

Πρωτεϊνική Μηχανική

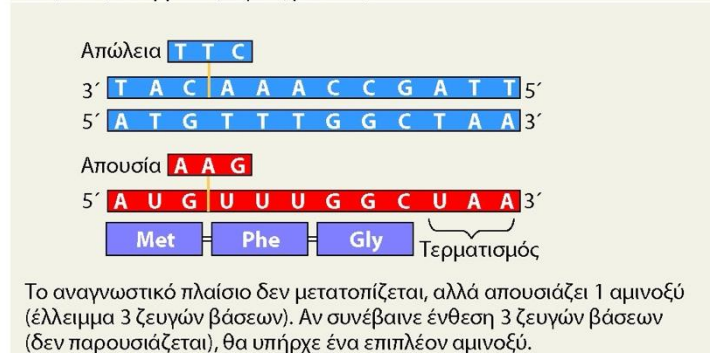
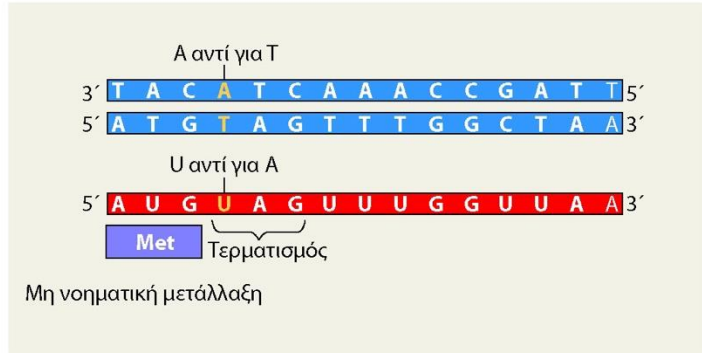
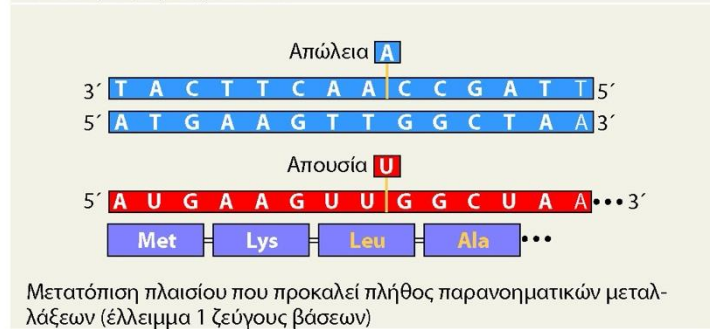
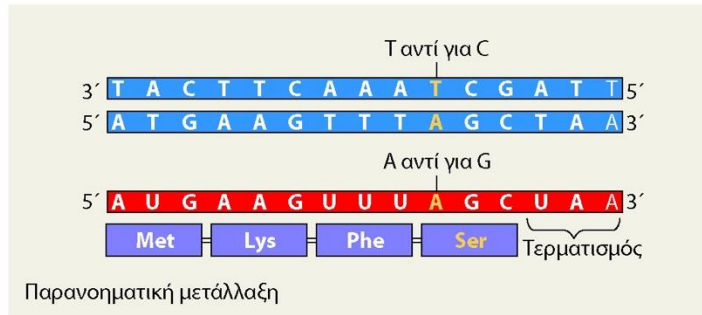
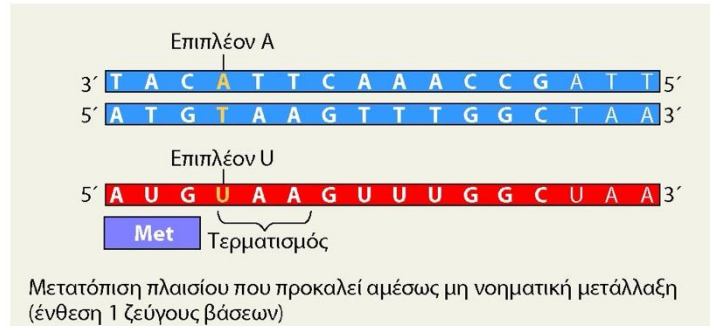
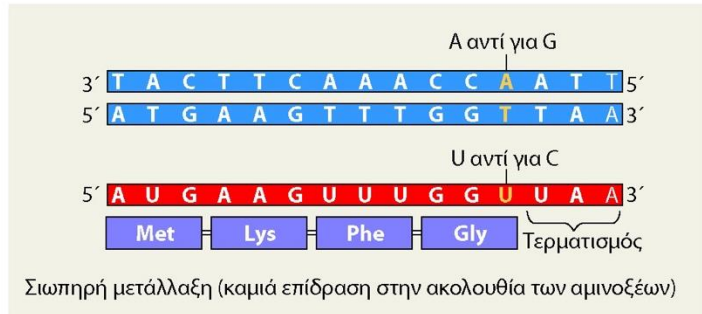
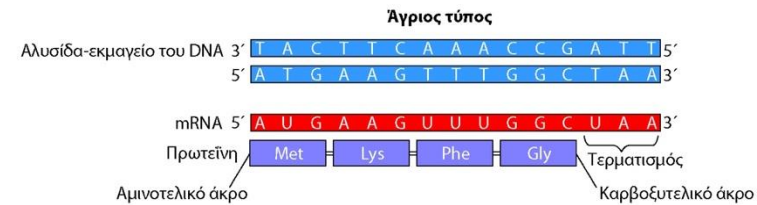
Ιωάννης Παυλίδης
Τμήμα Χημείας | Πανεπιστήμιο Κρήτης

E-mail: ipavlidis@uoc.gr

Τηλ.: +30 2810 54-5130 | Γραφείο Γ211

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

Τύποι μεταλλάξεων

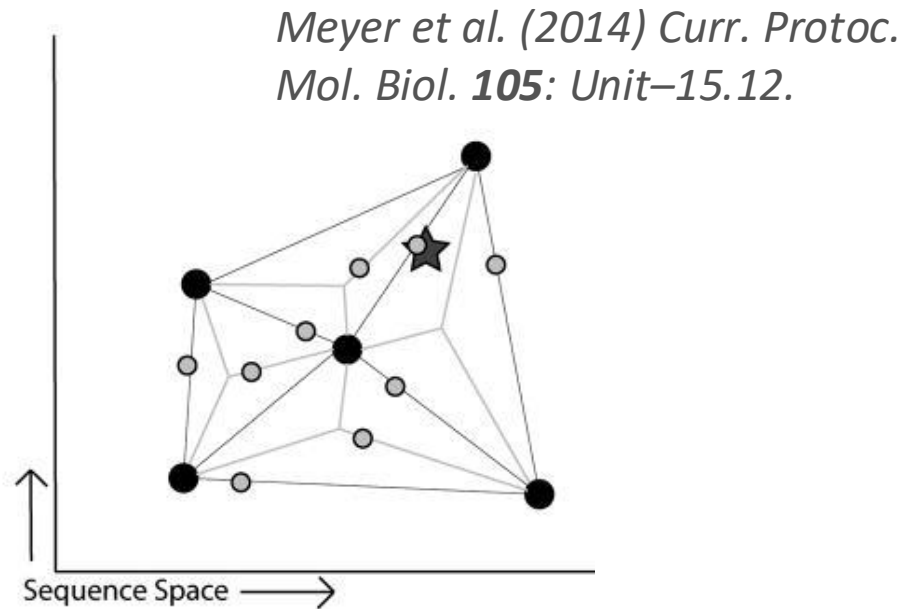
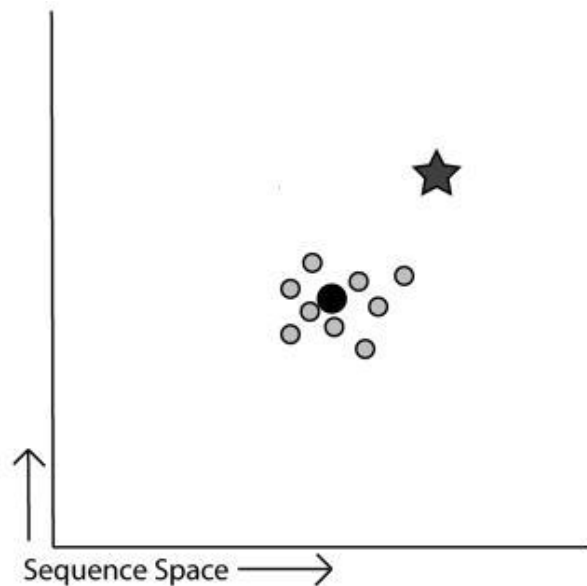


(α) Αντικατάσταση ζεύγους βάσεων

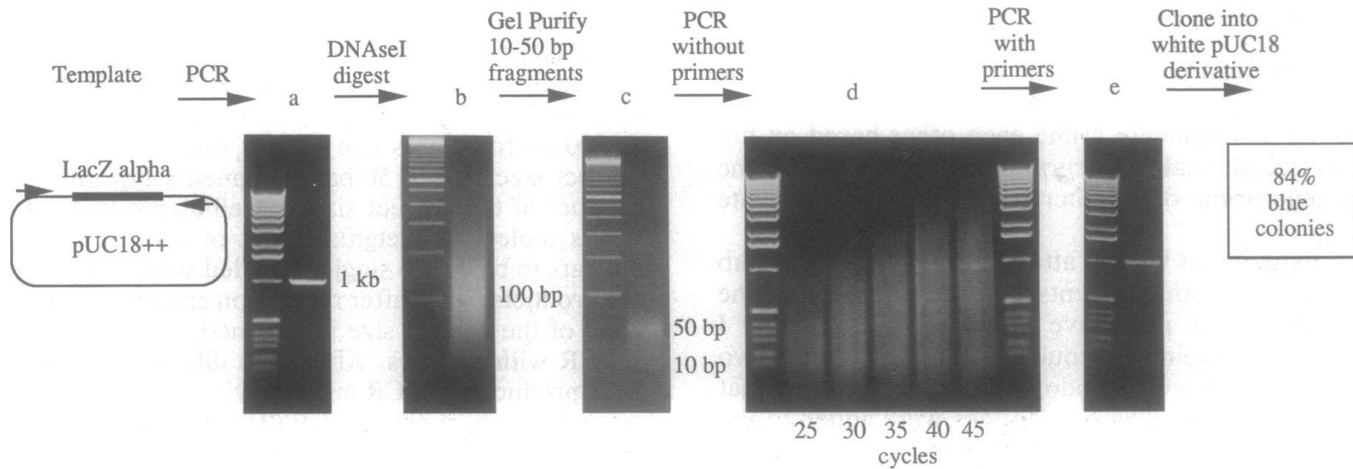
(β) Ένθεση ή έλλειμμα ζεύγους βάσεων

Ανασυνδυασμός DNA

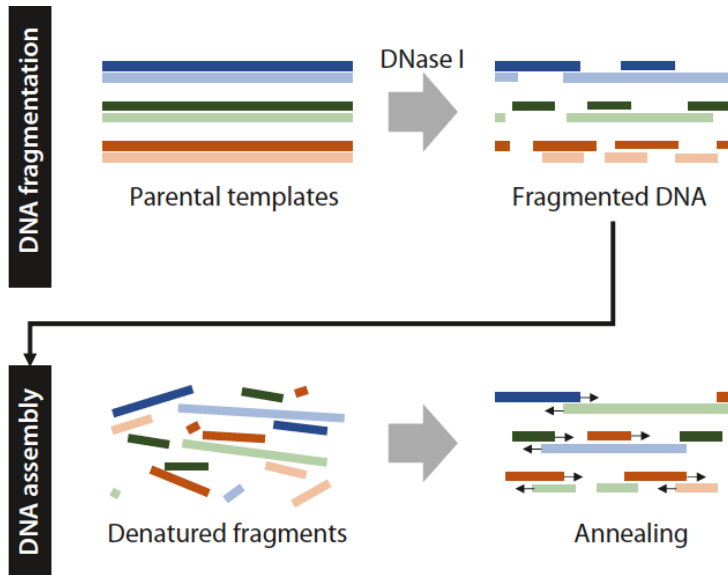
- ❖ Με την τυχαία μεταλλαγμένηση, όπως και με άλλες τεχνικές, δεν γνωρίζουμε ποιες μεταλλάξεις οδηγούν στον επιθυμητό φαινότυπο
- ❖ Με τον ανασυνδυασμό μελετάμε μεγαλύτερη «περιοχή» αλληλουχιών
- ❖ Η πιθανότητα η επιθυμητή ιδιότητα να περιλαμβάνεται είναι μεγαλύτερη



Ανασυνδυασμός DNA



84% blue colonies
 Stemmer (1994)
PNAS, **91**: 10747-51



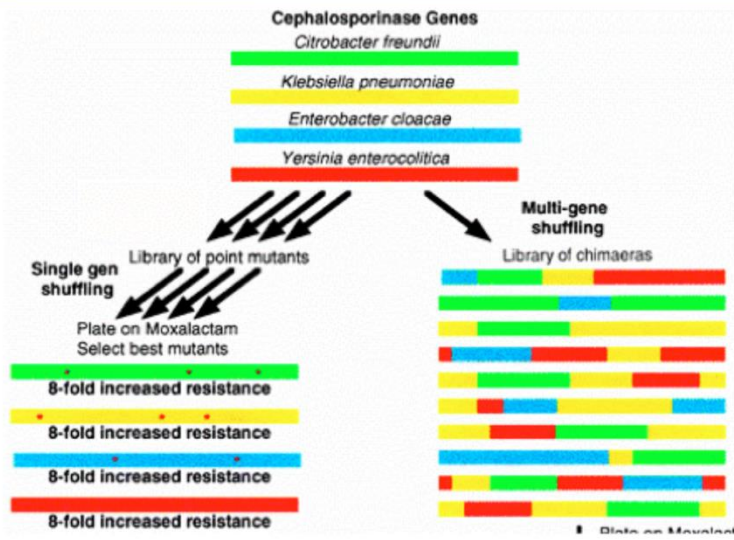
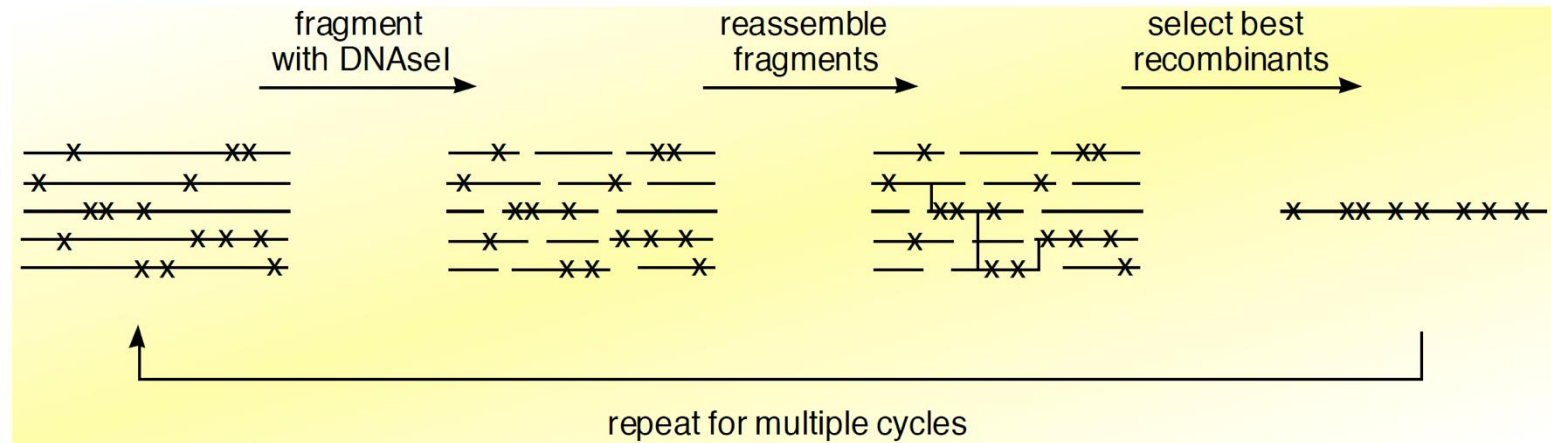
- ❖ DNase I: Μη ειδική κοπή
- ❖ Μέγεθος θραυσμάτων 10-200 bp
- ❖ Primerless PCR
- ❖ Τελική PCR για ολοκλήρωση γονιδίων και προσθήκη θέσεων για κλωνοποίηση

Gene / DNA - shuffling

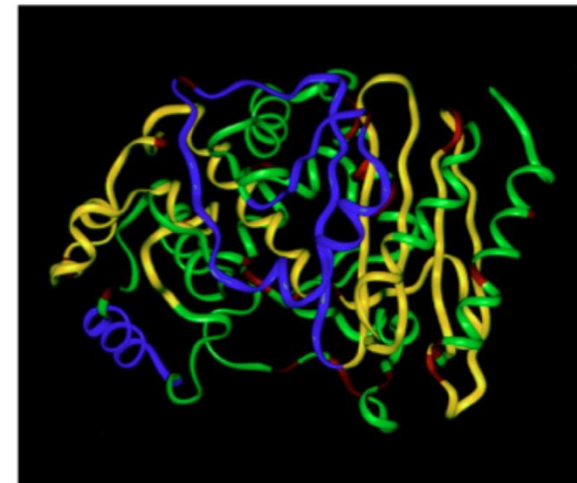
- ❖ Μέθοδος κατευθυνόμενης εξέλιξης
- ❖ *in vitro* ανασυνδυασμός
- ❖ Αυξάνεται το μέγεθος των βιβλιοθηκών DNA πολύ γρήγορα
- ❖ Περισσότερες μεταλλάξεις ανά γονίδιο (εφόσον το επιθυμούμε)
- ❖ Διαλογή των κλώνων με την καλύτερη δραστικότητα

- ❖ Περιοριστικός ο παράγοντας της πιθανότητας ανασυνδυασμού
- ❖ Απαιτείται κλωνοποίηση και πολλές φορές τα άκρα που δημιουργούνται δεν είναι ικανοποιητικά για κλωνοποίηση

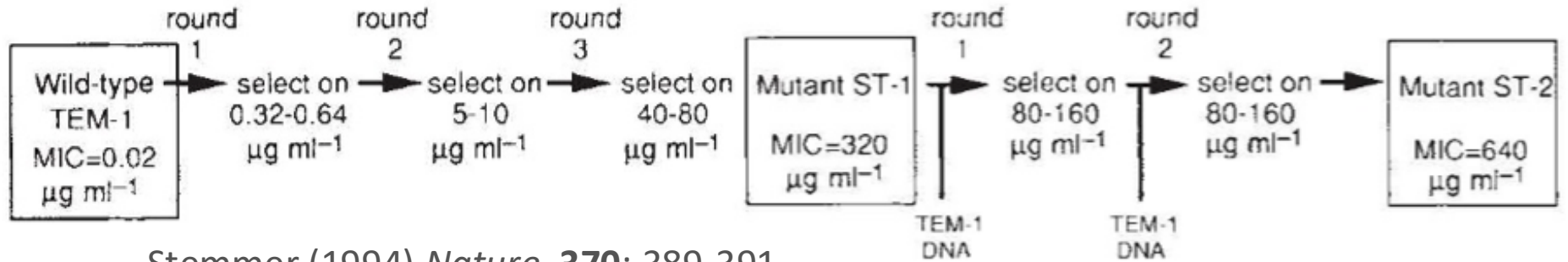
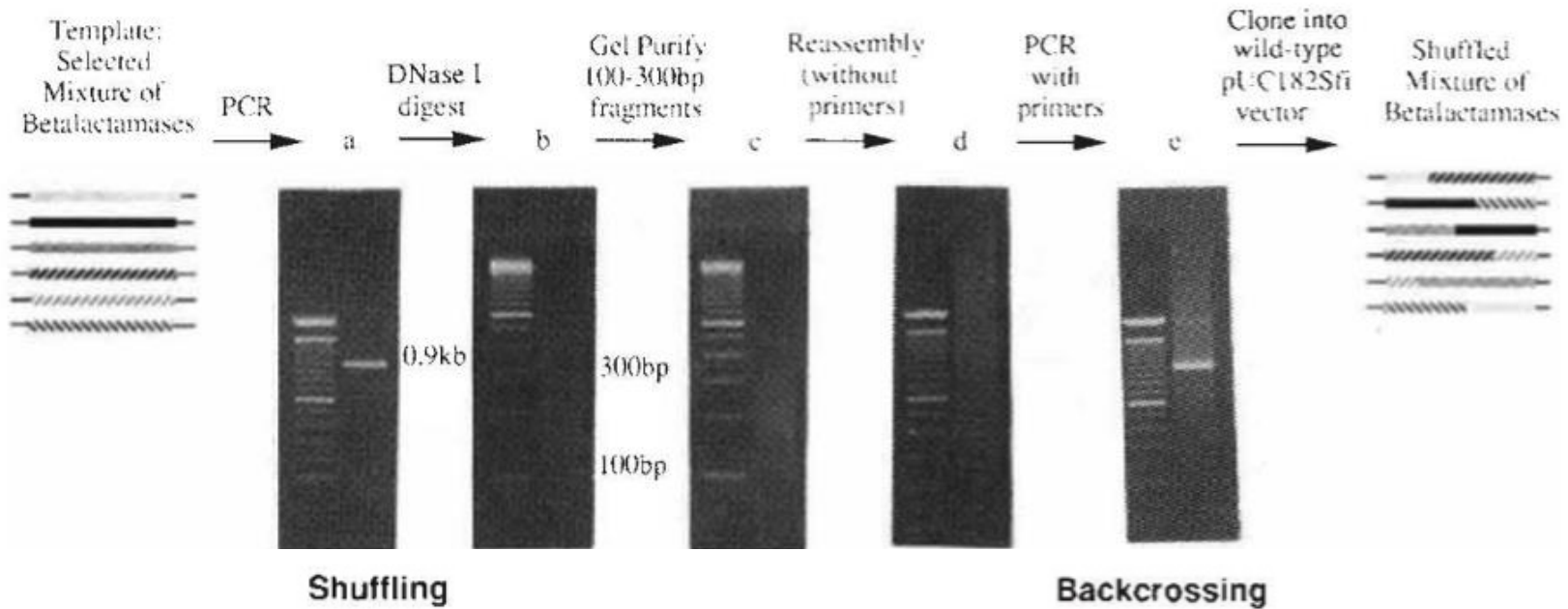
Gene shuffling με βιβλιοθήκες μεταλλάξεων



32.000-fold increase



Παράδειγμα gene shuffling



Stemmer (1994) *Nature*, **370**: 389-391

Staggered extension Process (StEP)

Βελτίωση της μεθόδου, για την μεγαλύτερη επιτυχία κλωνοποίησης και απλοποίηση της μεθόδου.

Σαν PCR με τις διαφορές ότι:

- ❖ Περισσότερα από ένα template DNA
- ❖ Σύντομο elongation/extension step



Temperature [°C]	Duration	# of cycle
95	5 min	1×
94	30 s	80×
55	5 s	

Παράδειγμα StEP - Θερμοσταθερότητα

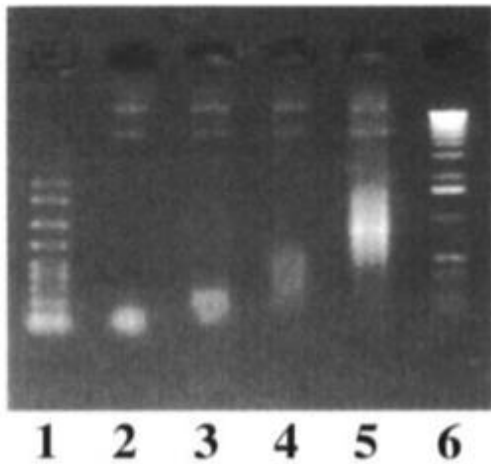


Figure 2. Agarose electrophoresis gel showing the progress of recombining two thermostable subtilisin E genes RC1 and RC2 by StEP. Lane 1: AmpliSize DNA Size standards (Bio-Rad, Hercules, CA), from top to bottom: 2000, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100, and 50 bp; lane 2: after 20 cycles; lane 3: after 40 cycles; lane 4: after 60 cycles; lane 5: after 80 cycles; lane 6: 1 kb ladder from Boehringer Mannheim.

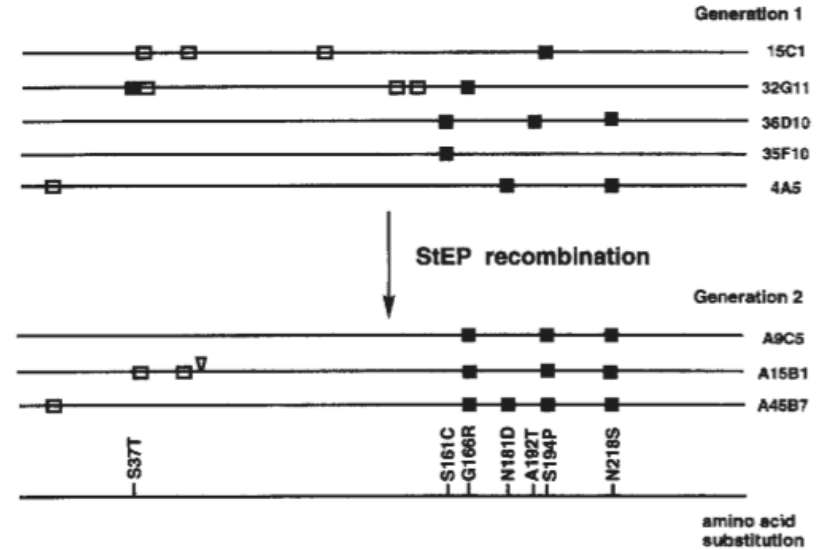


Figure 5. Sequence analysis of first- and second-generation thermostable subtilisin E variants. Filled squares indicate positions of nonsynonymous mutations, empty squares indicate positions of synonymous mutations, and triangles indicate positions of new point mutations introduced during StEP recombination.

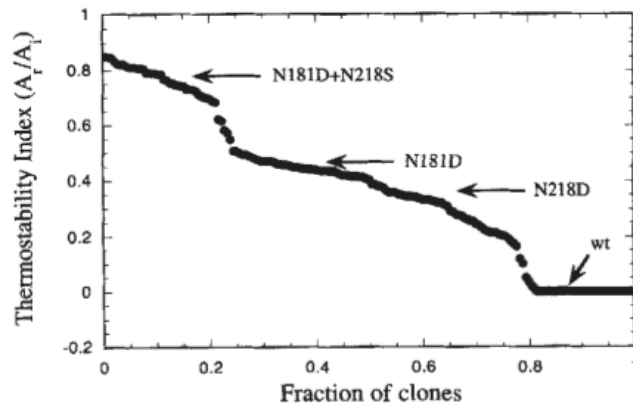


Figure 3. Results of screening 368 variants from the recombined library for activity after incubation at 65°C for 10 min (initial activity, A_i) and 40 min (residual activity, A_r). The ratio A_r/A_i (thermostability index) was used to estimate thermostability*. Data from active variants are sorted and plotted in descending order.

Zhao et al. (1998) *Nature Biotechnology*, 16: 258-261

ITCHY



**„where can enzymes or enzyme fragments
be fused to produce active hybrids?“**

Ostermeier et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17:1205-1209

Εκείνη την περίοδο δεν υπήρχαν αρκετές συνδυαστικές τεχνικές στην κατευθυνόμενη εξέλιξη

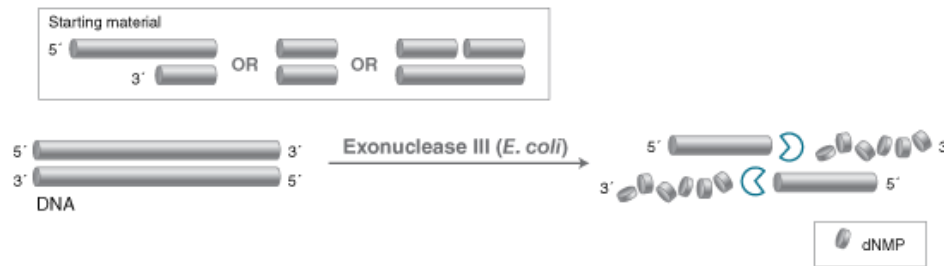
Παραγωγή βιβλιοθηκών DNA που περιλαμβάνουν όλες τις πιθανές μικρότερες (truncated) εκδοχές ενός γονιδίου

Incremental truncation

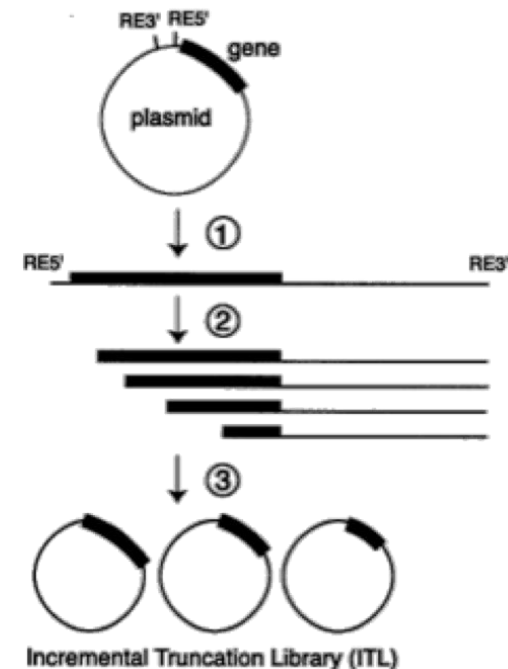
❖ Αργή, κατευθυνόμενη και ελεγχόμενη πέψη DNA

✓ ExoIII (500 βάσεις/min @ 37 °C)

✓ ελεγχόμενη (ρυθμιστικό διάλυμα, θερμοκρασία, αναστολείς)



1. Πέψη για να γίνει γραμμικό και πολλαπλασιασμός
2. Χειρισμός με ExoIII (και απομόνωση θραυσμάτων)
3. Δημιουργία τυφλών άκρων και ένωση



ITCHY

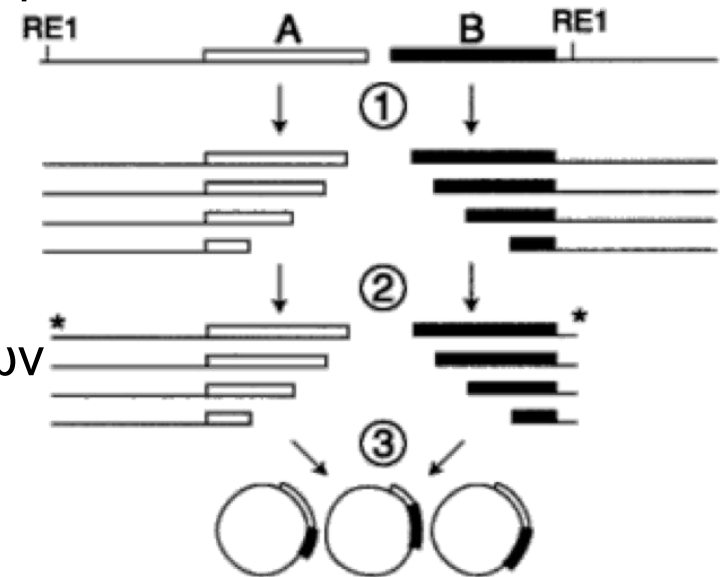


Incremental Truncation for the Creation of Hybrid enzYmes

Δεν απαιτείται ομόλογο DNA ή δομή του ενζύμου

Πέψη και πολλαπλασιασμός

1. Χειρισμός με ExoIII
2. Πέψη με RE1 και απομόνωση θραυσμάτων
3. Ένωση θραυσμάτων



Παραγωγή μεγάλης βιβλιοθήκης από συντηγμένες πρωτεΐνες

Σχεδόν το 1/3 από αυτές είναι σε σωστό πλαίσιο ανάγνωσης



Παράδειγμα ΙΤCΗΥ

- ❖ Παραγωγή χιμαιρικού μορίου μεταξύ ανθρώπινης και βακτηριακής τρανσφορμύλασης γλυκιναμιδίου
- ❖ Ταυτότητα < 50%
- ❖ Σύγκριση με Shuffling (περιορισμένες θέσεις ανασυνδυασμού)

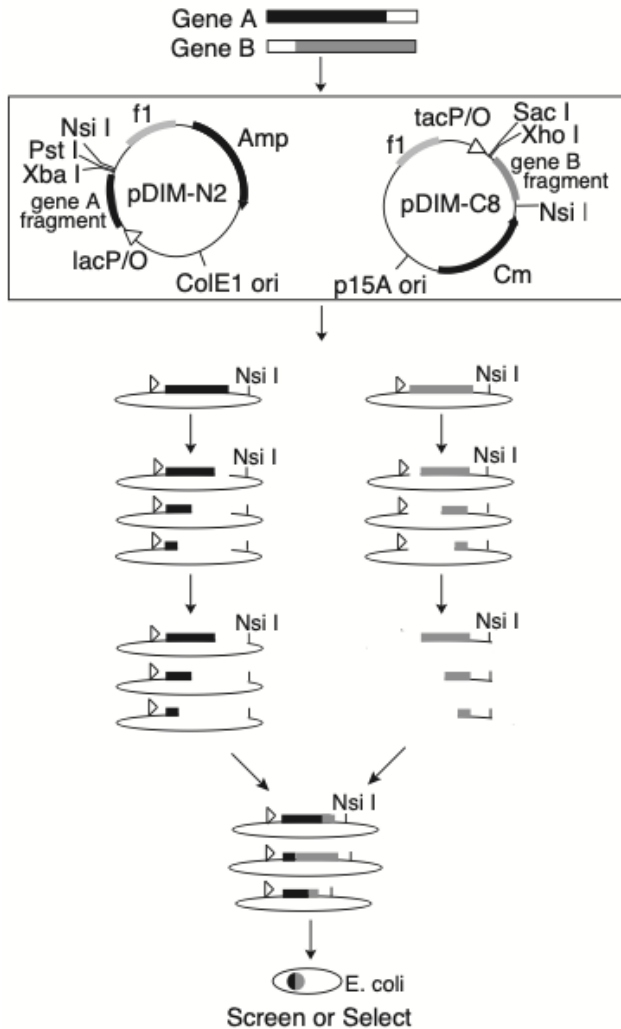


Table 1. Active PurN-GART fusions.

Library	Representative positive number	Amino acid sequence ^a			Number of times found ^b
		PurN	Link	GART	
ITCHY A	IT-A18	1-100	G	101-203	2 (1)
	IT-A8	1-113	-	114-203	9 (4)
	IT-A5	1-129	-	130-203	3 (1)
	IT-A26	1-136	-	137-203	1 (1)
	IT-A3	1-140	-	141-203	3 (1)
	IT-A1	1-144	-	145-203	3 (1)
	IT-A12	1-144	S	146-203	3 (1)
ITCHY B	IT-B12	1-102	-	103-203	1 (1)
	IT-B4	1-113	-	114-203	8 (5)
	IT-B3	1-129	-	130-203	3 (1)
	IT-B17	1-130	-	131-203	1 (1)
	IT-B6	1-134	-	135-203	1 (1)
	IT-B5	1-140	-	140-203	2 (1)
	IT-B9	1-144	S	146-203	4 (1)
Shuffled	SH-5	1-113 ^c	-	114-203 ^c	24 (5)

^aWhen the fusion point occurs within a region of amino acid identity, the region of identity is listed as from PurN.

^bNumber in parentheses is the number of different DNA sequences found coding for a particular protein sequence (ignoring point mutations for the shuffled library).

^cSome members had point mutations.





Παράδειγμα ΙΤCΗΥ

- ❖ Παραγωγή χιμαιρικού μορίου μεταξύ ανθρώπινης και βακτηριακής τρανσφορμούλασης γλυκιναμιδίου
- ❖ Ταυτότητα < 50%
- ❖ Σύγκριση με Shuffling (περιορισμένες θέσεις ανασυνδυασμού)

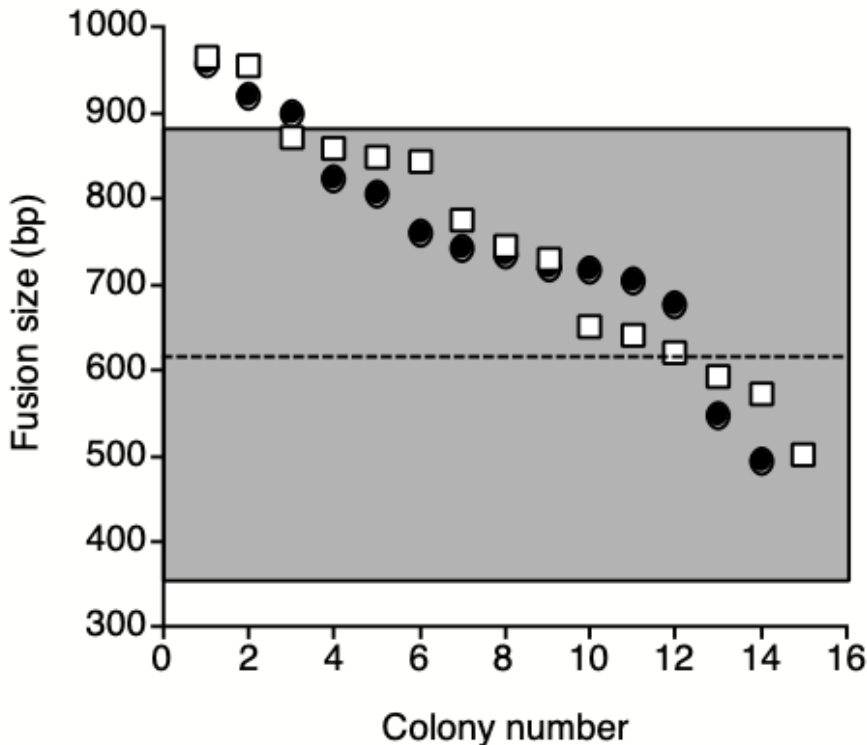


Figure 2. Size distribution of libraries. The sizes of the gene fusions of randomly selected members of IT-A (□) and IT-B (●) were estimated by gel electrophoresis and arranged in descending size order. The shaded area represents the theoretical size range based on the deletion of 1–270 bases of each fragment. Fusions larger than the desired size range result from fusion of gene fragments in which truncation has stopped in the approximately 30 bp spacer between the start of truncation and the gene to be truncated. The dashed line indicates the size of hybrid genes that are fused where their parents' sequences align.

SCRATCHY



Τι είναι;

- ❖ συνδυασμός του **ITCHY** με το *DNA shuffling*
- ❖ *combinatorial engineering of target proteins but independent of sequence identity*

Lutz et al. (2001) PNAS 98(20):11248-11253

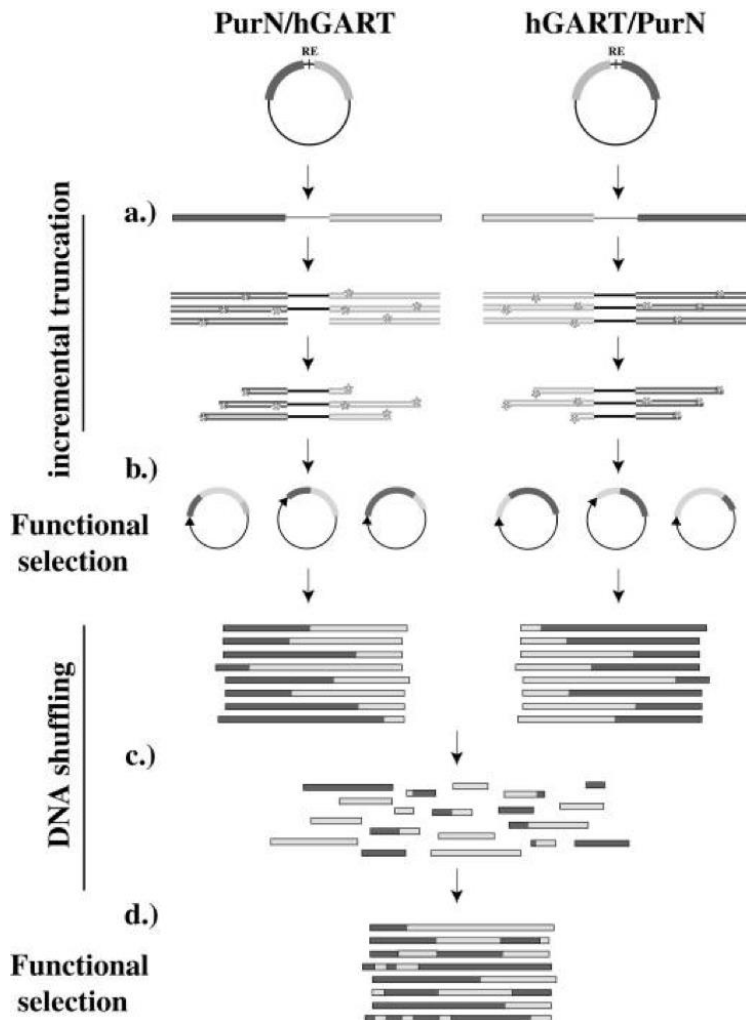
Χρήση:

πιθανή προσθήκη **πολλαπλών** εναλλαγών (*crossovers*) μεταξύ των γονιδίων ενδιαφέροντος → βελτιωμένη πρωτεϊνική λειτουργικότητα

Πραγματικότητα:

Υψηλή ρυθμοαπόδοση, αλλά δύσκολο να ανιχνευτούν πολλαπλά *crossovers* που οδηγούν σε λειτουργική πρωτεΐνη

SCRATCHY



Αναδείχθηκε η μέθοδος με τα ένζυμα:

Phosphoribosylglycinamide formyltransferase
***purN* και hGART**

1. Περικοπή δύο συμπληρωματικών σκευασμάτων
2. Επιλογή με βάση την λειτουργία

Οργάνωση κατά μέγεθος και πλαισίου ανάγνωσης

3. Βιβλιοθήκες DNA αναμιγνύονται

4. Επιλογή με βάση τη λειτουργία

Οργάνωση κατά μέγεθος και πλαισίου ανάγνωσης

Προβλήματα λιγάσης

Κατά την αντίδραση της λιγάσης, αρκετή πληροφορία χάνεται σε γονίδια τα οποία δεν μπορούν να περαστούν ξανά σε πλασμίδια

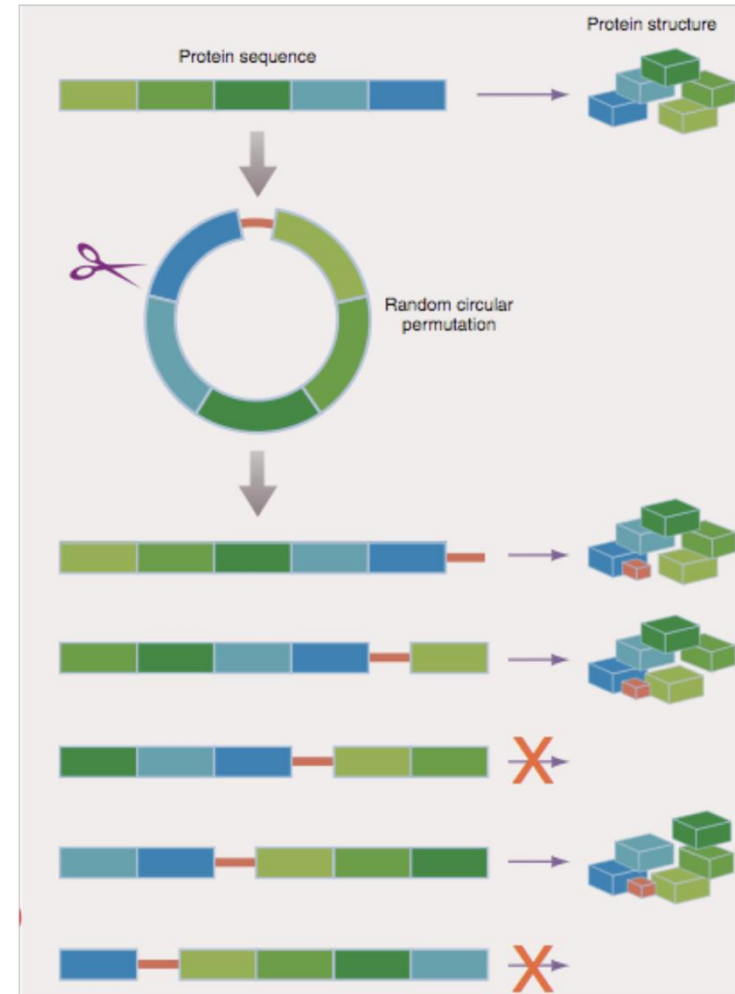
Διάφορες στρατηγικές έχουν αναπτυχθεί σε αυτή την κατεύθυνση

- ❖ Στρατηγική “Bringer”: πολλαπλασιασμός όλου του πλασμιδίου σε συνθήκες epPCR
- ❖ Αντίδραση λιγάσης κατά τον πολλαπλασιασμό: ανάγκη για θερμοσταθερές λιγάσες
- ❖ MEGAWHOP - το μεταλλαγμένο γονίδιο λειτουργεί ως μεγα-εκκινητής στην δεύτερη PCR

Κυκλική μετάθεση

- ❖ Circular permutation (CP)
- ❖ Τελείως διαφορετική στρατηγική
- ❖ Δεν εισάγονται μεταλλάξεις
- ❖ Σύνδεση του N- και C-άκρου της πρωτεΐνης
- ❖ Πέψη σε τυχαίο σημείο για να δημιουργήσει νέα άκρα
- ❖ CALB έδωσε παραλλαγές που είχαν υψηλή δραστικότητα (11-φορές στο pNPB, 75-φορές σε πραγματικό υπόστρωμα)

Qian and Lutz, 2005, J. Am. Chem. Soc., 127, 13466
Qian, Fields and Lutz, 2007, ChemBioChem, 8, 1989

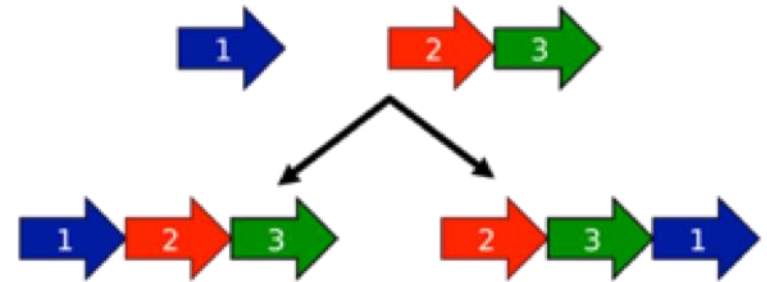
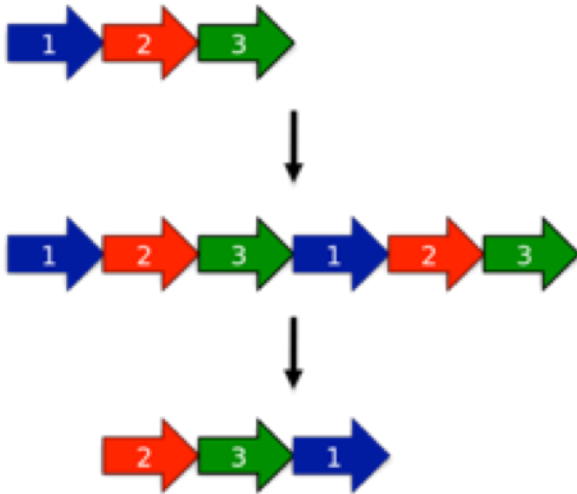


Κυκλική μετάθεση

Gene duplication and deletion

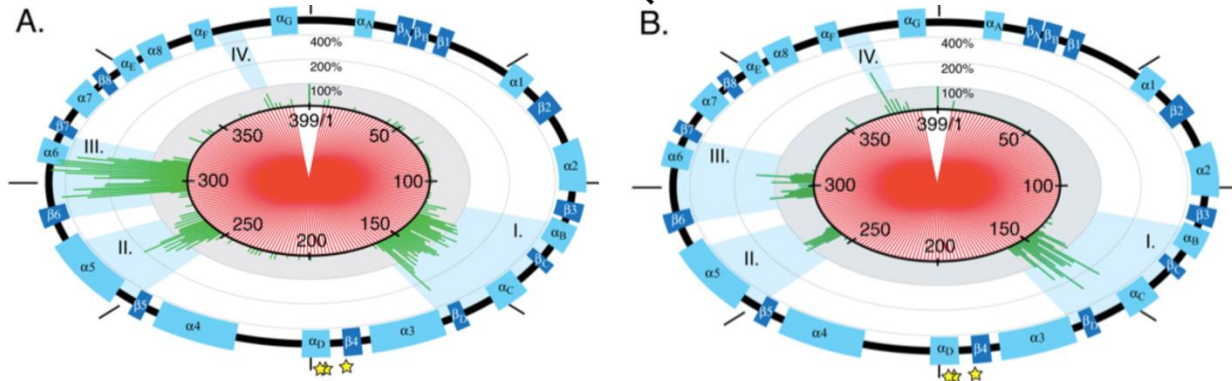
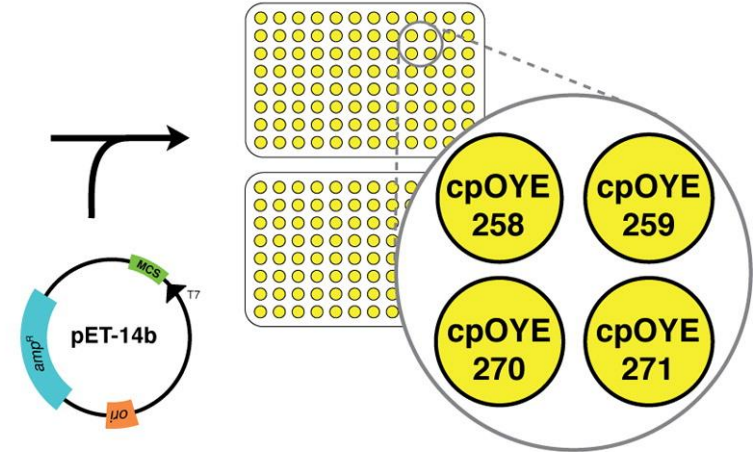
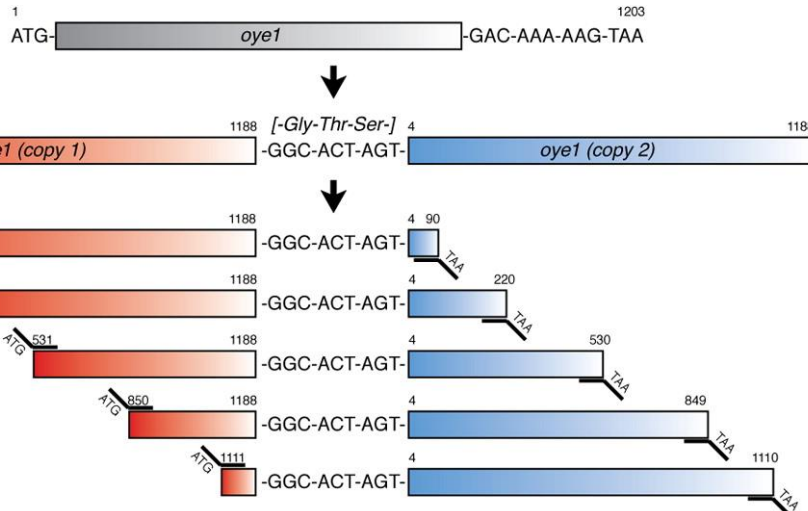
or

fission and fusion



Κυκλική μετάθεση του old yellow enzyme

Daugherty et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 14425 (2013)



A: ketoisophorone to (*R*)-levodione B) cinnamaldehyde to dihydrocinnamaldehyde