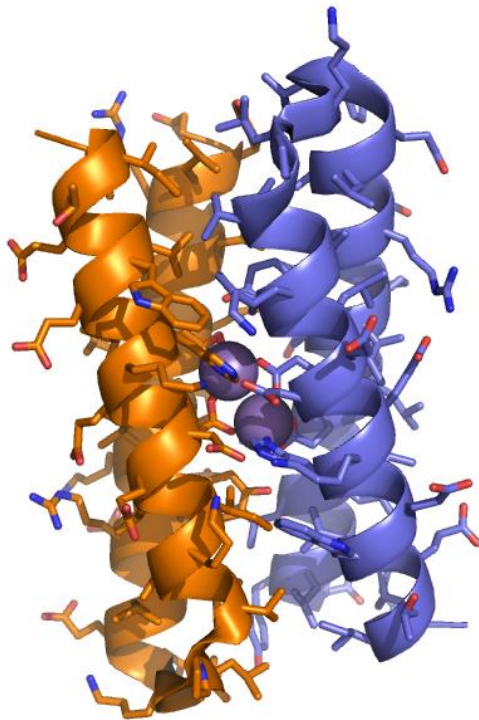


PDB 1RH4

De novo proteini

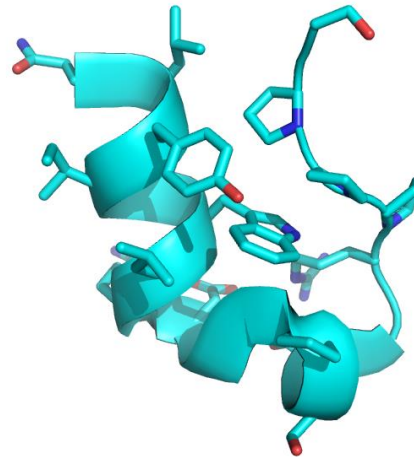
Začetni poskusi *de novo* dizajna so bili usmerjeni tudi v α -vijačnice, tvorijo zadrge ali snope. Narejene so bile tudi mini domene, stabilizirane z internimi interakcijami.

motiv, ki tvori snop
štirih ravnih vijačnic



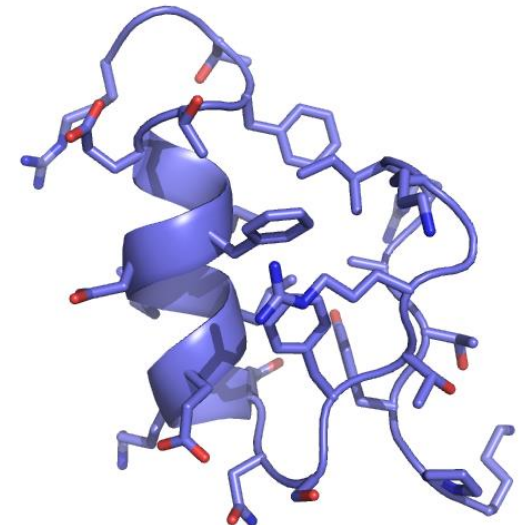
PDB 1JMB

mini domena
stabilizirana s Trp in Pro



PDB 1L2Y

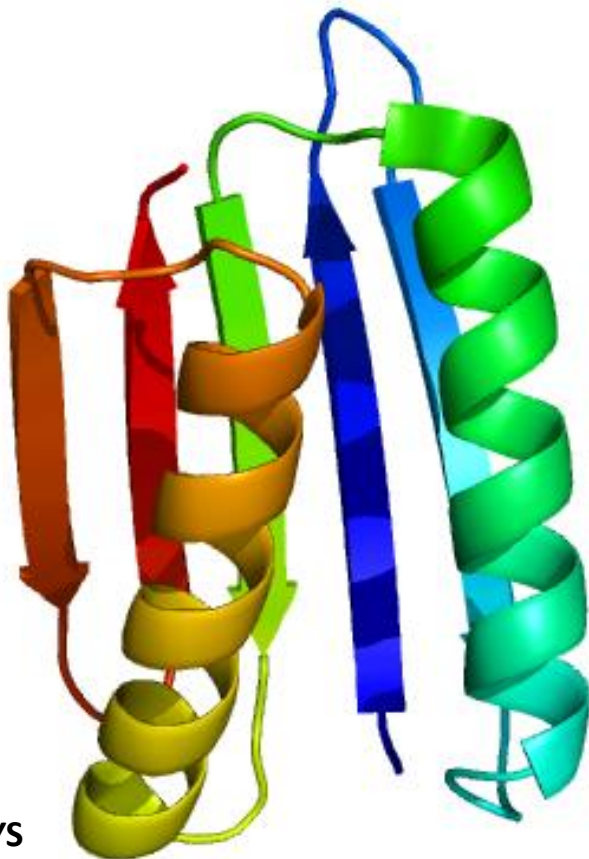
mini domena po zgledu
cinkovih prstov



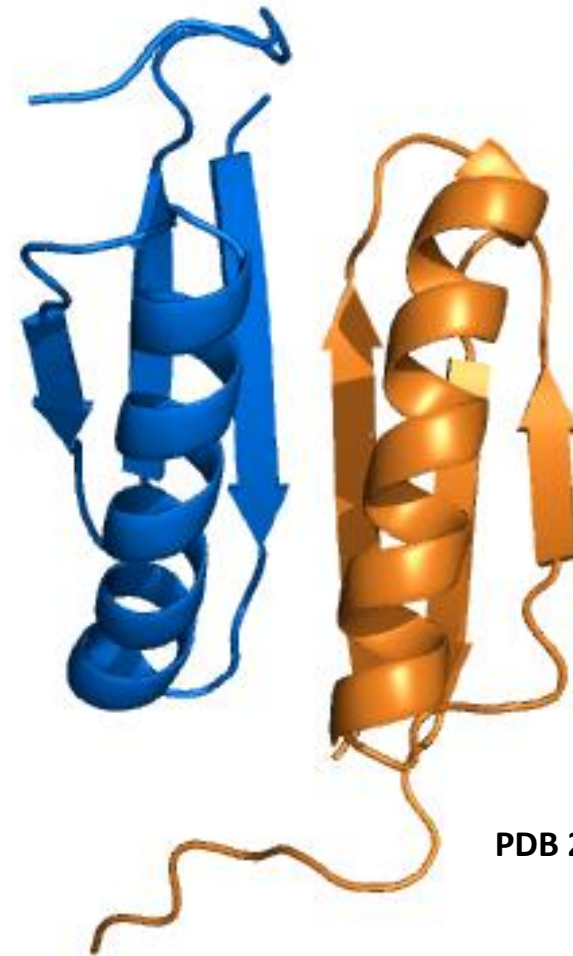
PDB 1PSV

De novo proteini

David Baker in sodelavci so ustvarili protein z novim zaporedjem in zvitjem, ki ni bilo najdeno pri nobenem znanem proteinu. Protein Top7 je velik 93 ostankov. Zanimivo je, da je stabilen tudi C-končen fragment Top7 (zadnjih 49 ak), ki tvori homodimere.



PDB 1QYS

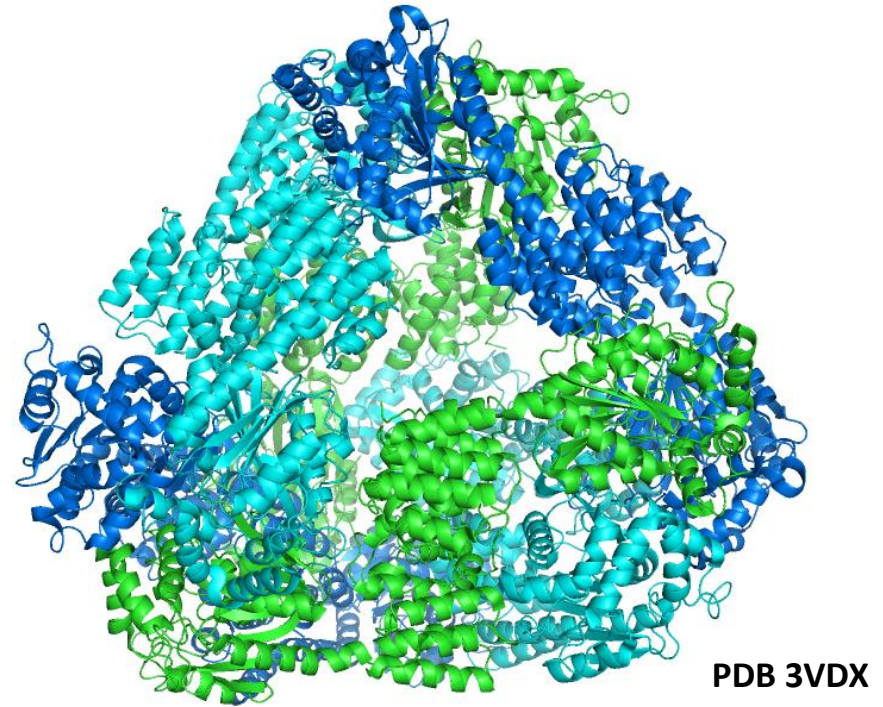
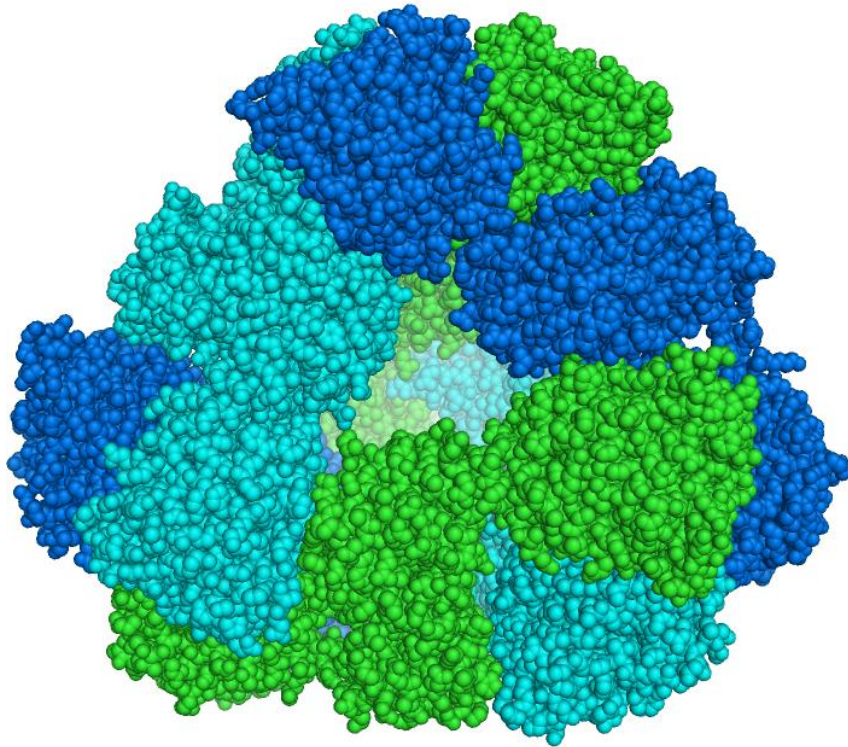


PDB 2GJH

Proteinske kletke

Proteinske kletke, ki se tvorijo spontano iz sestavnih delov, lahko uporabimo v različne namene, npr. kot dostavne sisteme za zdravila.

Primer: 16 nm tetraedrična nanokletka, dobljena s fuzijo bromoperoksidaze (trimerizira) in virusnega proteina M1 (dimerizira), ki tvori homo-12-mer.

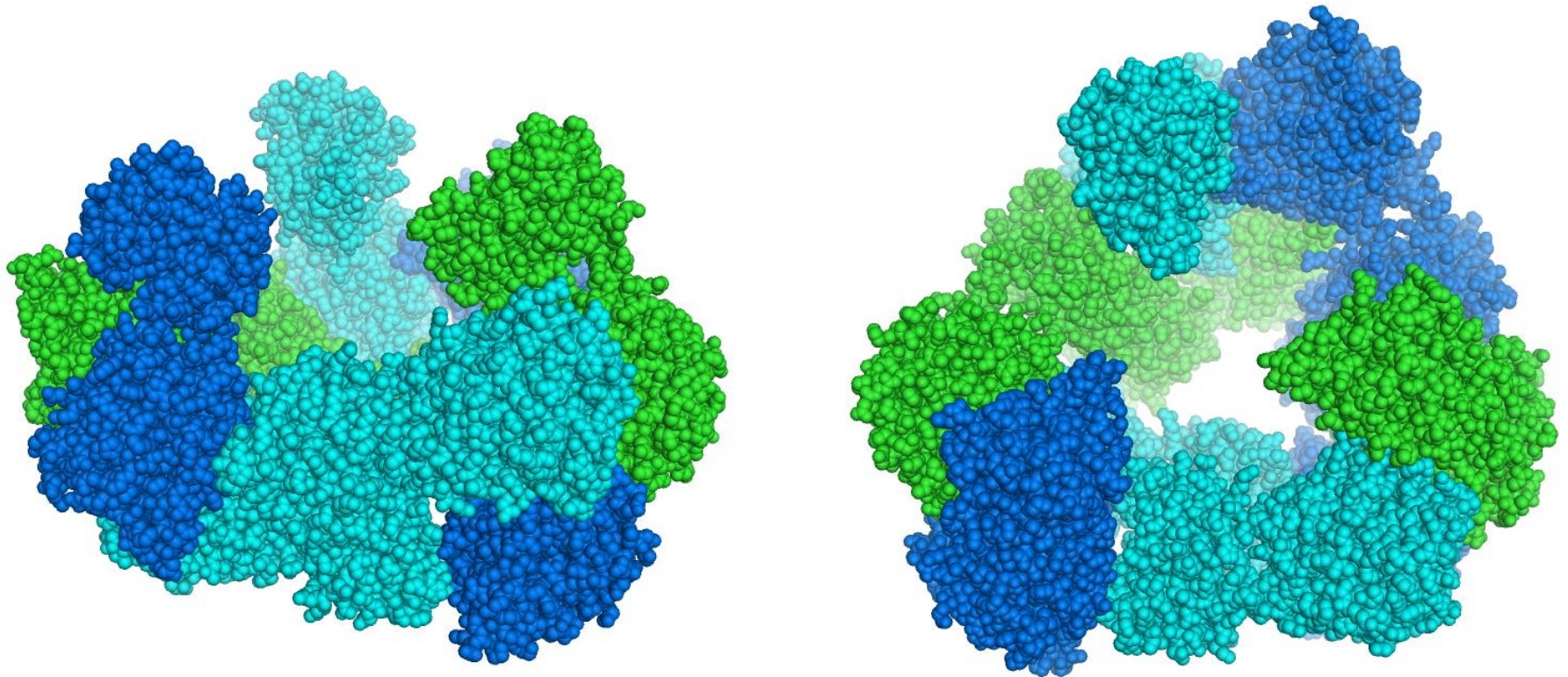


celotna kletka

Proteinske kletke

Proteinske kletke, ki se tvorijo spontano iz sestavnih delov, lahko uporabimo v različne namene, npr. kot dostavne sisteme za zdravila.

Primer: 16 nm tetraedrična nanokletka, dobljena s fuzijo bromoperoksidaze (trimerizira) in virusnega proteina M1 (dimerizira), ki tvori homo-12-mer.

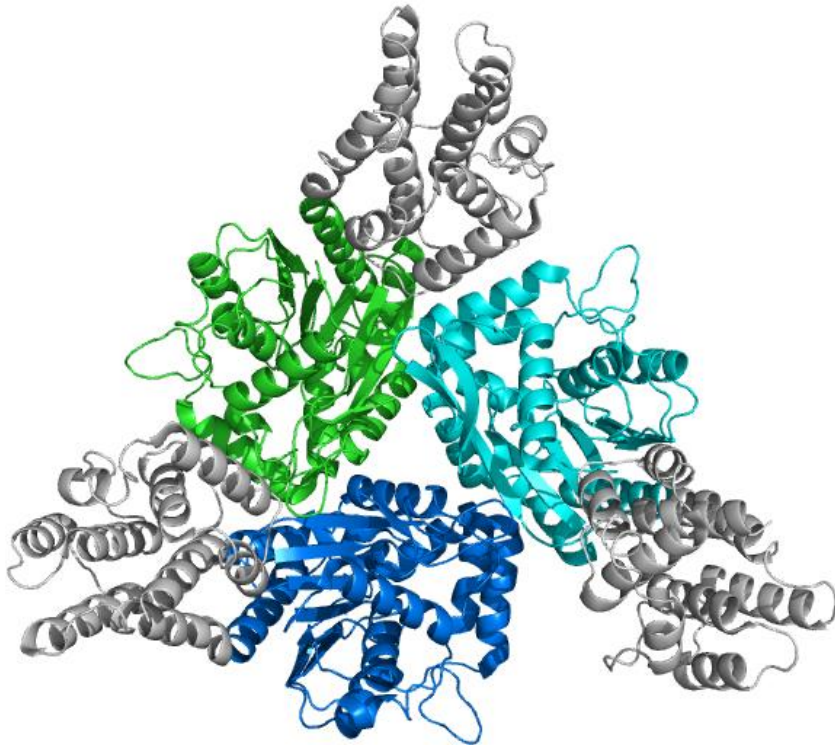


kletka brez enega trimera

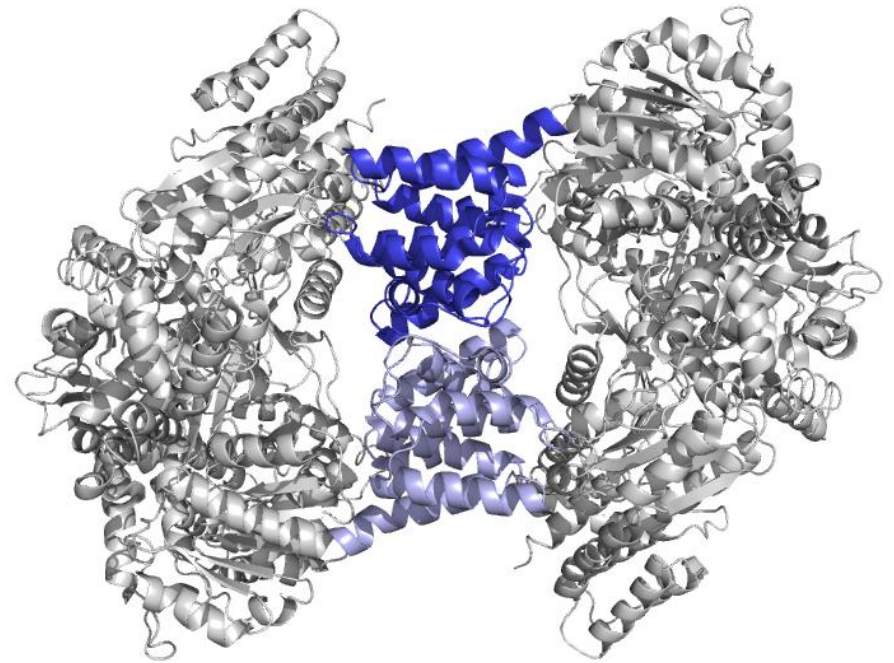
Proteinske kletke

Proteinske kletke, ki se tvorijo spontano iz sestavnih delov, lahko uporabimo v različne namene, npr. kot dostavne sisteme za zdravila.

Primer: 16 nm tetraedrična nanokletka, dobljena s fuzijo bromoperoksidaze (trimerizira) in virusnega proteina M1 (dimerizira), ki tvori homo-12-mer.



trimer bromoperoksidaze

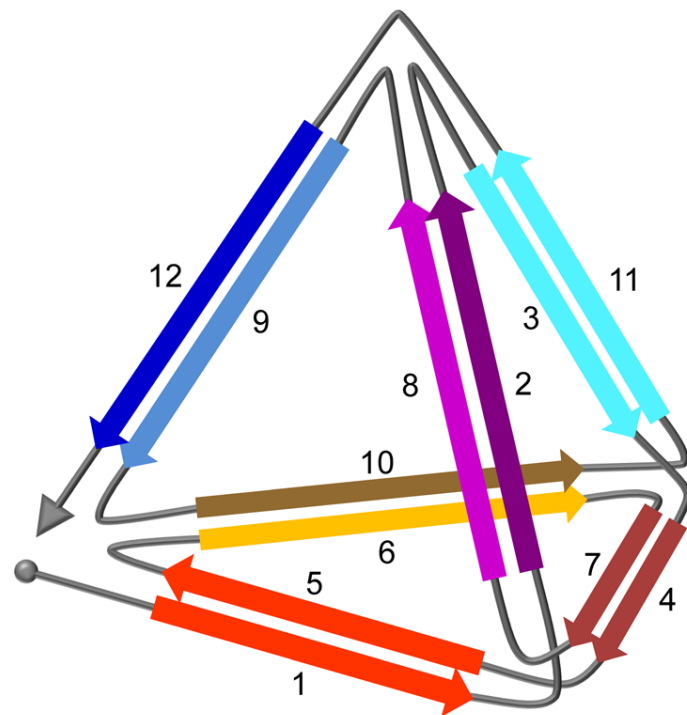
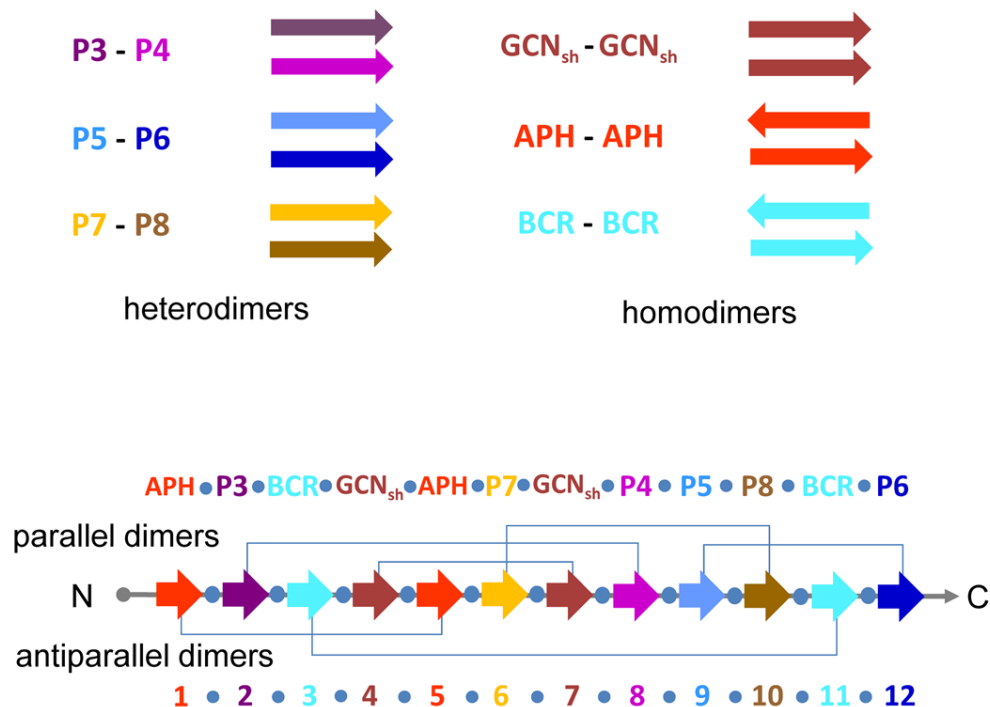


dimerizacija trimerov preko M1

Proteinske kletke

Proteinske kletke, ki se tvorijo spontano iz sestavnih delov, lahko uporabimo v različne namene, npr. kot dostavne sisteme za zdravila.

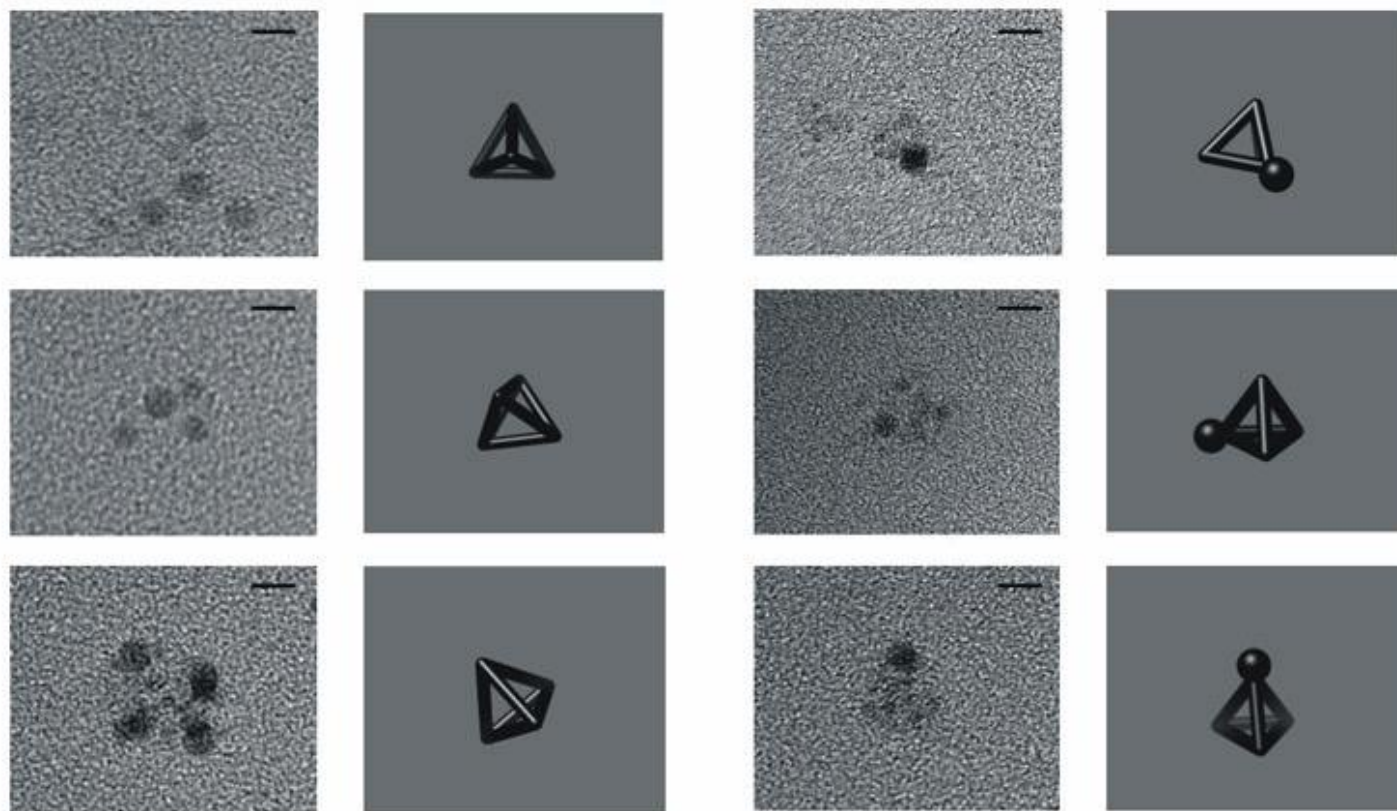
Primer: samosestavljajoč se tetraeder iz ovitih vijačnic.



Proteinske kletke

Proteinske kletke, ki se tvorijo spontano iz sestavnih delov, lahko uporabimo v različne namene, npr. kot dostavne sisteme za zdravila.

Primer: samosestavljajoč se tetraeder iz ovitih vijačnic.



TEM nanodelcev

Rosetta encimi

Rosetta je zbirka orodij za računalniško modeliranje proteinov:

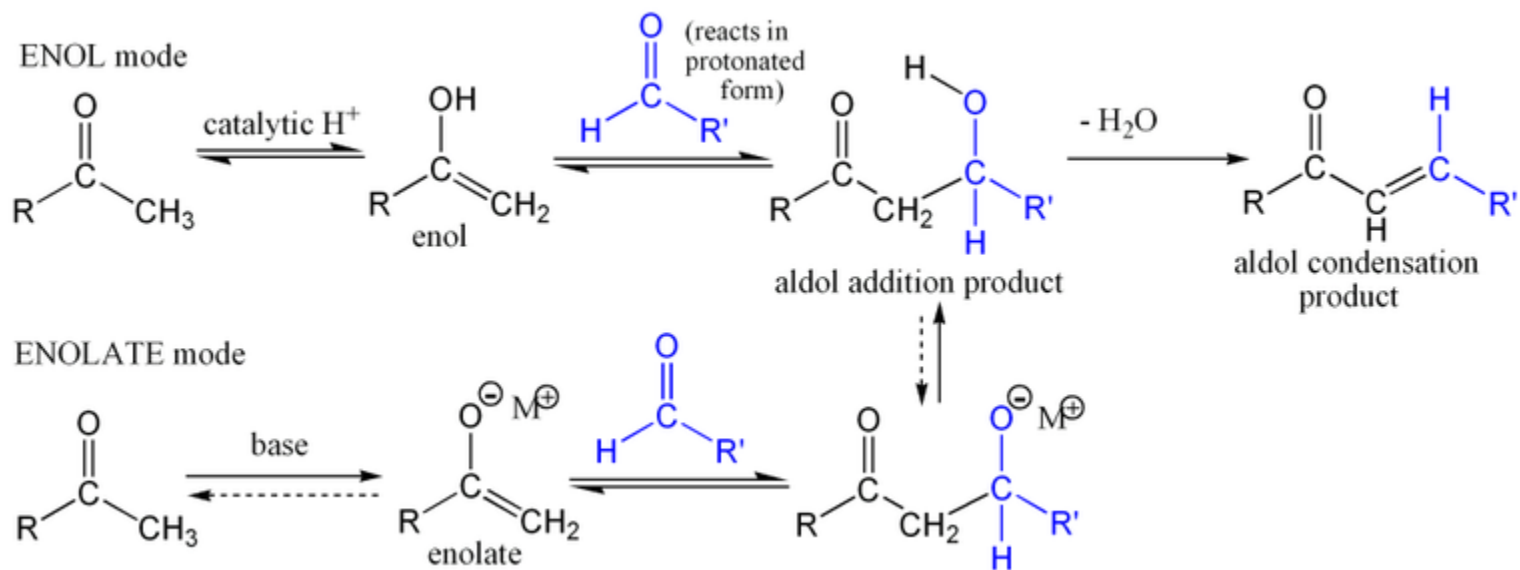
- napovedovanje strukture proteinov
- napovedovanje interakcij med proteini
- dizajn novih proteinov

Rosetta se razvija v laboratoriju Davida Bakerja (Seattle, WA, USA)

Rosetta@home – pomoč ljudi pri reševanju računsko intenzivnih problemov – vsak lahko sodeluje

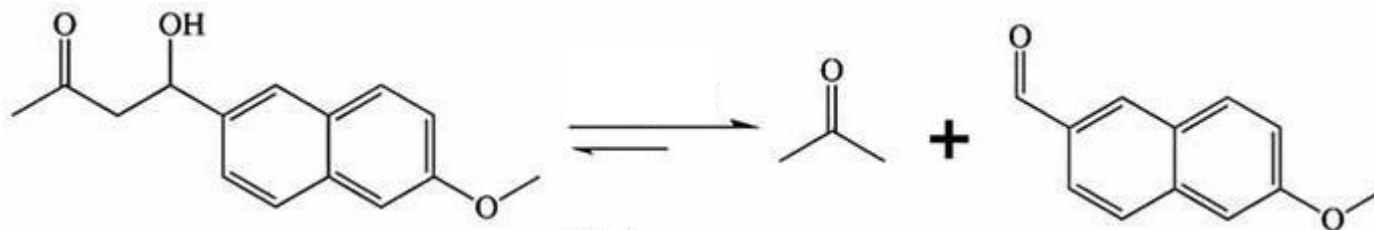
Rosetta encimi – retro-aldolaza

aldolna kondenzacija – tvorba C-C vezi



Rosetta encimi – retro-aldolaza

retro-aldolna reakcija – prekinitev C-C vezi



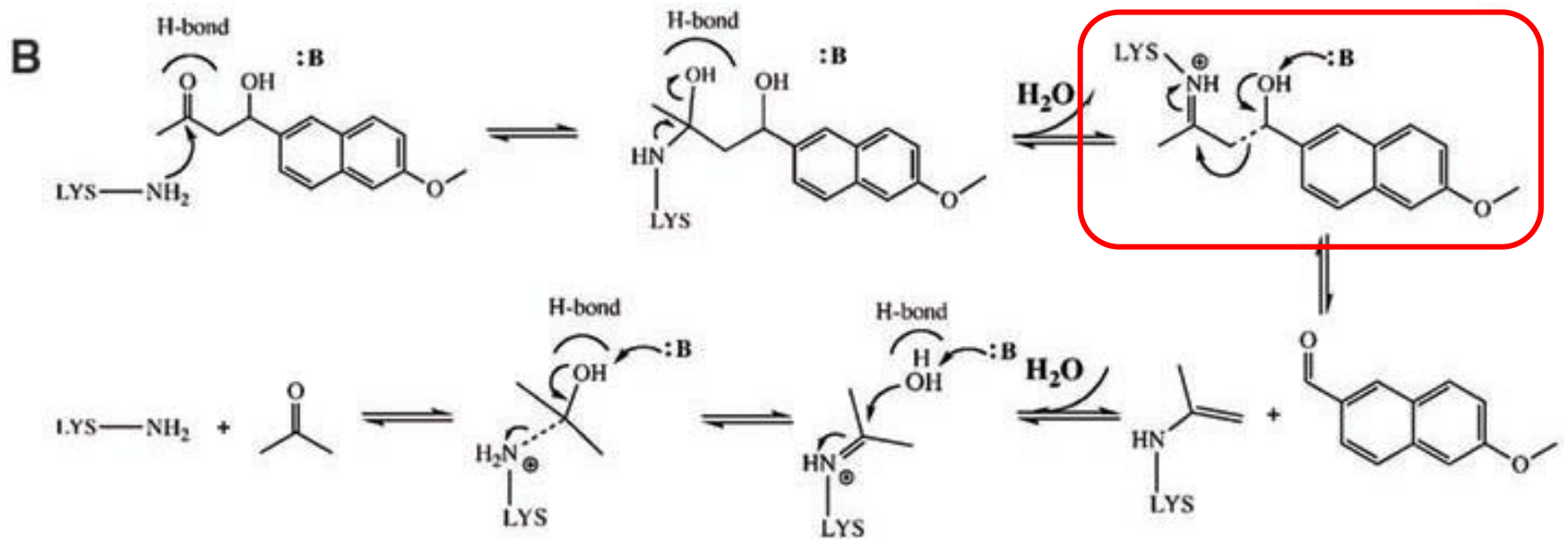
4-hidroksi-4-(6-metoksi-2-naftil)-2-butanon

nenaraven substrat

obstajajo tudi naravne retro-aldolaze

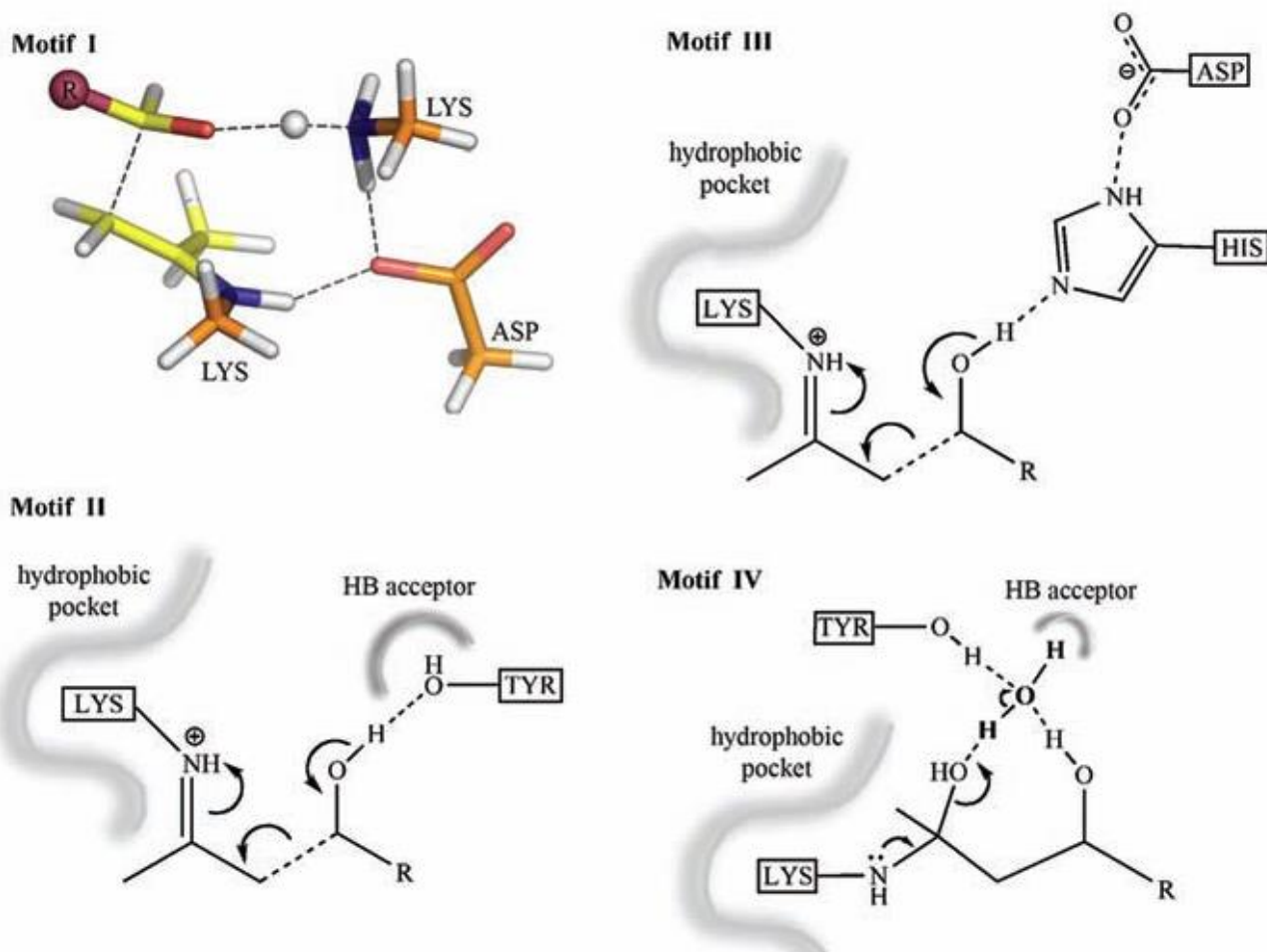
Rosetta encimi – retro-aldolaza

mehanizem encimsko katalizirane retro-aldolne reakcije



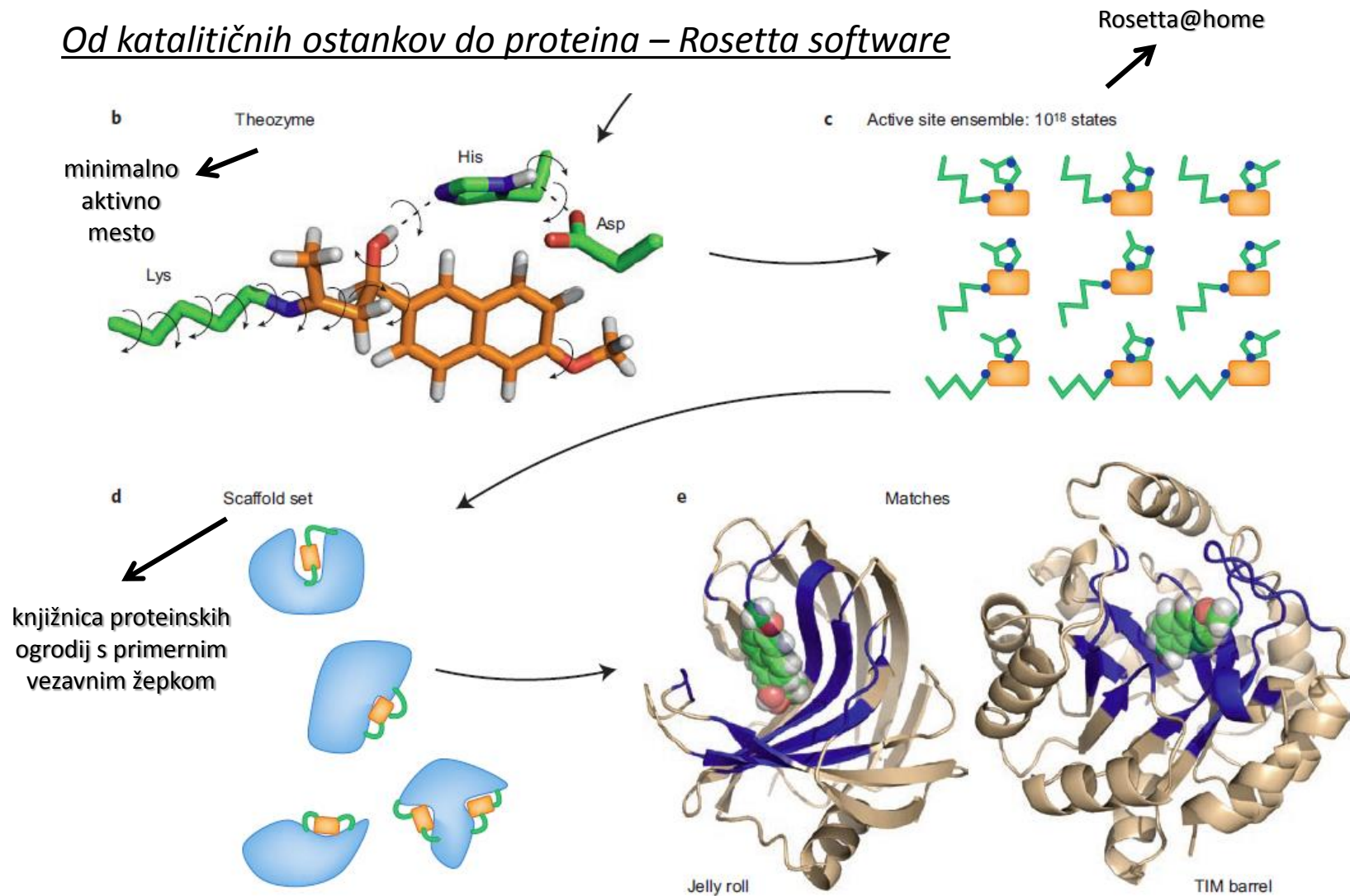
Rosetta encimi – retro-aldolaza

Možne razporeditve katalitičnih ostankov za katalizo retro-aldolne reakcije



Rosetta encimi – retro-aldolaza

Od katalitičnih ostankov do proteina – Rosetta software



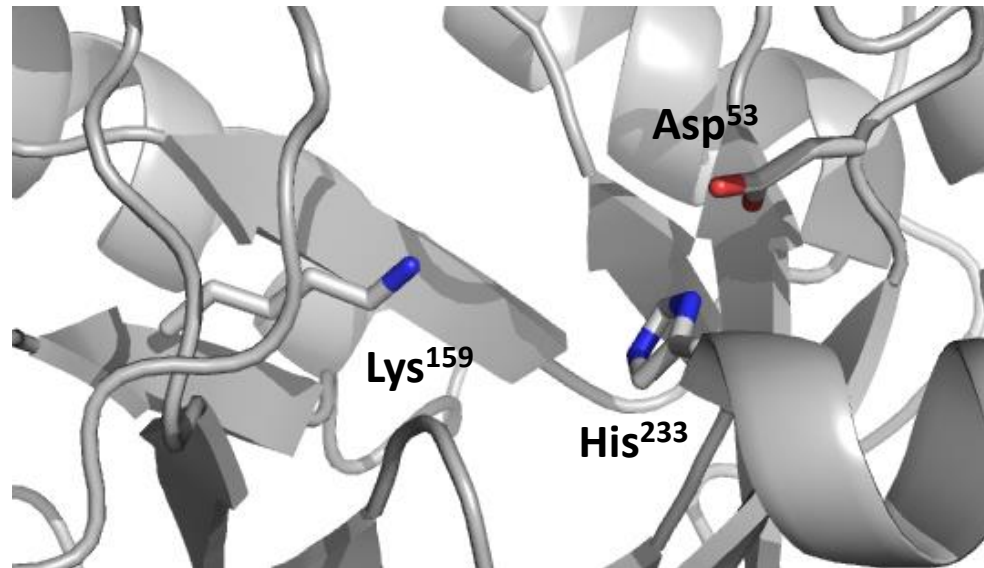
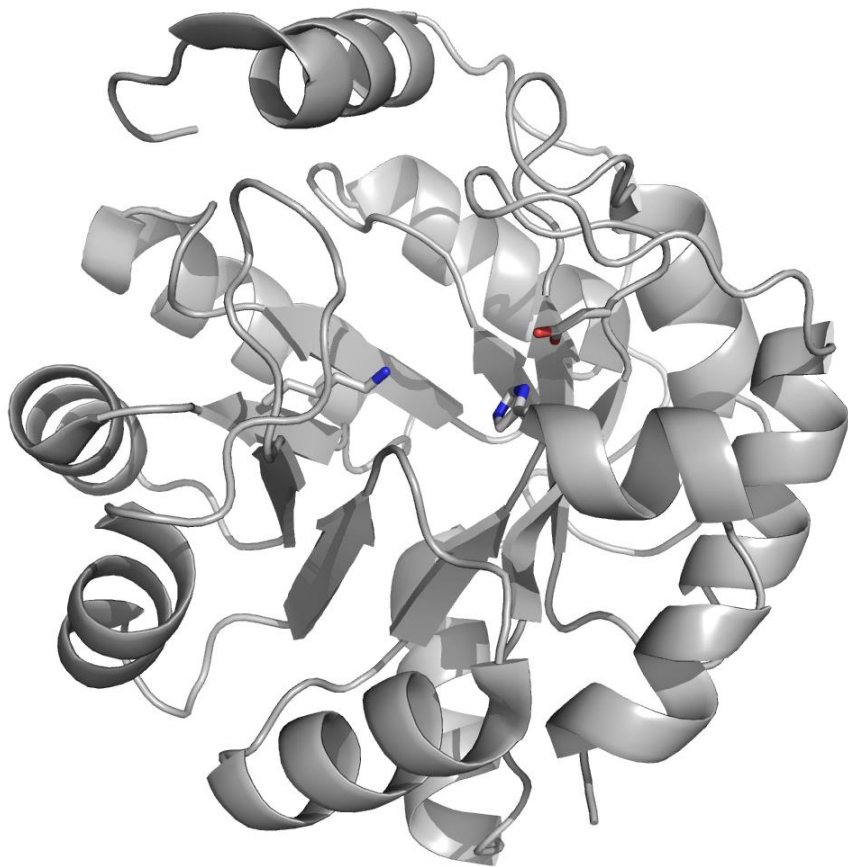
Rosetta encimi – retro-aldolaza

Končni rezultat – 72 testiranih encimov, 32 aktivnih

Motif	Catalytic lysine environment	Carbinolamine stabilization	Proton abstraction	Number tested	Number forming enaminone	Number of active designs	Rate enhancement
I	Polar	NC	Lys-Asp dyad	12	2	0	<4
II	Hydrophobic	NC	Tyr	9	1	0	<4
III	Hydrophobic	H-bond acceptor/donor	His-Asp dyad	13	10	10	$10^2 \sim 10^3$
IV	Hydrophobic	Water, H-bond acceptor	Water	38	20	22	$10^3 \sim 10^4$

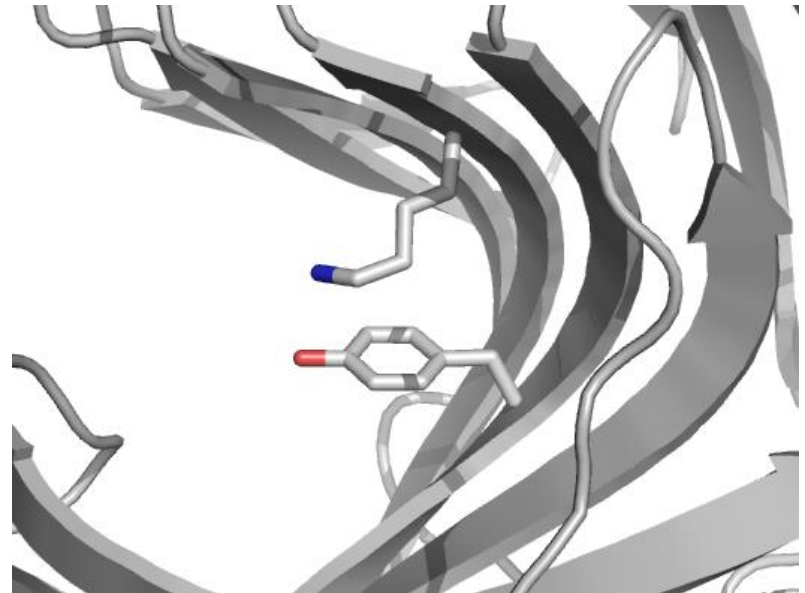
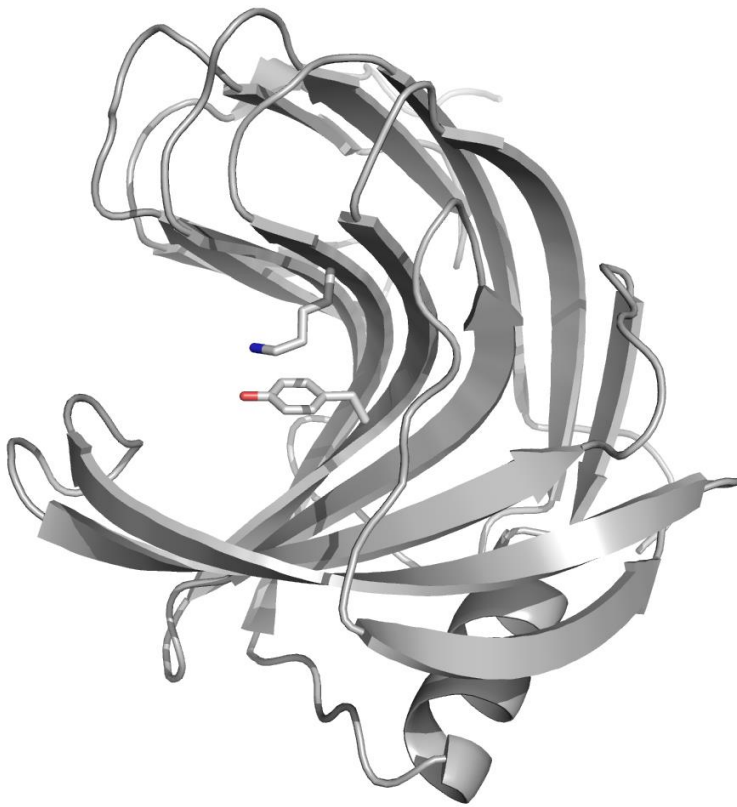
Rosetta encimi – retro-aldolaza

Končni rezultat – kristalna struktura RA22 (varijanta S210A) – motiv III



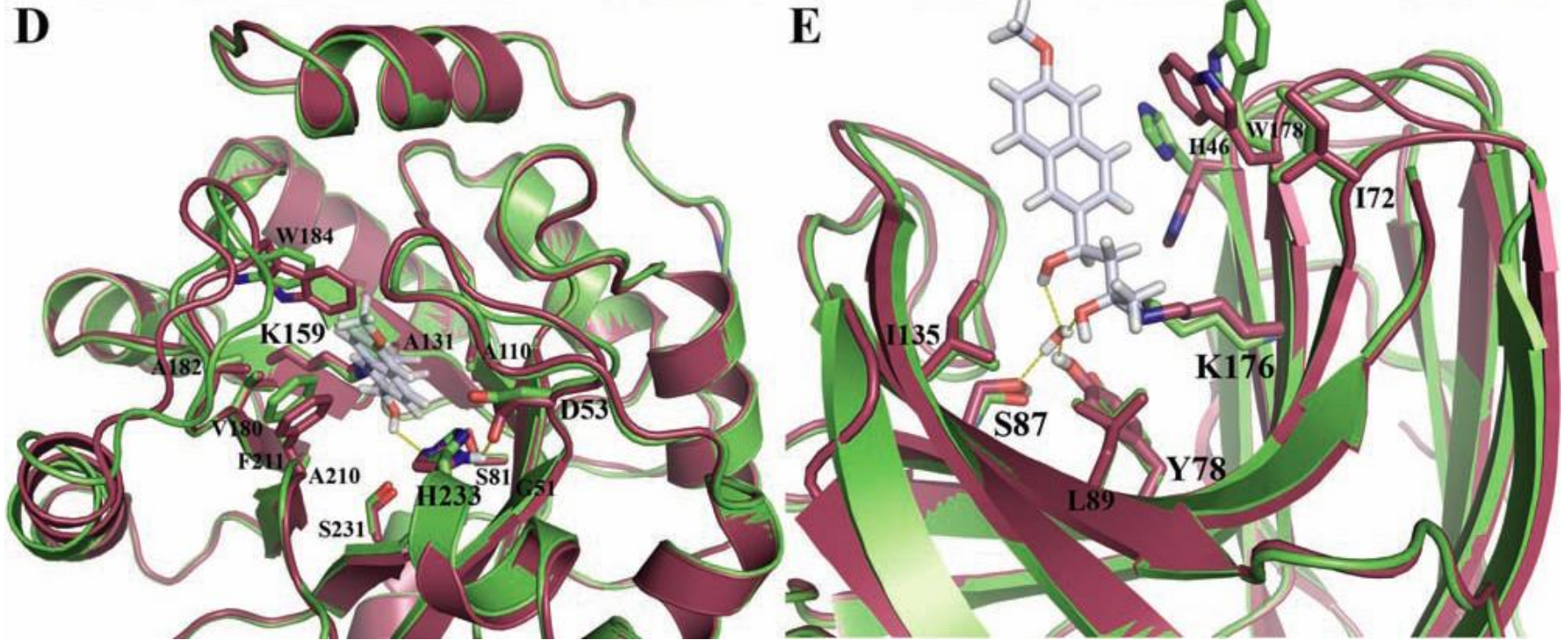
Rosetta encimi – retro-aldolaza

Končni rezultat – kristalna struktura RA61 (varianta M48K) – motiv IV



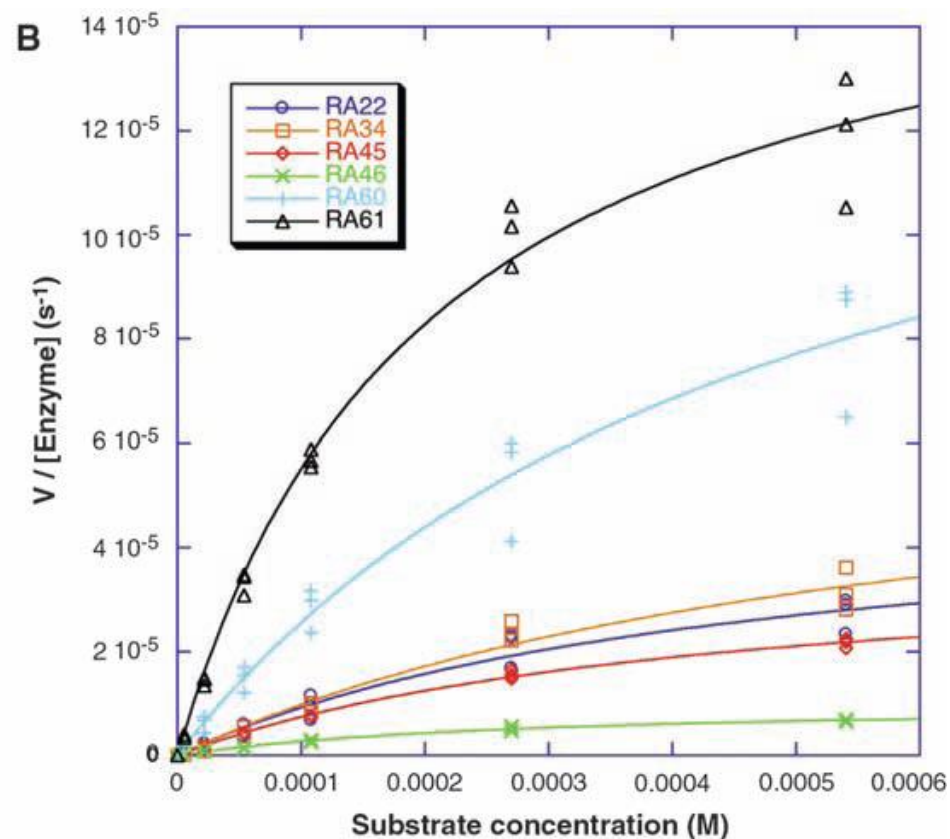
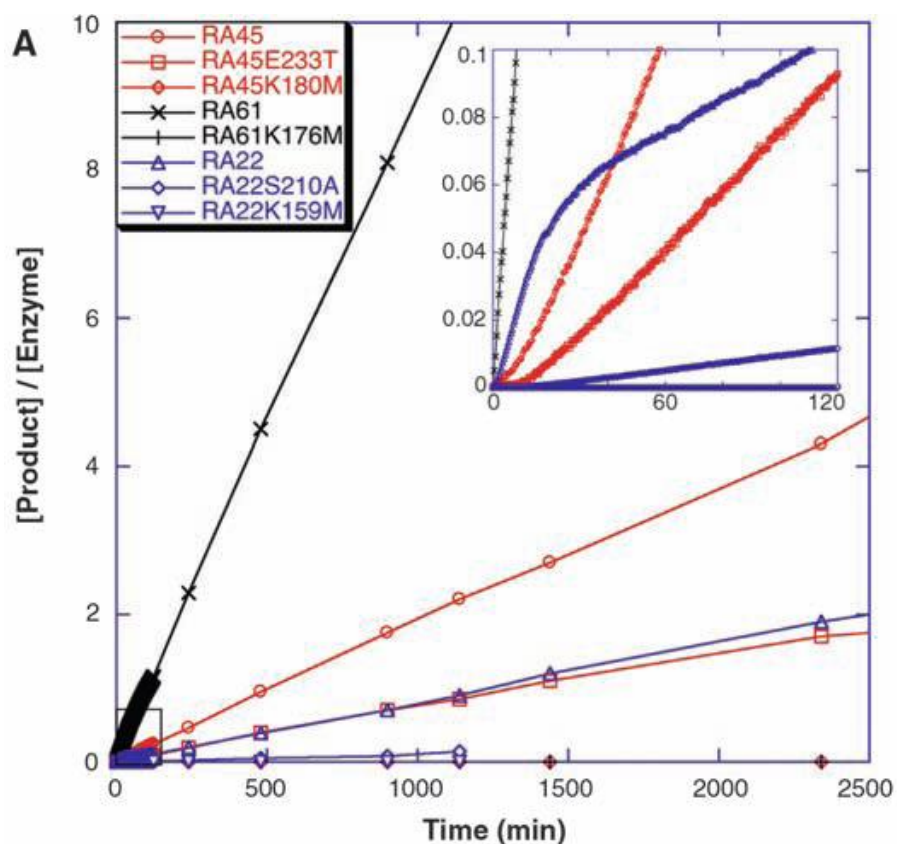
Rosetta encimi – retro-aldolaza

Končni rezultat – primerjava kristalnih struktur z modeli



Rosetta encimi – retro-aldolaza

Kinetične lastnosti de novo retro-aldolaz



Rosetta encimi – retro-aldolaza

Kinetične lastnosti de novo retro-aldolaz

Table 2. Kinetic parameters of selected designs. b, burst phase; s, steady state.

Design	k_{cat} ($\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$)	K_M (μM)	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}^*$
RA22	3.1 ± 0.3 (b)	480 ± 130 (b)	0.11 ± 0.03 (b)	8.1×10^3 (b)
	0.5 ± 0.1 (s)	450 ± 210 (s)	0.018 ± 0.006 (s)	1.2×10^3 (s)
RA34	4.2 ± 1.1 (b)	620 ± 180 (b)	0.11 ± 0.01 (b)	1.1×10^4 (b)
	0.6 ± 0.1 (s)	600 ± 140 (s)	0.016 ± 0.004 (s)	1.5×10^3 (s)
RA45	2.3 ± 0.2	430 ± 48	0.091 ± 0.004	6.0×10^3
RA46	0.62 ± 0.5	290 ± 60	0.037 ± 0.006	1.6×10^3
RA60	9.3 ± 0.9	510 ± 33	0.30 ± 0.06	2.4×10^4
RA61	9.0 ± 1.0	210 ± 50	0.74 ± 0.11	2.3×10^4

* $k_{\text{uncat}} = 3.9 \times 10^{-7} \text{ min}^{-1}$ (25).