

Πρωτεϊνική Μηχανική

Έκθεση στην επιφάνεια
για έργα πρωτεϊνικής εξέλιξης

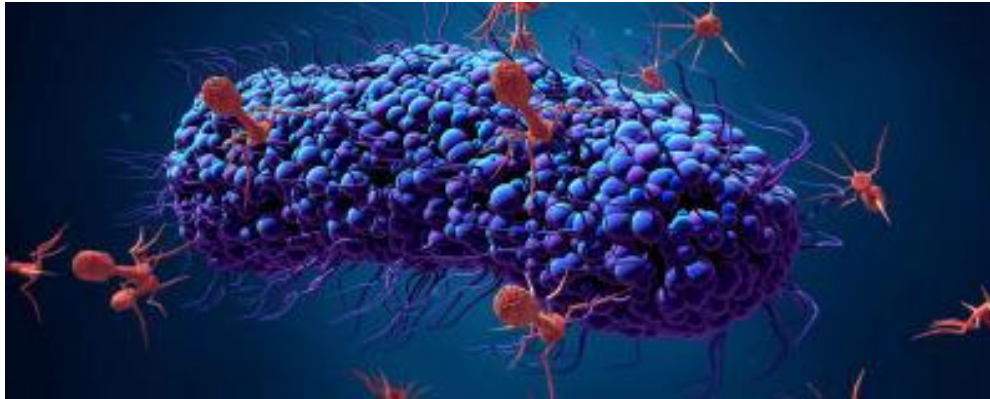
Ιωάννης Παυλίδης
Τμήμα Χημείας | Πανεπιστήμιο Κρήτης

E-mail: ipavlidis@uoc.gr

Τηλ.: +30 2810 54-5130 | Γραφείο Γ211

[HTTP://WWW.CHEMISTRY.UOC.GR/PAVLIDIS/](http://www.chemistry.uoc.gr/pavlidis/)

Έκθεση σε φάγους

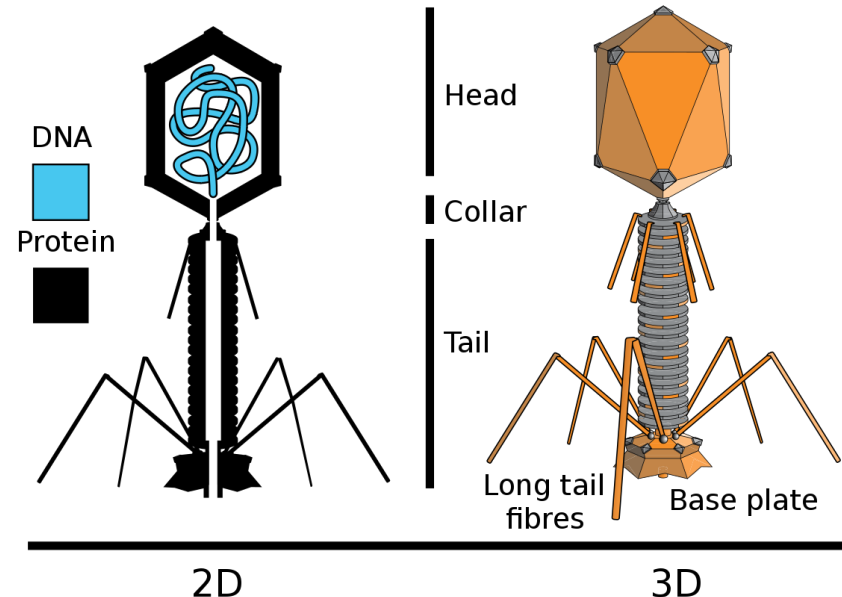


Τροποποίηση του γενετικού υλικού
ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών
και έκθεση τους στην επιφάνεια
των καψιδίων

Φάγος:

ιός που προσβάλλει βακτήρια

Μικρό γενετικό υλικό
Καψίδιο - πρωτεΐνες σχετικές με
τη διαδικασία μόλυνσης



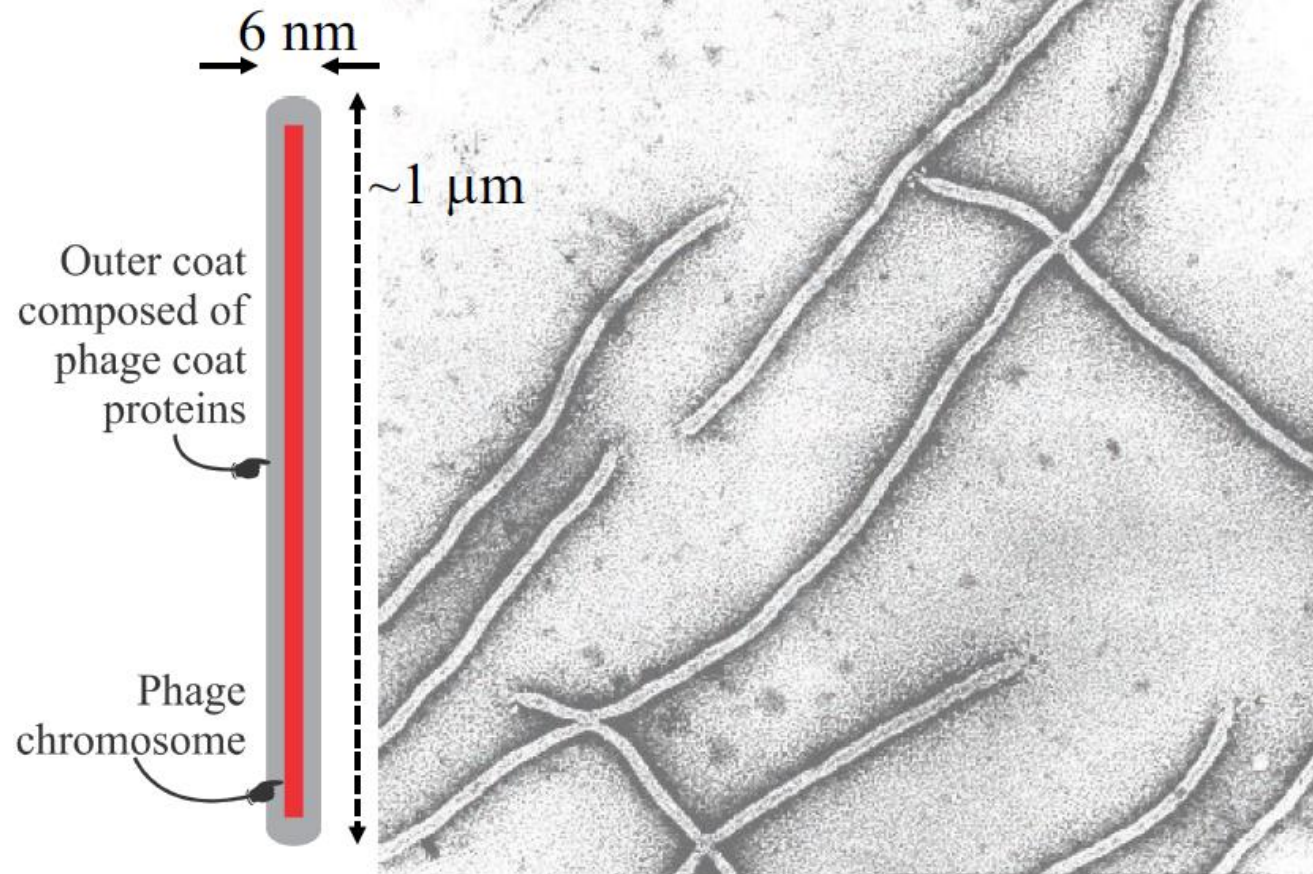
Πλεονεκτήματα μεθόδων έκθεσης

- Υψηλή ρυθμοαπόδοση - μεγάλες βιβλιοθήκες
- Παράλειψη βημάτων διάτρισης ή λύσης κυττάρων (και καθαρισμού πρωτεϊνών)
- Αποφυγή προβλημάτων διάχυσης υποστρωμάτων / προϊόντων
- Εύκολη αλλαγή παραμέτρων (pH, ιοντική ισχύς) σε σχέση με κυτταροπλασματικά ένζυμα
- Άμεση συσχέτιση γονοτύπου με φαινότυπο (δυσκολία με ενζυμικές αντιδράσεις)

Φάγος M13

Πρώτη εργασία με phage display από τον Smith (1985)

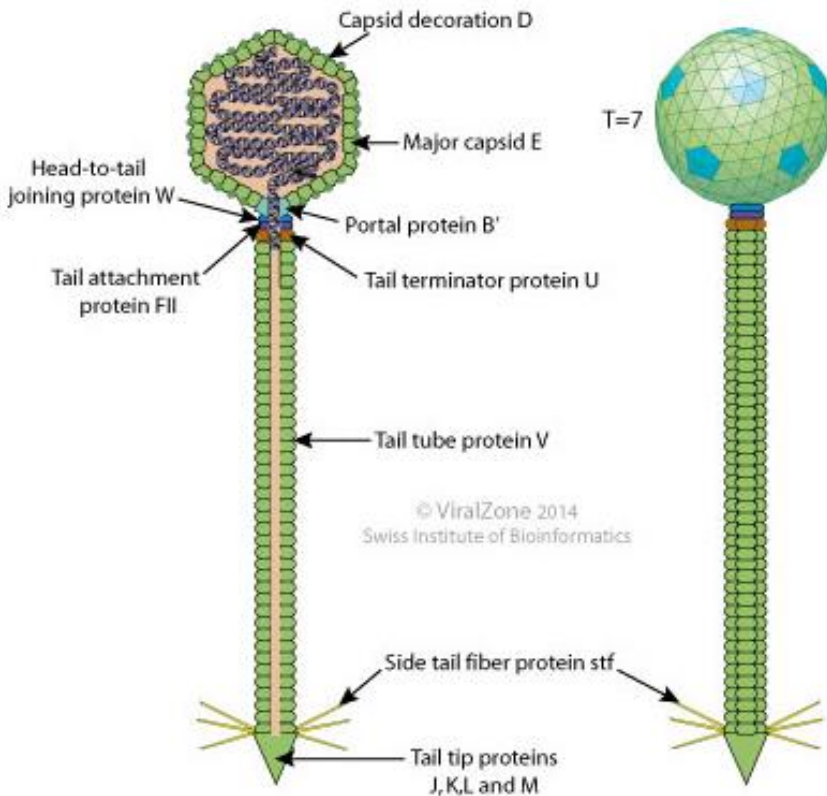
Filamentous phage



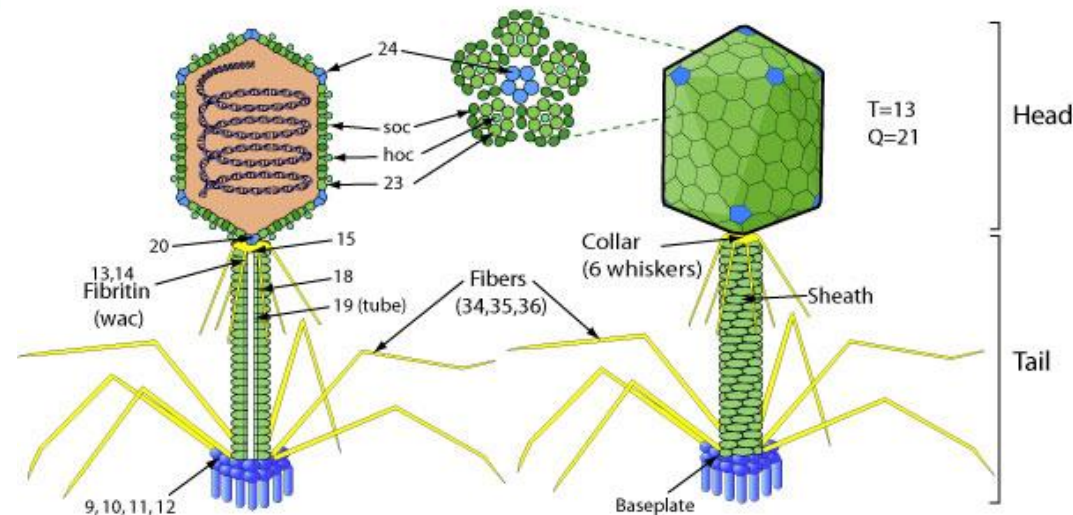
Φάγοι ειδικοί για *E. coli*

1998 Enterobacteria phage λ

1998



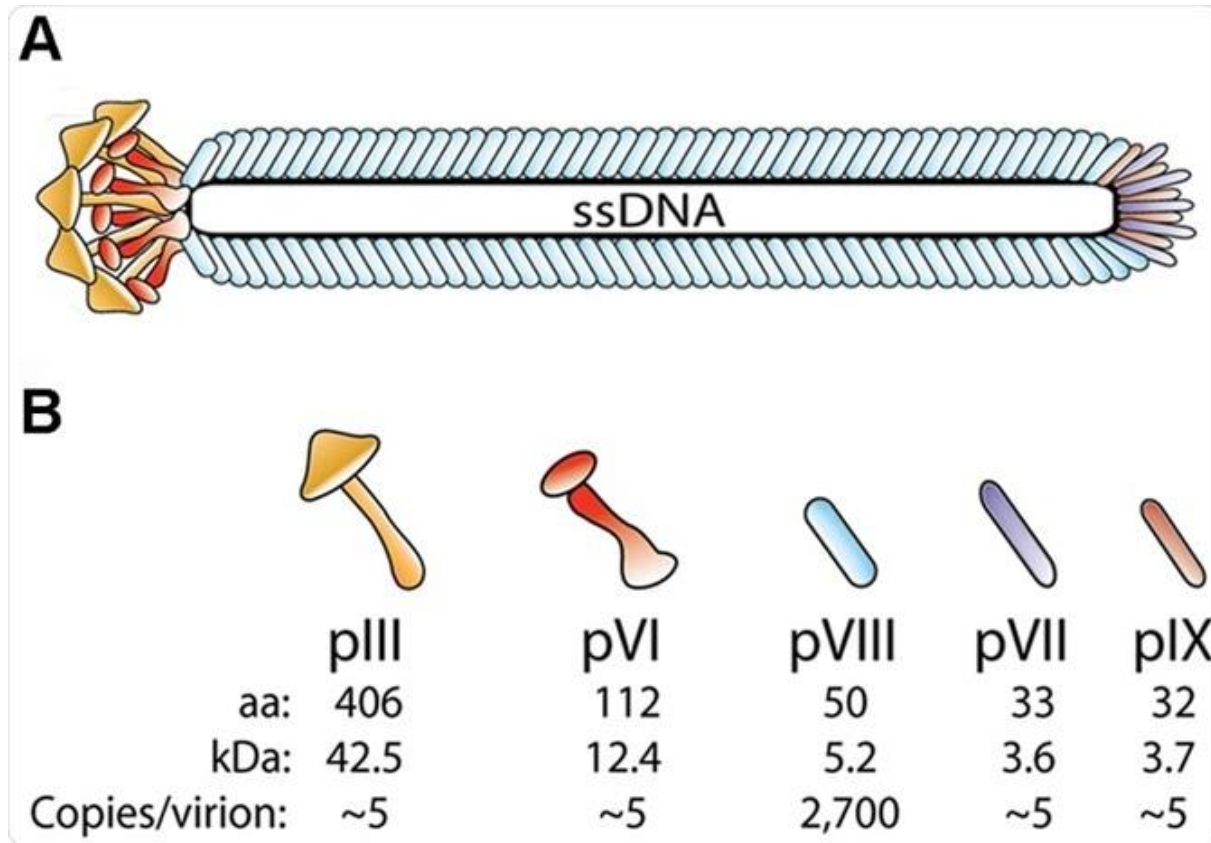
Enterobacteria phage T4



Έκθεση σε φάγους

1. Δημιουργία μεταλλαγμάτων σε επίπεδο DNA
2. Επιμόλυνση βακτηρίων για την ανασύσταση των φάγων
3. Μελέτη των ιδιοτήτων των ετερολόγων πρωτεϊνών
(αλληλεπίδραση με άλλη πρωτεΐνη ή μικρό μόριο, καταλυτική δραστηριότητα κτλ)
4. Επιλογή των καλύτερων φάγων και απομόνωση του DNA τους
5. Αλληλούχιση για την εύρεση των μεταλλάξεων που προσδίδουν την επιθυμητή ιδιότητα
6. Μεταφορά γονιδίου σε άλλο βέκτορα για έκφραση σε βακτηριακό ή ευκαρυωτικό σύστημα

Φάγος M13 (filamentous phage)



Ποιες πρωτεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν;



pIII



pVI



pVIII



pVII

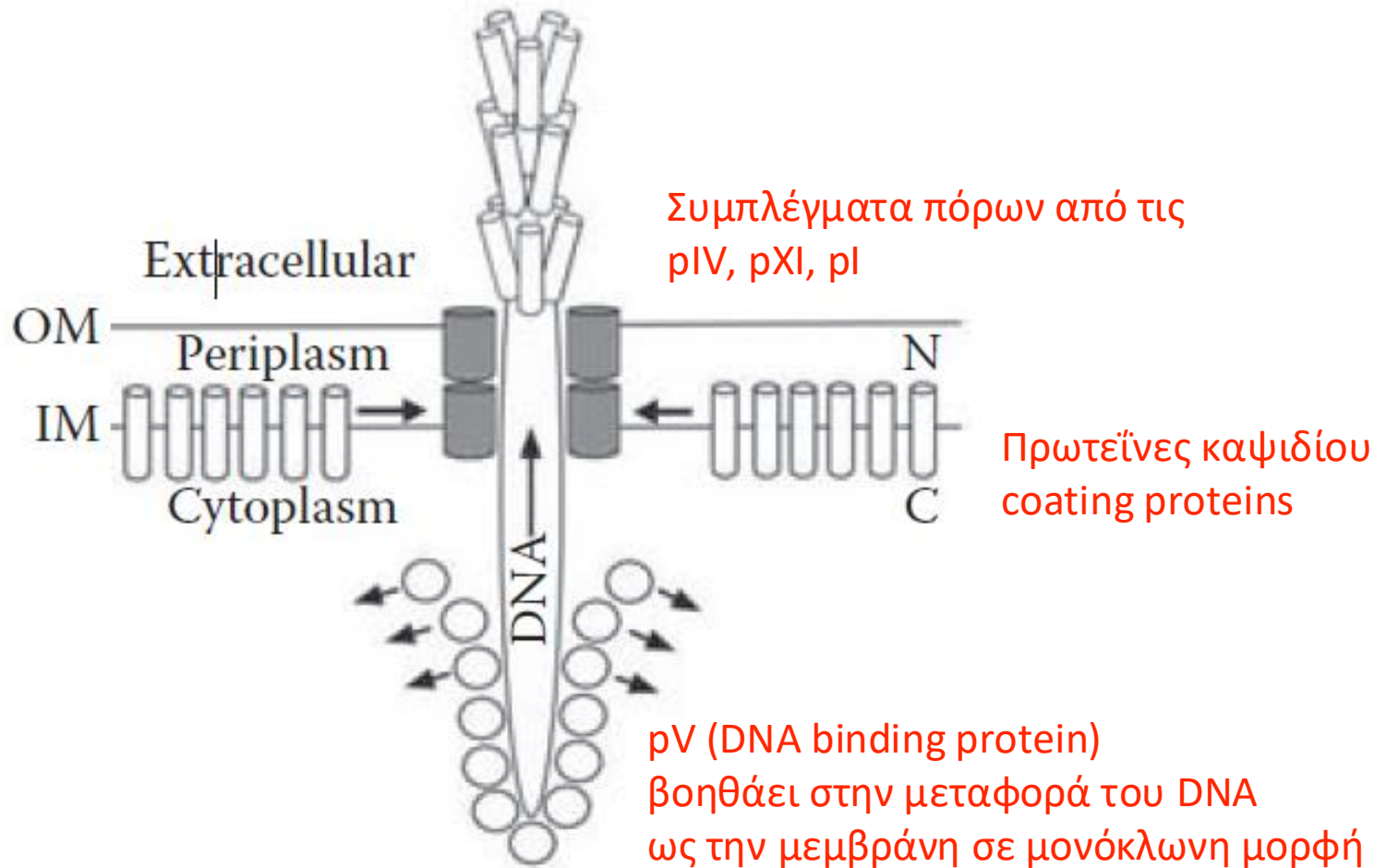


pIX

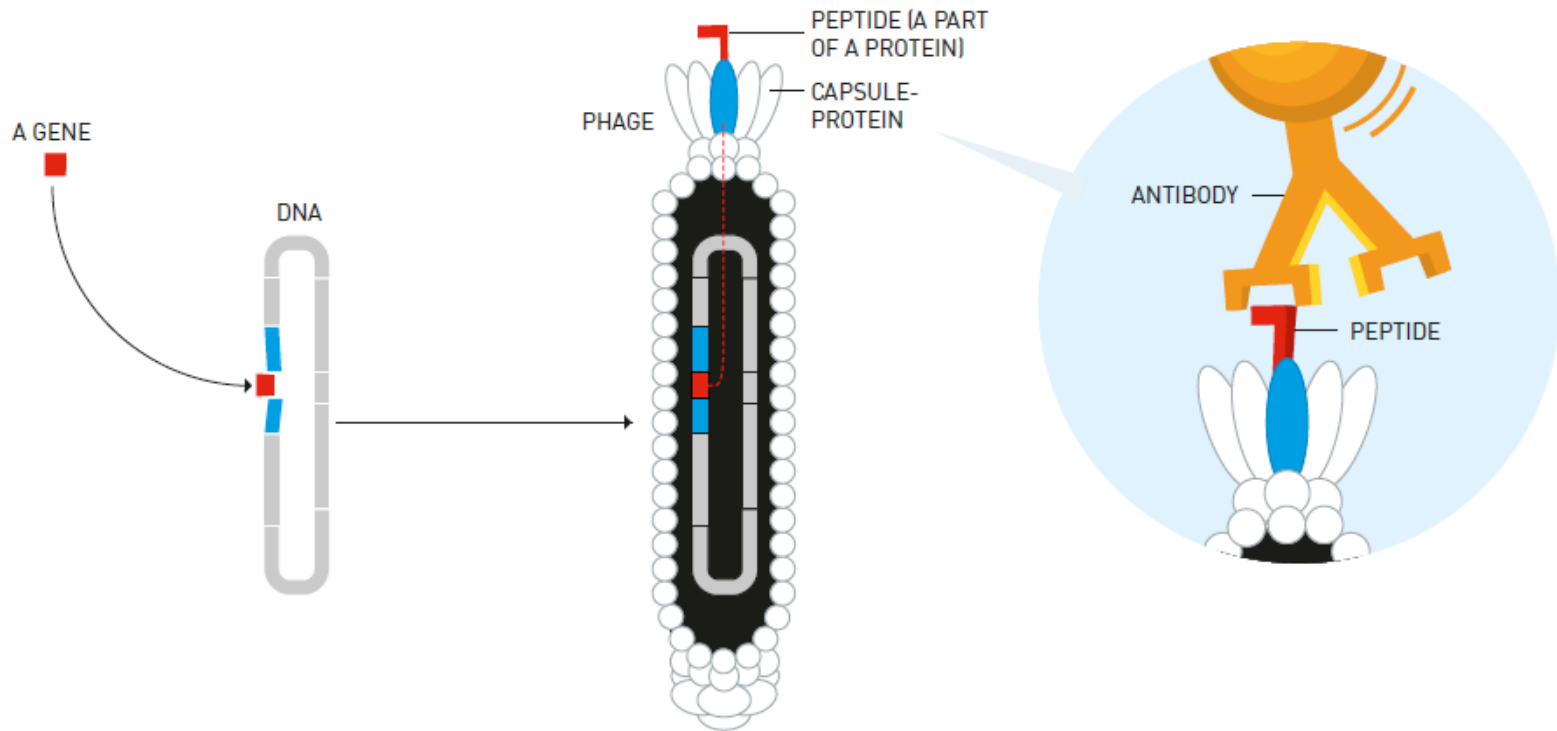
Protein	Number of amino acids	Molecular weight	Copies per phage	Type of display
pIII	406	42,500	5	N or C
pVI	112	12,300	5	C
pVII	33	3,600	5	N
pVIII	50	5,200	~2700	N or C
pIX	32	3,600	5	N

Θέλουμε περισσότερα ή λιγότερα αντίγραφα;

Ανασύσταση του φάγου - Μη λυτικός κύκλος



Γενετικός χειρισμός



1 Smith introduced a gene into the gene for a protein in the phage's capsule. The phage DNA was then inserted into bacteria that produced phages.

2 The peptide produced from the introduced gene ended up as part of the capsule protein on the surface of the phage.

3 Smith was able to fish out the phage using an antibody designed to attach to the peptide. As a bonus, he got the gene for the peptide.

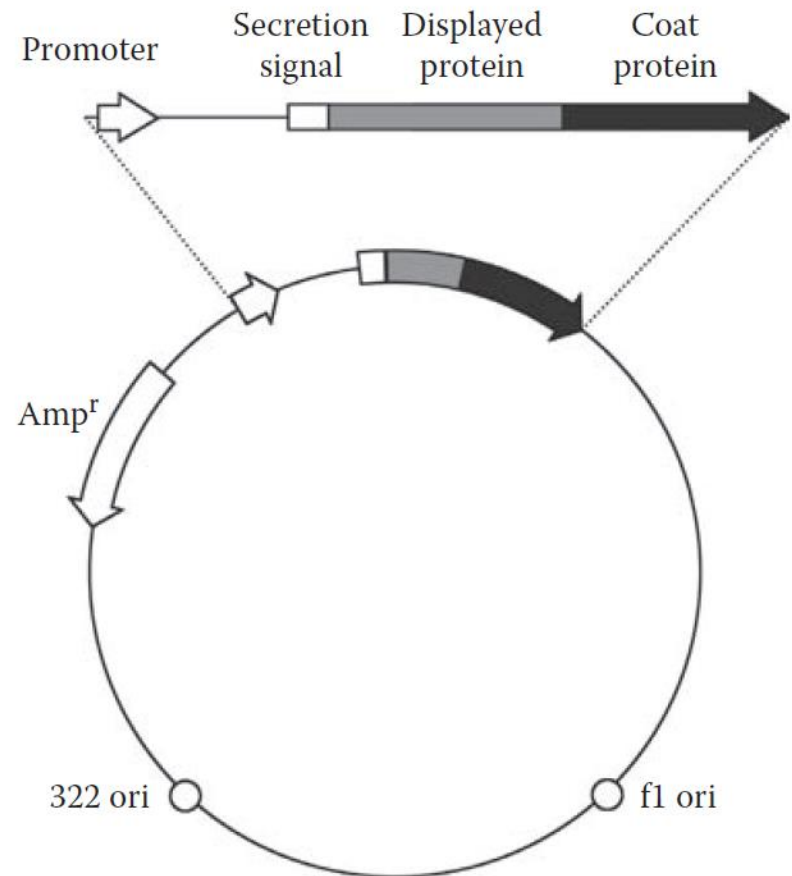
Phagemids

dsDNA

έχει την ικανότητα να γίνεται ssDNA

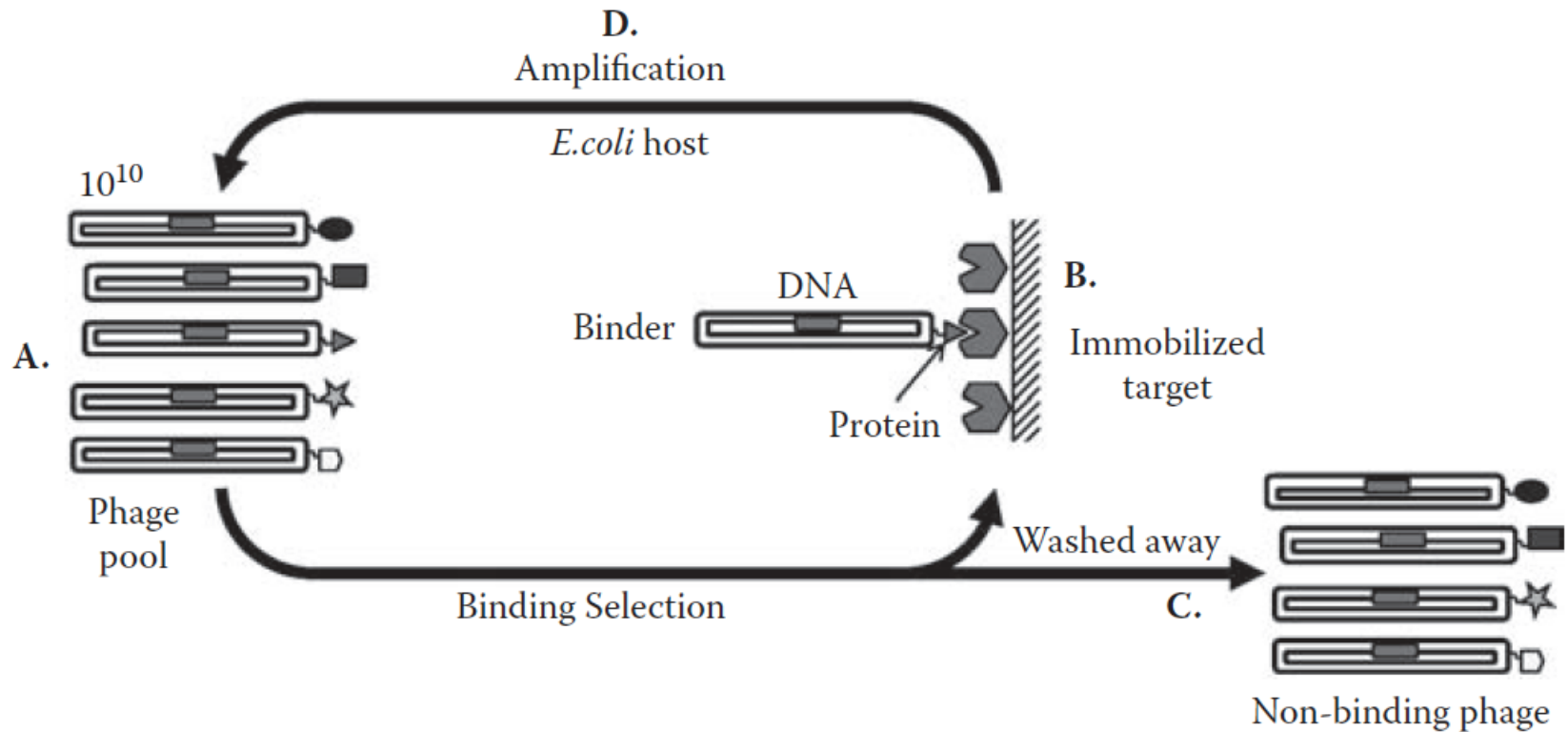
- Δείκτη επιλογής (σε αντιβιοτικό)
- ori βακτηριακού (dsDNA) και φάγου (ssDNA)
- σηματοδοτική αλληλουχία για το πακετάρισμα στα καψίδια
- γονίδιο ενδιαφέροντος

Απαιτούνται βοηθητικοί φάγοι που θα κωδικοποιούν τις υπόλοιπες πρωτεΐνες



Χρειάζεται το secretion signal σε όλες τις περιπτώσεις;

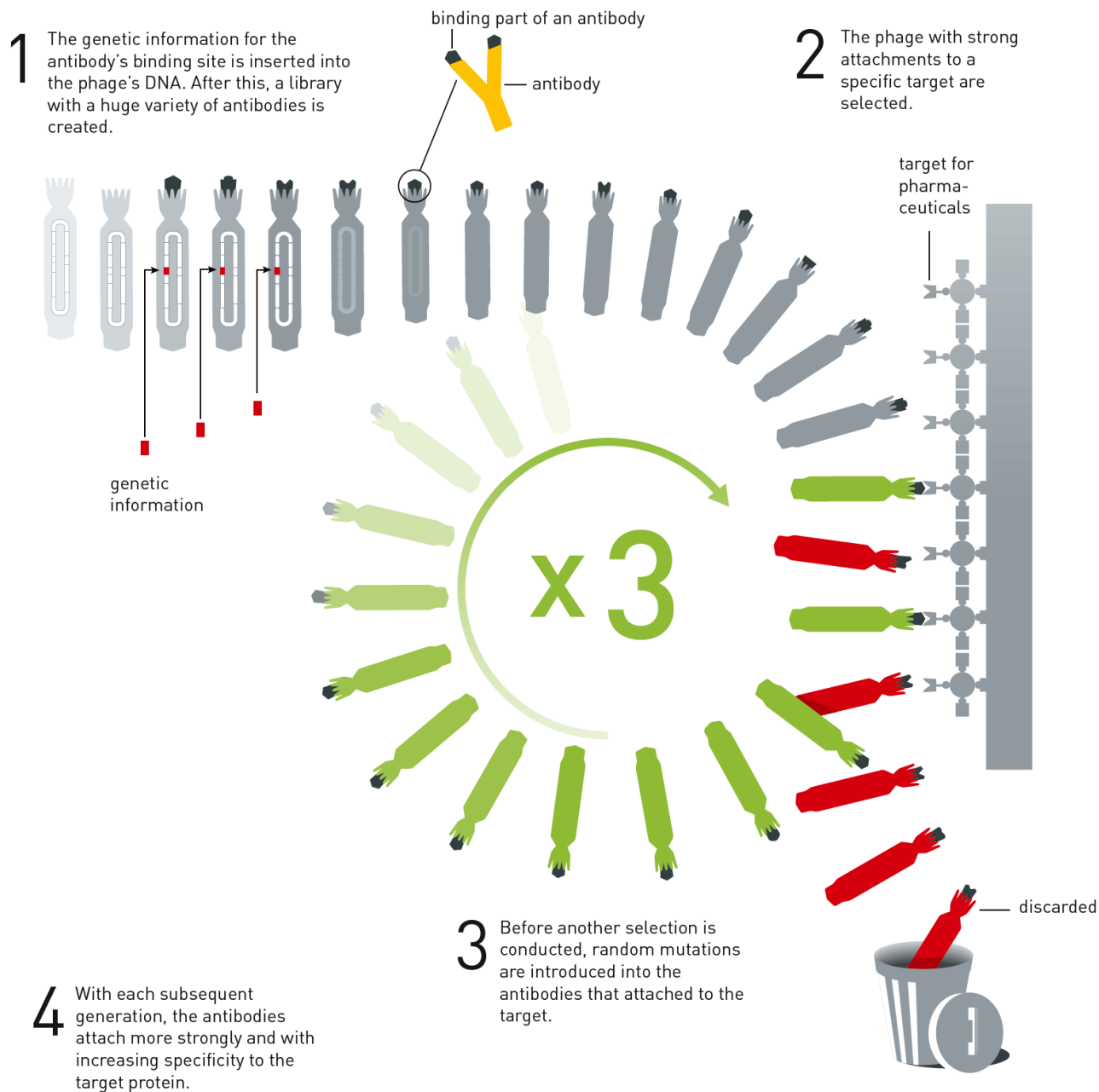
Διαλογή



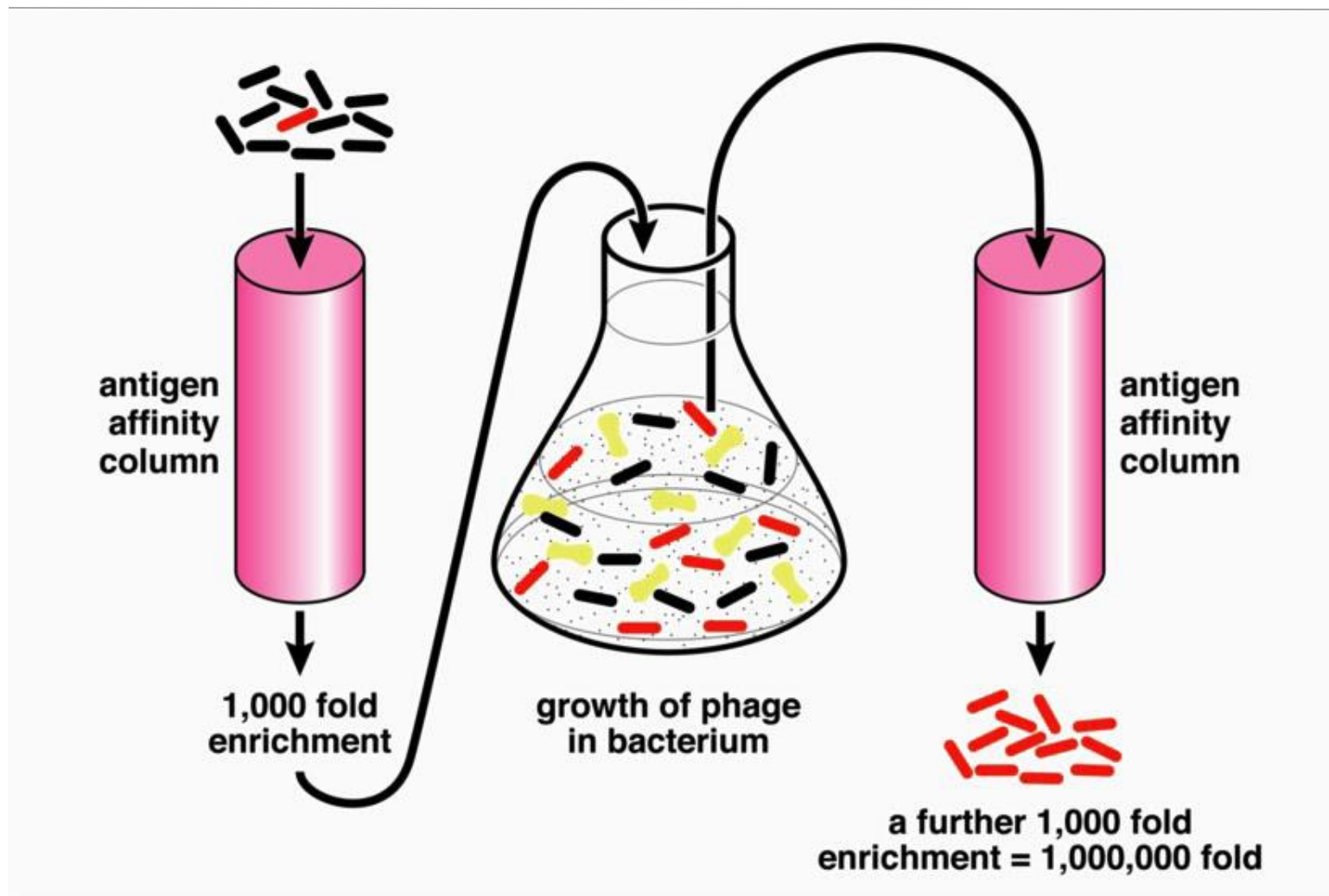
Πιθανά τεχνικά θέματα με την ακινητοποίηση του παράγοντα αλληλεπίδρασης

1. Ομοιόμορφη κατανομή;

2. Η επιφάνεια αλληλεπίδρασης είναι διαθέσιμη (και όπως στην ελεύθερη μορφή);



Διαλογή φάγων



Μέγεθος βιβλιοθηκών

10^{15} φάγοι

250 εκατομμύρια κλώνοι με διαφορετική πρωτεΐνη εκτεθειμένη στην επιφάνεια του

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάφορα προβλήματα - στόχους

- Αυξημένη συγγένεια (αντισώματα)
- Εύρεση αναστολέων και μηχανισμού δράσης τους
- Βελτίωση της σταθερότητας και της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών
- Δημιουργία νέων θέσεων πρόσδεσης (de novo design) σε πρωτεϊνικές μήτρες



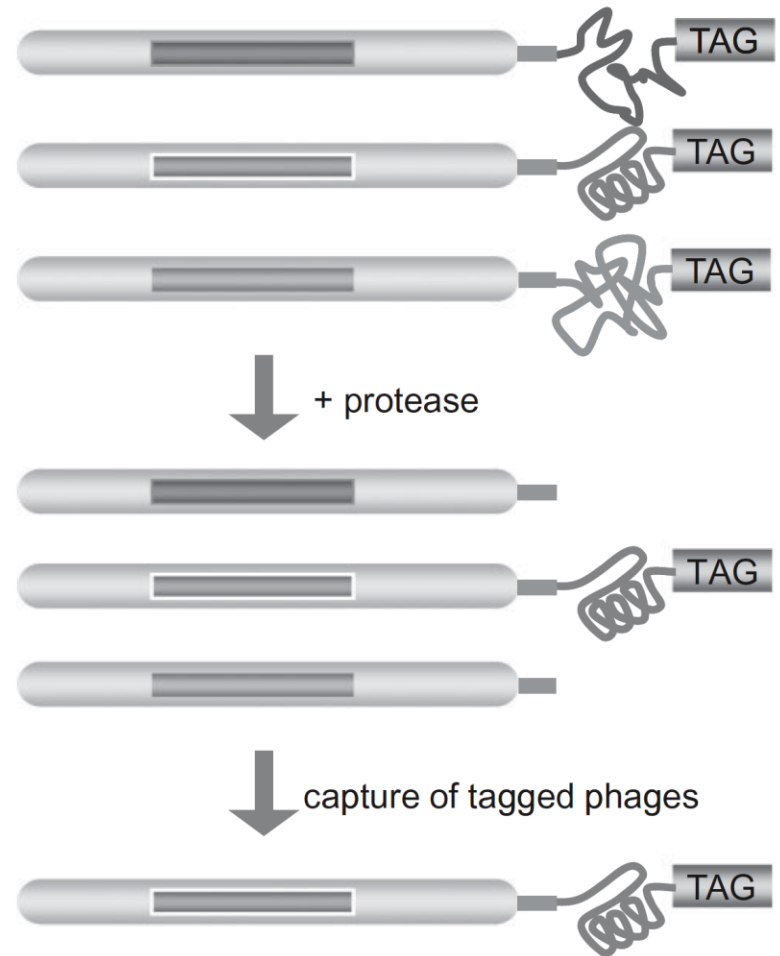
Βελτίωση αναδίπλωσης

Σημαντικό χαρακτηριστικό για την επιτυχία της έκθεσης είναι η σωστή αναδίπλωση.

Καλύτερη αναδίπλωση - καλύτερο πακετάρισμα - σταθερότητα σε πρωτεάσες

Ο φάγος M13 είναι σταθερός σε αρκετές πρωτεάσες

Χρήση της pIII και των υπομονάδων της για συσχέτιση σταθερότητας και λειτουργικότητας



Σταθεροποίηση

Η ίδια αρχή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την βελτίωση της σταθερότητας των πρωτεϊνών (ενζύμων) σε:

- Πρωτεάσες
- Αποδιατακτικούς παράγοντες σε υψηλές συγκεντρώσεις (ουρία ως 10 M, γουανιδίνιο ως 4 M)
- Αναγωγικούς παράγοντες
- Οργανικούς διαλύτες (DMF ως 50%)
- Ακραίο pH (από 2 έως 12)

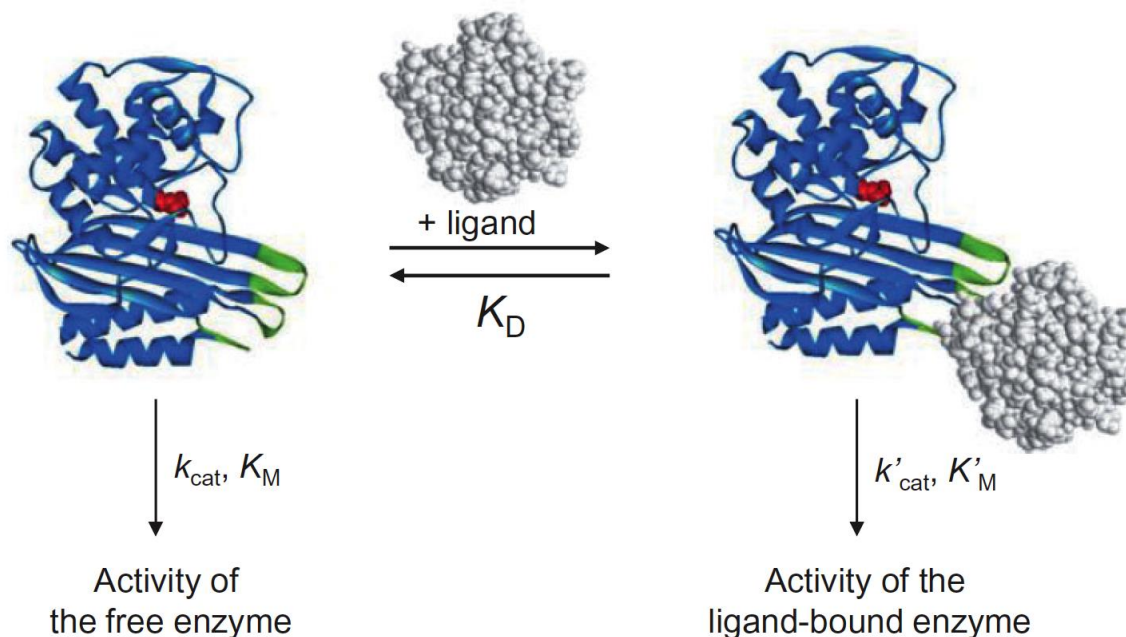
Για την σταθεροποίηση η μέθοδος επιλογής σε σχέση με τον ορθολογικό σχεδιασμό.

Αλλαγή αλλοστερικής ρύθμισης

Δημιουργία τεχνικών αλλοστερικών θέσεων ρύθμισης

Συγγένεια προς πρωτεΐνες, μεταλλικά ιόντα ή μικρά μόρια

Επιλογή για ένζυμα που προσδένονται, δε γνωρίζουμε / επιλέγουμε με κάποια προτίμηση (ενεργοποιητή / αναστολέα)

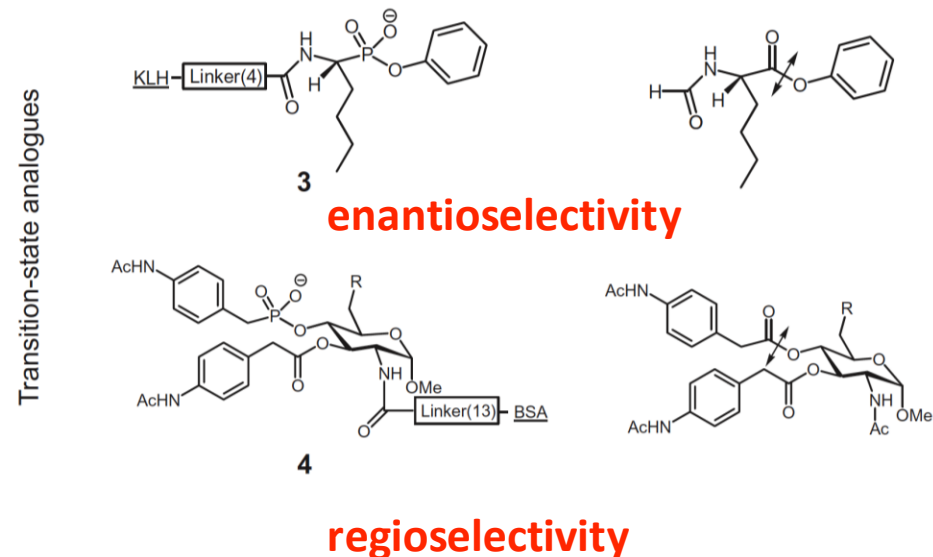
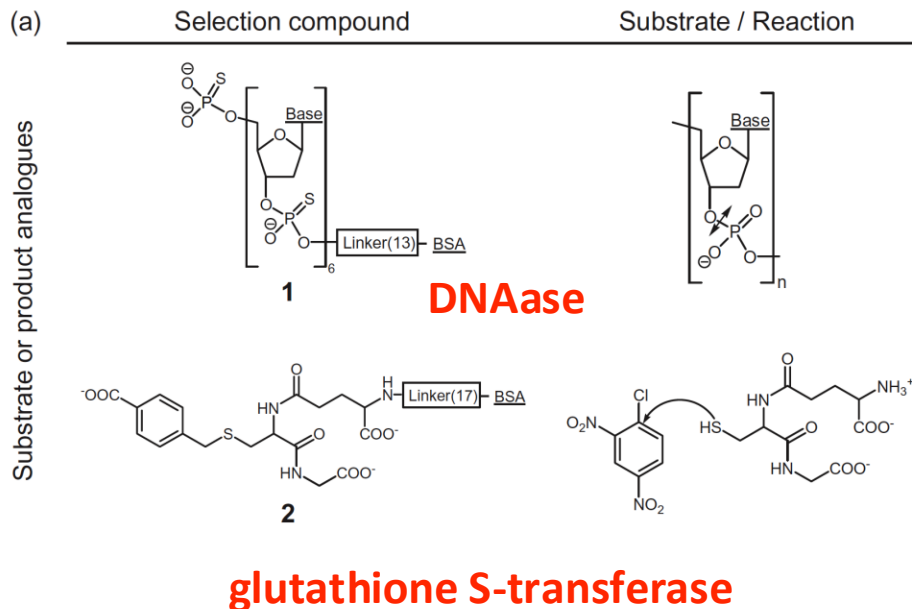


Βελτιώνοντας την καταλυτική δραστικότητα

Δύσκολος στόχος: σύνδεση της καταλυτικής δράσης με την δέσμευση ενός φάγου (δυσκολία σύνδεσης γονότυπου - φαινότυπου)

Στρατηγικές:

1) Δέσμευση ανάλογου S, P ή ενδιάμεσου

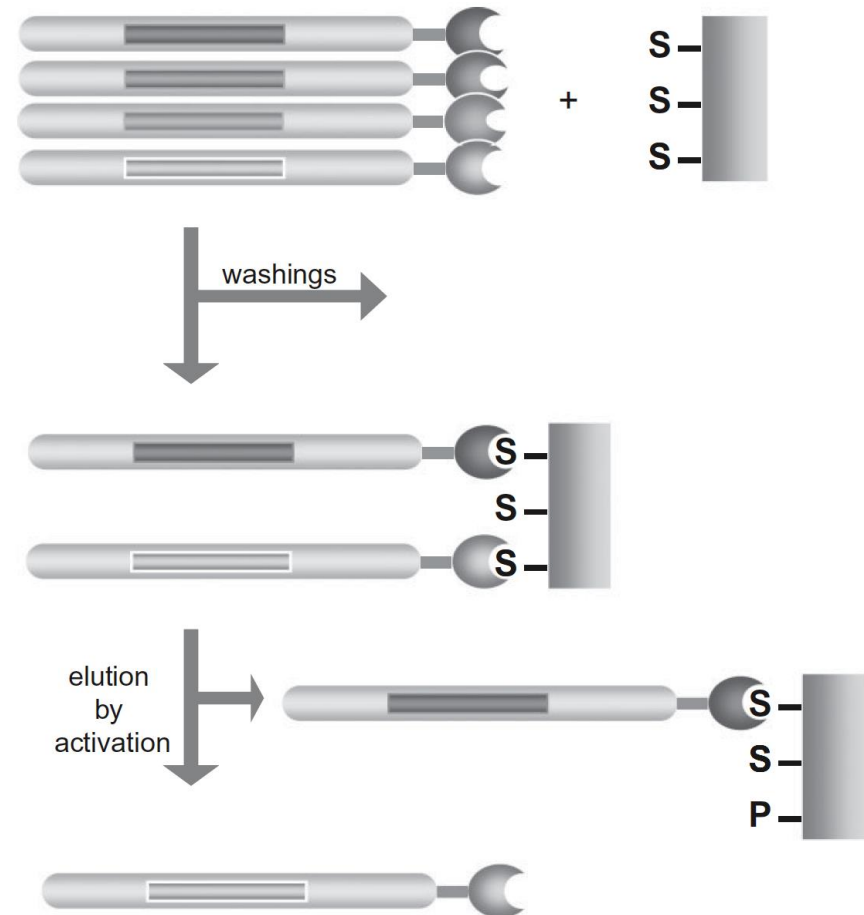


Βελτιώνοντας την καταλυτική δραστηριότητα

Δύσκολος στόχος: σύνδεση της καταλυτικής δράσης με την δέσμευση ενός φάγου

Στρατηγικές:

2) Δέσμευση υποστρώματος σε μεταλλοπρωτεΐνη απουσία μετάλλου ή σε αποένζυμο απουσία συμπαραγόντα

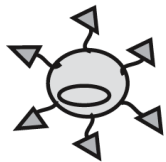


Έκθεση σε κύτταρα

1. Create DNA library

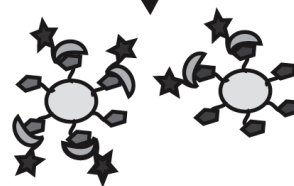
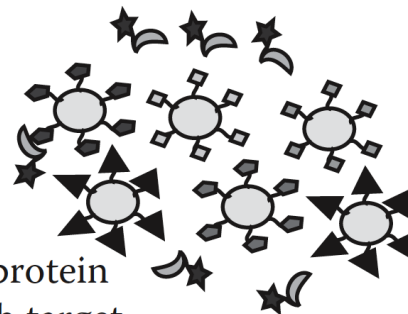


2. Transform into host and induce protein display



Repeat screening

3. Incubate displayed protein library with target



4. Screen for variants that bind target

5. Propagate isolated variants



6. Recover clones and sequence DNA

ACTGATCTCATGACCC
ACTGACCCCATCACCC
ACGGACCTCATGACCC

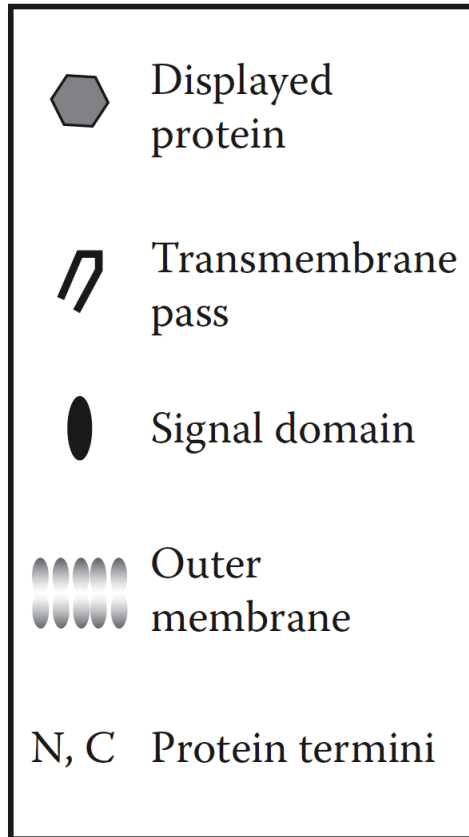
7. Test individual variants

Generate new DNA library

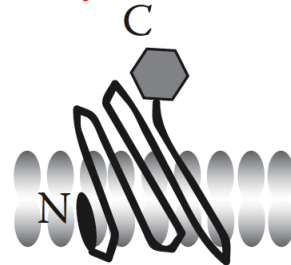


10^{11} κλώνοι στην βιβλιοθήκη
χιλιάδες πρωτεΐνες σε κάθε κύτταρο

Συστήματα βακτηριακής έκθεσης



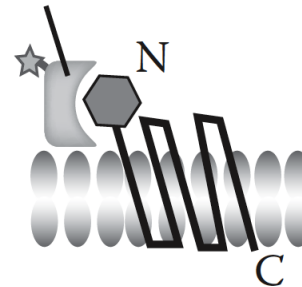
**Τοξική
έως 35kDa**



**A. Free C-terminus
(Lpp'OmpA)**

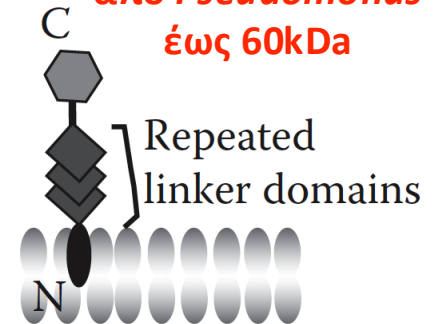
**Autotransporters
Ελεύθερο N-terminal**

Fluorescently labeled target

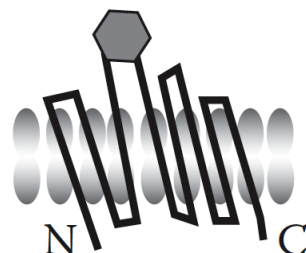


B. Free N-terminus

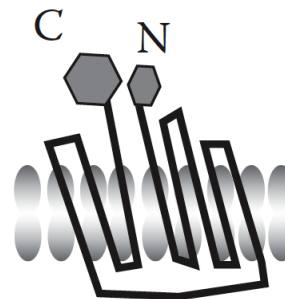
**Ice Nucleation Protein
από *Pseudomonas*
έως 60kDa**



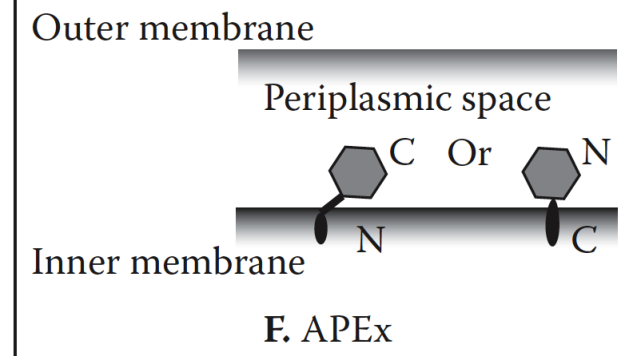
C. INP



D. Loop-grafted



**E. Dual display
(eCPX)**



OmpA - ολιγοπεπτίδια

OmpX με κυκλική μετάθεση - διμερή

Βακτηριακή έκθεση

Πλεονεκτήματα:

- + Εύκολος μετασχηματισμός (σε σχέση με ζύμες)
- + Μεγάλο μέγεθος βιβλιοθηκών (συγκρίσιμο με βιβλιοθήκες φάγων)

Μειονεκτήματα:

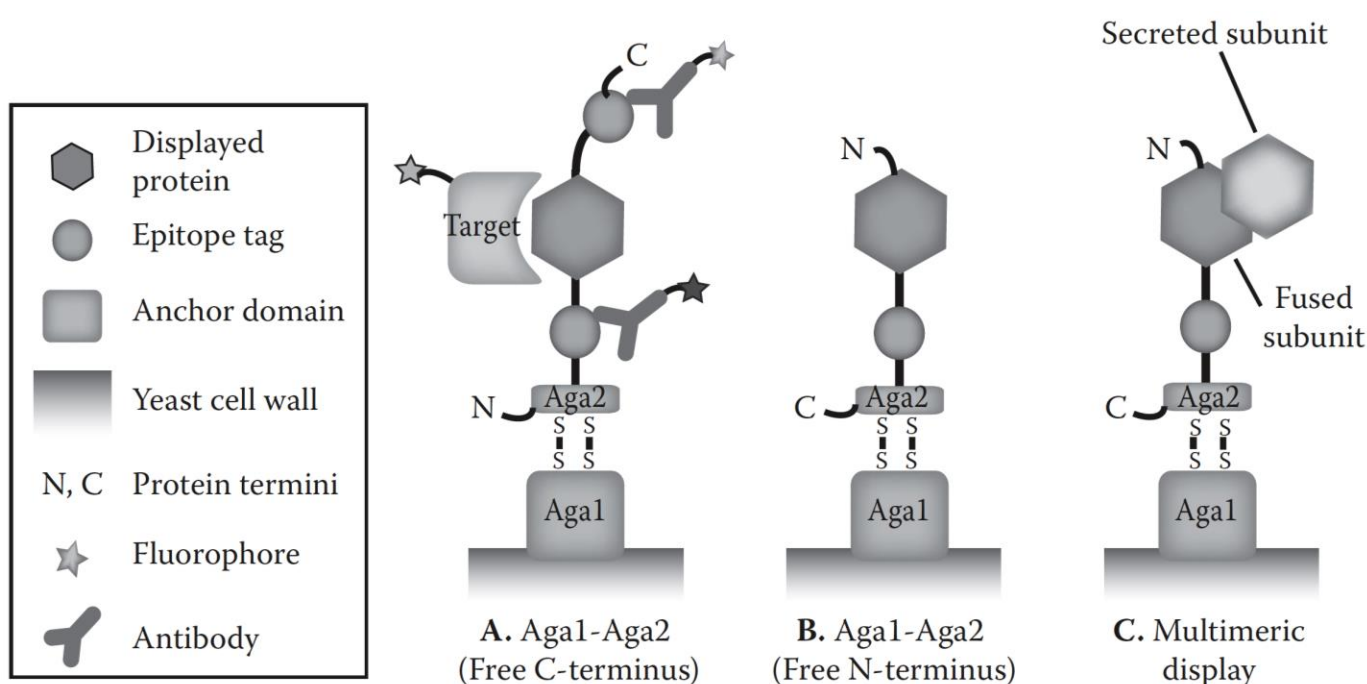
- Έλλειψη μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων
- Έλλειψη μηχανισμού ελέγχου σωστής αναδίπλωσης
- Τοξικότητα στα κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε ψευδή αρνητικά δείγματα
- Χαμηλότερη σταθερότητα από τις βιβλιοθήκες φάγου (υψηλές θερμοκρασίες έως 65°C, σταθερότητα σε χημικά)
- Ασταθής βιβλιοθήκη σε σχέση με φάγους οι οποίοι έχουν μικρό μέγεθος DNA, λιγότερα λάθη, όχι αντιγραφικοί παράγοντες στο καψίδιο

Έκθεση σε ζύμες

Κύρια συστήματα: *Saccharomyces cerevisiae* και *Pichia pastoris*

Aga1-Aga2 σύστημα το πιο χρησιμοποιούμενο

(Σύντηξη πρωτεΐνης ενδιαφέροντος με την Aga2 η οποία συνδέεται αργότερα με την Aga1 με δισουλφιδικούς δεσμούς)



Έκθεση σε ζύμες

Πλεονεκτήματα:

- + Καλύτερη ποιότητα βιβλιοθήκης
- + Έκφραση ευκαρυωτικών πρωτεϊνών με μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις
- + Βιβλιοθήκες μεγαλύτερων πρωτεϊνών

Μειονεκτήματα:

- Μικρότερο μέγεθος βιβλιοθήκης (10^7)
- Χαμηλότερη σταθερότητα από τις βιβλιοθήκες φάγου (υψηλές θερμοκρασίες έως 65°C , σταθερότητα σε χημικά)
- Ασταθής βιβλιοθήκη σε σχέση με φάγους οι οποίοι έχουν μικρό μέγεθος DNA, λιγότερα λάθη, όχι αντιγραφικοί παράγοντες στο καψίδιο

Επιπλέον βιβλιογραφία

Park & Cohran - Protein Engineering and Design - 2009:

1. Phage display systems for protein engineering
2. Cell surface display systems for protein engineering
3. Cell-free display systems for protein engineering

Bornscheuer & Lutz - Protein Engineering Handbook V1 and V2 - 2009:

24. Protein Engineering by phage display
26. Yeast surface display in protein engineering and analysis
27. In vitro compartmentalization (IVC) and other high throughput screens of enzyme libraries