

Molekulární biotechnologie č.9

Cílená mutageneze a proteinové inženýrství

Gen kódující jakýkoliv protein

- lze izolovat z přírody,
- klonovat,
- exprimovat v hostitelském organismu.
- rekombinantní protein purifikovat a vyrábět komerčně

Přirozeně se vyskytující proteiny

- se jen vzácně hodí přímo pro průmyslové aplikace
- Např. enzym alfa-amyláza (využíván pro průmyslovou produkci alkoholu ze škrobu) byl izolován z *Bacillus stearothermophilus*.
- Je stabilní při vysokých teplotách (vyskytuje se v horkých pramenech nad 90° C)

Průmyslově je využíváno

- Asi 20 enzymů
- Z mnoha tisíc enzymů, které byly studovány a popsány

Příklad komerčně využívaných enzymů (Glick a spol.2011)

Table 8.1 Some industrial enzymes and their commercial uses

Enzyme	Industrial use(s)
α -Amylase	Beer making, alcohol production
Aminoacylase	Preparation of L-amino acids
Bromelain	Meat tenderizer, juice clarification
Catalase	Antioxidant in prepared foods
Cellulase	Alcohol and glucose production
Ficin	Meat tenderizer, juice clarification
Glucoamylase	Beer making, alcohol production
Glucose isomerase	Manufacture of high-fructose syrups
Glucose oxidase	Antioxidant in prepared foods
Invertase	Sucrose inversion
Lactase	Whey utilization, lactose hydrolysis
Lipase	Cheese making, preparation of flavorings
Papain	Meat tenderizer, juice clarification
Pectinase	Clarifying fruit juices, alcohol production
Protease	Detergent, alcohol production
Rennet	Cheese making

Přirozená aktivita enzymů obvykle není vhodná pro specifické funkce *in vitro*

- Průmyslové procesy probíhají za vysoké teploty
- a v přítomnosti organických rozpouštědel, které enzymy denaturují
- Extrémofilní organismy enzym nemusejí produkovat

Ve většině případů

- Je třeba proteinový produkt vylepšovat
- tj. zavádět do proteinů cílené změny
- Za účelem produkce enzymu s předem určenými vlastnostmi
- Zabývá se tím proteinové inženýrství

Definice

- **Proteinové inženýrství:** Vytváření proteinů s novými vlastnostmi pomocí metod genového inženýrství (s využitím technologie rekombinantní DNA)
- **Genové inženýrství:** Vytváření rekombinantních molekul DNA představujících pozměněné nebo nové geny a nebo nové kombinace genů a jejich zavádění do genomu organismů s cílem pozměnit jejich vlastnosti.

Proteinové inženýrství

- Využívá technik rekombinantní DNA a cílenou mutagenezi
- k změně proteinů na úrovni DNA.
- Využívá možnosti specificky měnit aminokyseliny s cílem získat proteiny s vlastnostmi vhodnými pro průmyslové a další (např. terapeutické) aplikace
- (Provádět změny proteinů na úrovni DNA je jednodušší než provádět přímé změny proteinů)

Pomocí technologie rekombinantní DNA se dá ovlivňovat

- Vazba substrátu k enzymu (Michaelisova konstanta)
- Rychlost konverze substrátu na produkt
- Teplotní stabilita enzymu
- Optimální pH enzymu
- Aktivita enzymu v nevodných rozpouštědlech
- Úpravy enzymu tak, aby nevyžadoval kofaktor
- Omezení nežádoucích vedlejších enzymatických aktivit
- Zvýšení rezistence k proteázám
- Změna regulace syntézy enzymu (proteinu)

Mutagenese *in vitro*

- Postupy, jimiž se mění primární struktura izolovaných molekul DNA
- Mutagenese *in vitro* náhodná – postupy, při nichž se na náhodném místě izolované molekuly DNA mění její primární struktura
- Mutagenese místně cílená – technika mutagenese *in vitro*, při níž se do izolované molekuly DNA vnáší mutace do přesně určeného místa

Mutageneze řízená oligonukleotidem

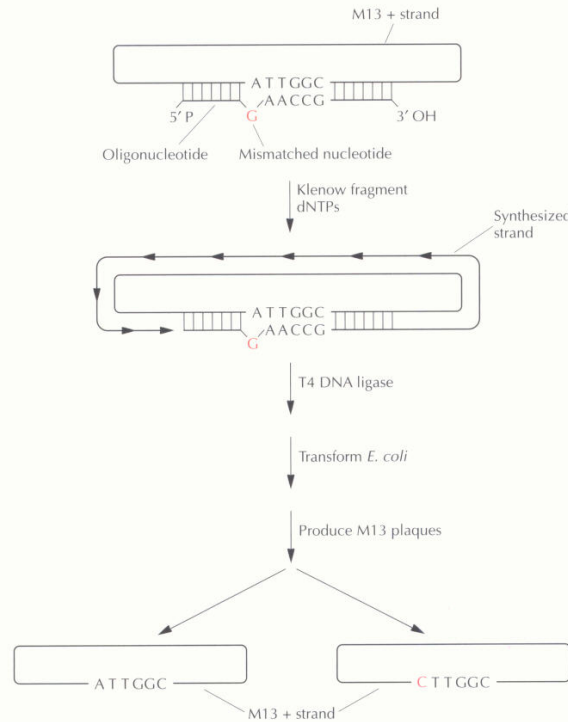
- Místně cílená mutageneze
- technika mutageneze *in vitro*, při níž se do izolované molekuly DNA vnáší mutace do přesně určeného místa pomocí oligonukleotidu

Mutageneze řízená oligonukleotidem vyžaduje znalost

- sekvence nukleotidů oblasti DNA kódující kodon, který chceme změnit
- záměnu aminokyseliny, kterou chceme provést
- např. záměnu sekvence ATT (isoleucin) za CTT (leucin)

Mutageneze řízená oligonukleotidem – záměna ATT (isoleucin) za CTT (leucin) (Glick a spol.2003)

Figure 8.1 Oligonucleotide-directed mutagenesis. Single-stranded bacteriophage M13 (M13 + strand), carrying a cloned gene, is annealed with a complementary synthetic oligonucleotide containing one mismatched base, i.e., one base that is not complementary to its counterpart in the target DNA. With the oligonucleotide as the primer, DNA synthesis is catalyzed by the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I; the cloned gene and the M13 vector are the template. Synthesis continues until the entire strand is copied. The newly synthesized DNA strand is circularized by T4 DNA ligase. The ligation reaction mixture is used to transform *E. coli*. Both the target DNA with its original sequence and the mutated sequence are present in the progeny M13 phage. dNTPs, deoxynucleoside triphosphates.



Pro oligonukleotidem řízenou mutagenezi

- Lze využít plasmidovou DNA
- metodu PCR

Oligonukleotidem řízená mutagenéze s využitím plasmidové DNA (Glick a spol.2003)

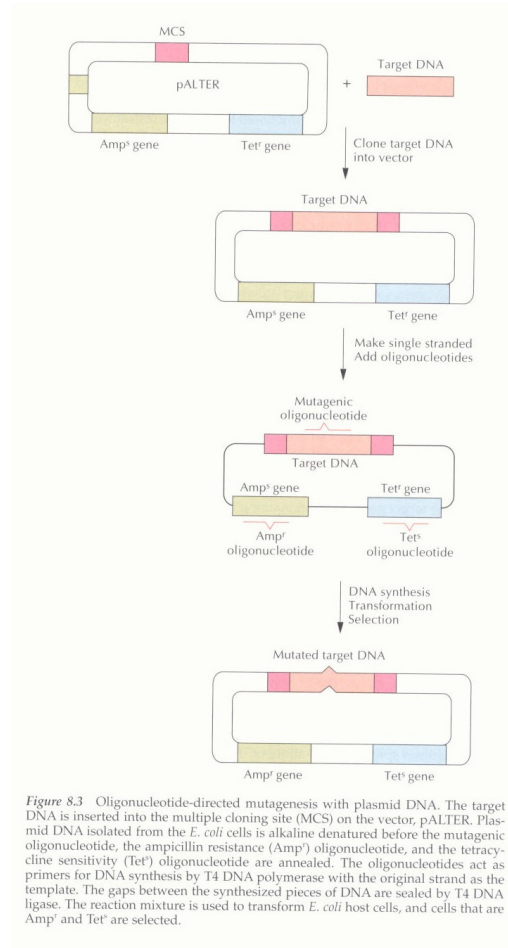
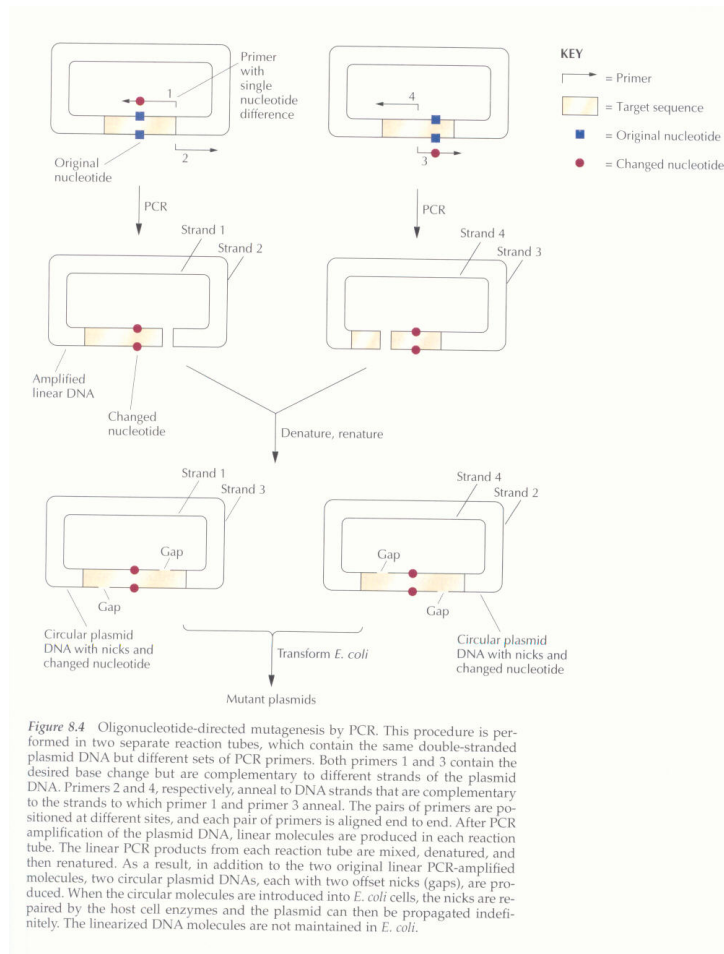


Figure 8.3 Oligonucleotide-directed mutagenesis with plasmid DNA. The target DNA is inserted into the multiple cloning site (MCS) on the vector, pALTER. Plasmid DNA isolated from the *E. coli* cells is alkaline denatured before the mutagenic oligonucleotide, the ampicillin resistance (Amp^r) oligonucleotide, and the tetracycline sensitivity (Tet^r) oligonucleotide are annealed. The oligonucleotides act as primers for DNA synthesis by T4 DNA polymerase with the original strand as the template. The gaps between the synthesized pieces of DNA are sealed by T4 DNA ligase. The reaction mixture is used to transform *E. coli* host cells, and cells that are Amp^r and Tet^r are selected.

Oligonukleotidem řízená mutagenese s využitím PCR (Glick a spol.2003)



Proteinové inženýrství využívá

- cílených změn v aminokyselinách proteinů, které ovlivňují vlastnosti proteinů

Přidání disulfidických vazeb

- Zvyšuje termostabilitu proteinu a
- Odolnost k denaturaci organickými rozpouštědly
- Disulfidické vazby vznikají mezi AK cys
- Např. 6 variant lysozymu, v němž 2,4 nebo 6 AK bylo zaměněno cysteinem, čímž v proteinu vznikly 1,2 nebo 3 disulfidické vazby
- Neoptimálnější varianta (D) byla určena experimentálně.

Vlastnosti lysozymu s různým počtem cys a jeho variant (Glick a spol.2003)

Table 8.2 Properties of T4 lysozyme and six engineered variants

Enzyme	Amino acid at position:							No. of -S-S-	% Activity	T_m (°C)
	3	9	21	54	97	142	164			
wt	Ile	Ile	Thr	Cys	Cys	Thr	Leu	0	100	41.9
pwt	Ile	Ile	Thr	Thr	Ala	Thr	Leu	0	100	41.9
A	Cys	Ile	Thr	Thr	Cys	Thr	Leu	1	96	46.7
B	Ile	Cys	Thr	Thr	Ala	Thr	Cys	1	106	48.3
C	Ile	Ile	Cys	Thr	Ala	Cys	Leu	1	0	52.9
D	Cys	Cys	Thr	Thr	Cys	Thr	Cys	2	95	57.6
E	Ile	Cys	Cys	Thr	Ala	Cys	Cys	2	0	58.9
F	Cys	Cys	Cys	Thr	Cys	Cys	Cys	3	0	65.5

Adapted from Matsumura et al., *Nature* 342:291–293, 1989.

wt, wild-type T4 lysozyme; pwt, pseudo-wild-type enzyme; A through F, six engineered cysteine variants; -S-S-, disulfide bonds; T_m , “melting” temperature (a measure of thermostability).

Disulfidické vazby

- Ovlivňují stabilitu proteinu

Protein, který obsahuje 2 disulfidické můstky (Glick a spol.2003)

Figure 8.13 Schematic representation of the engineering of a protein that contains two engineered disulfide bridges (colored lines in bottom diagram) that hold together and may stabilize regions of the protein that are often separated in the primary amino acid sequence.



Native protein



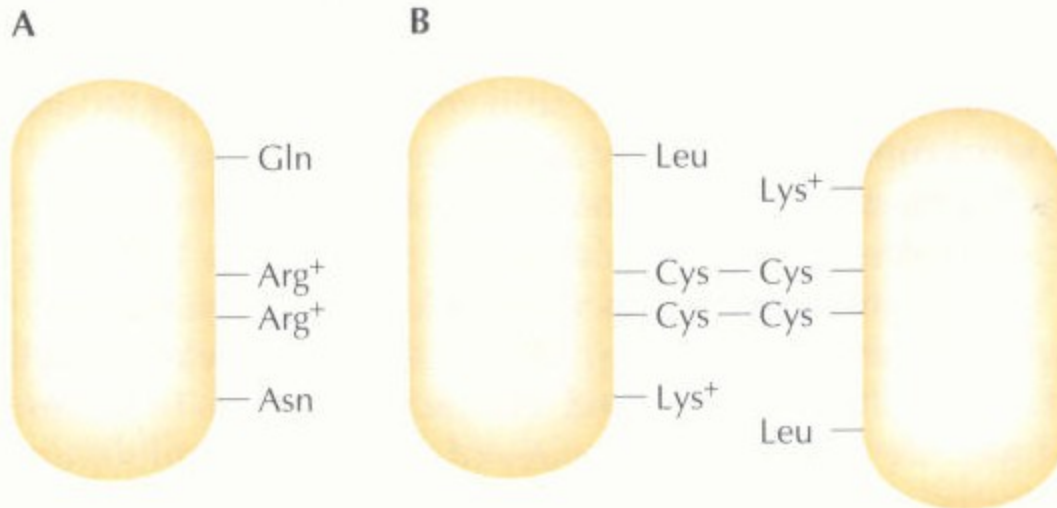
Engineered protein

Disulfidické vazby se dají se využít

- i k jiným účelům (např. příprava dimerické RNázy)
- Která se dobře renaturuje z inkusních tělísek

Příprava dimerické pankreatické RNázy (Glick a spol.2003)

Figure 8.14 Schematic representation of native monomeric human pancreatic RNase (**A**) and engineered dimeric human pancreatic RNase (**B**). The native protein was modified by changing glutamine 28 to leucine, arginine 31 to cysteine, arginine 32 to cysteine, and asparagine 34 to lysine. The monomeric enzyme is approximately 13.6 kilodaltons (kDa) while the dimeric form is approximately 27.2 kDa.



Renaturace dimerické RNázy izolované z inkluzních tělísek (Glick a spol.2003)

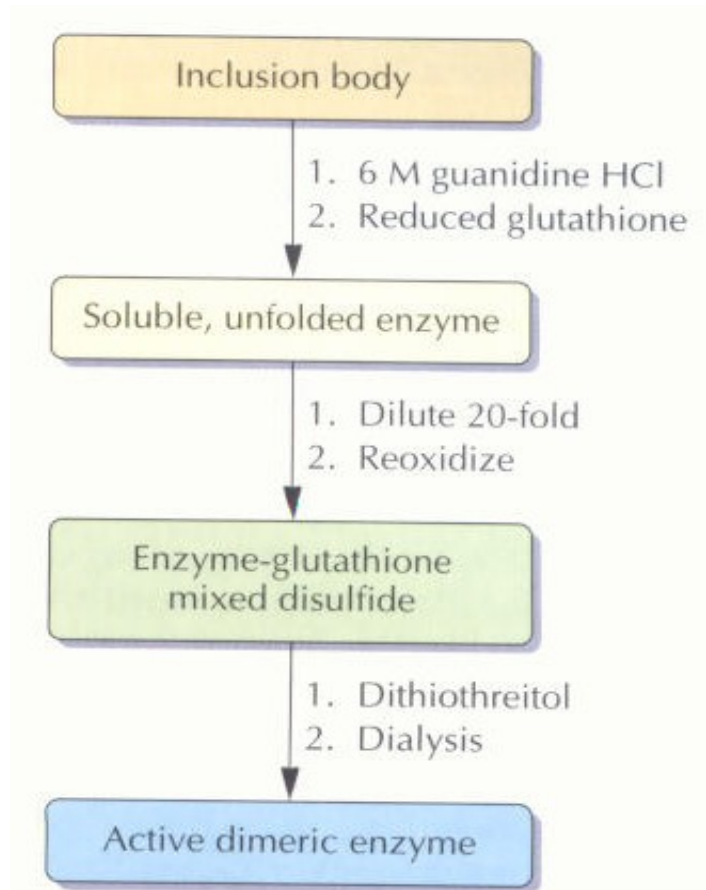


Figure 8.15 Flowchart showing the solubilization and renaturation of the dimeric human pancreatic RNase from *E. coli* inclusion bodies.

- 8.11.2011

Získání nejlepší varianty proteinu

- Nemusí být jednoduché
- Musí se hledat zkusmo
- Využívá se predikce struktury proteinu modelováním s využitím výpočetní techniky

Využívají se různé záměny aminokyselin

- které vedou
- ke zvýšení stability proteinu za vyšší teploty
- K odolnosti vůči proteolýze
- K omezení tvorby dimerů (když jsou nežádoucí)

Záměna asparaginu za jinou aminokyselinu

- Za vyšší teploty podléhají deaminaci asparagin a glutamin za vzniku kyseliny asparagové a glutamové
- Tyto změny obvykle vedou ke ztrátě aktivity enzymu
- Proto se asp a glu zaměňují za jiné AK
- Např. u enzymu triosofosfátisomerázy

V případě enzymu triosofosfátisomerázy vedla záměna asp
a glu

- K zvýšení termostability
- K odolnosti vůči proteolýze

Snížení počtu sulfhydrylových skupin záměnou cysteinu za serin

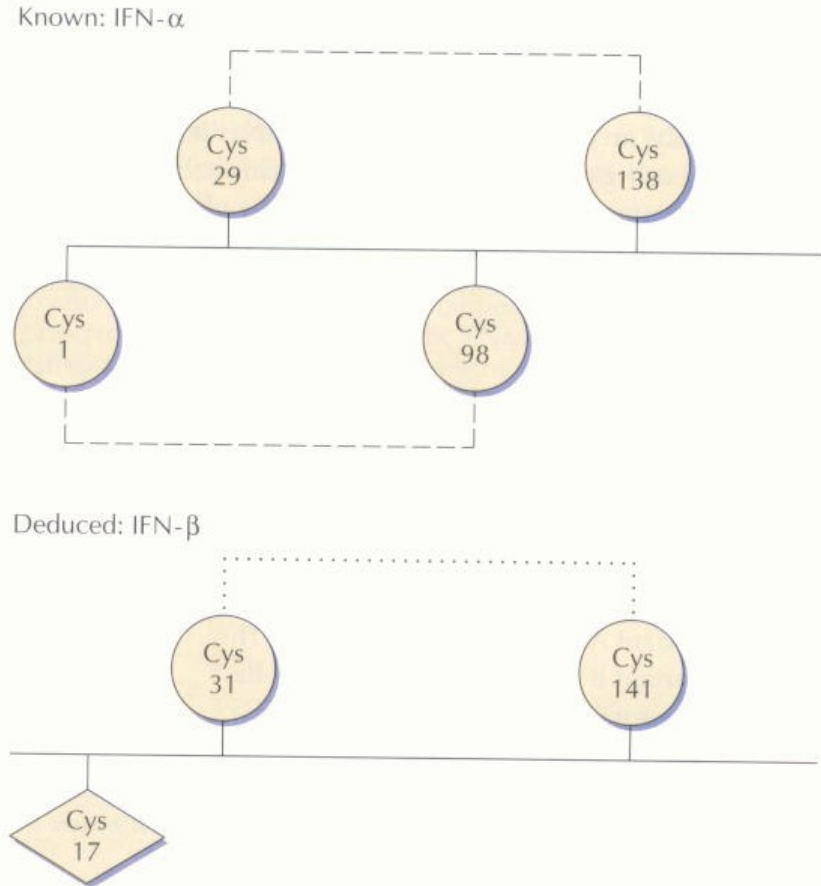
- Vedlo ke zvýšení aktivity proteinu a ke zvýšení jeho stability při dlouhodobém uchovávání
- Při produkci lidského beta-interferonu v *E. coli*

V *E. coli* měl protein interferon beta

- pouze 10% aktivitu
- díky tvorbě inaktivních dimerů díky cys
- Využilo se toho, že ser a cys jsou strukturně identické molekuly
- Záměnou cys za ser došlo k omezení tvorby dimerů
- A zvýšení aktivity proteinu

Omezení tvorby dimerů záměnou cys za ser (Glick a spol.2003)

Figure 8.16 Positions of the cysteine residues and disulfide bonds of IFN- α and IFN- β . The known intramolecular disulfide bond in IFN- α is indicated by a dashed line, and the deduced intramolecular disulfide bond in IFN- β is indicated by a dotted line.



Přímé zvyšování enzymové aktivity

- Vyžaduje znalost geometrie aktivního místa enzymu
- Může se modifikovat specifita vazby enzymu na substrát
- Např. u enzymu tyrosyl-tRNA syntetáza *Bacillus staerothermophilus*

Zvyšování enzymové aktivity (Glick a spol.2003)

Table 8.4 Aminoacylation activity of native (Thr-51) and modified (Ala-51 and Pro-51) tyrosyl-tRNA synthetases

Enzyme	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)
Thr-51	4.7	2.5	1,860
Ala-51	4.0	1.2	3,200
Pro-51	1.8	0.019	95,800

Adapted from Wilkinson et al., *Nature* 307:187–188, 1984.

The units for K_m , the binding constant of the enzyme for ATP, are millimolar units (mM); the units for k_{cat} , the catalytic rate constant, are reciprocal seconds (s^{-1}); and the units for k_{cat}/K_m , the catalytic efficiency, are $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$.

V biotechnologii můžeme využívat

- I geny organismů, které neumíme kultivovat
- Využívají se k tomu poznatky metagenomiky

Metagenomika

- Metagenomika: aplikace genomiky na nekultivovatelné mikroorganismy
- Nekultivovatelných mikroorganismů je většina (99%) a jsou potenciálním zdrojem průmyslově využitelných enzymů
- Geny kódující tyto enzymy můžeme klonovat, aniž bychom kultivovali organismus
- (Genomika: vědní oblast molekulární biologie zabývající se molekulární organizací a strukturou genomu)

Z určitého vzorku

- půda, gastrointestinální trakt, žaludek přežvýkavců, mraveniště termitů, vzorky sedimentů, mořská voda, nafta, potraviny, bioreaktory
- můžeme izolovat DNA (bez kultivace buněk) a tu analyzovat

Metagenom

- Izolované genomy (DNA) všech organismů v určitém vzorku prostředí v určité době

Postupy metagenomové analýzy

- Izolace DNA ze vzorků prostředí a její štěpení nukleázami
- Klonování DNA ve vhodném vektoru (plasmidy, kosmidy, BAC vektory)
- Transformace do odpovídajících buněk *E. coli* a konstrukce **metagenomové banky (knihovna)**
- Sekvenční analýza klonů
- Vyhledávání v databázích – *in silico* analýza
- Funkční analýza klonů

Knihovna metagenomová

- Soubor klonovaných fragmentů připravených štěpením DNA izolované z určitého vzorku prostředí v určité době

Obr. Konstrukce a skríníng metagenomové knihovny

- Obr.

Metoda CIP

- K odlišení populace metabolicky aktivních a neaktivních buněk