

Πρωτεϊνική Μηχανική

Ιωάννης Παυλίδης
Τμήμα Χημείας | Πανεπιστήμιο Κρήτης

E-mail: ipavlidis@uoc.gr

Τηλ.: +30 2810 54-5130 | Γραφείο Γ211

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

Ενότητες

Διδασκαλία:

- ❖ Βασικές αρχές δομής και ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών
- ❖ Εργαλεία βιοπληροφορικής για την πρωτεϊνική εξέλιξη
- ❖ Στρατηγικές / προσεγγίσεις πρωτεϊνικής μηχανικής
- ❖ Μέθοδοι υψηλής ρυθμοαπόδοσης

Σεμινάρια:

1. Εύρεση και μελέτη μεταβολικού μονοπατιού
2. Εικονική κλωνοποίηση και δημιουργία βιβλιοθηκών μεταλλαγμάτων.
3. Περιγραφή/δημιουργία ενός high-throughput assay

Προτεινόμενα συγγράμματα

- ❖ T.S. Wong & K.L. Tee “A Practical Guide to Protein Engineering” (2020) Springer Verlag, ISBN: 978-3-030-56897-9
- ❖ U.T. Bornscheuer & M. Höhne “Protein Engineering – Methods and protocols” (2018) Springer Verlag, ISBN: 978-1-4939-7364-4
- ❖ K.M. Poluri & K. Gulati “Protein Engineering Techniques” (2017) Springer Verlag, ISBN: 978-981-10-2732-1
- ❖ Sheldon J. Park and Jennifer R. Cochran “Protein Engineering and Design”, 2010, CRC Press, ISBN: 978-1-4200-7658-5
- ❖ U. Bornscheuer & S. Lutz, “Protein Engineering Handbook” Volumes 1, 2 and 3, (2011-2012) Wiley VCH, ISBN: Vol. 1 & 2: 978-3-527-31850-6, Vol. 3: 978-3-527-33123-9

Αξιολόγηση

Διαλέξεις (70%)

Προφορική εξέταση σε ομάδες 2 ατόμων,
παρουσία δεύτερου εξεταστή

Σεμινάρια (30%)

Φόρμα αυτοαξιολόγησης, η οποία θα ληφθεί υπόψη ισάξια με τη
βαθμολογία του διδάσκοντα.

Μόνο με επιτυχή ολοκλήρωση και των δύο αξιολογήσεων
παραδίδεται ο βαθμός στη γραμματεία

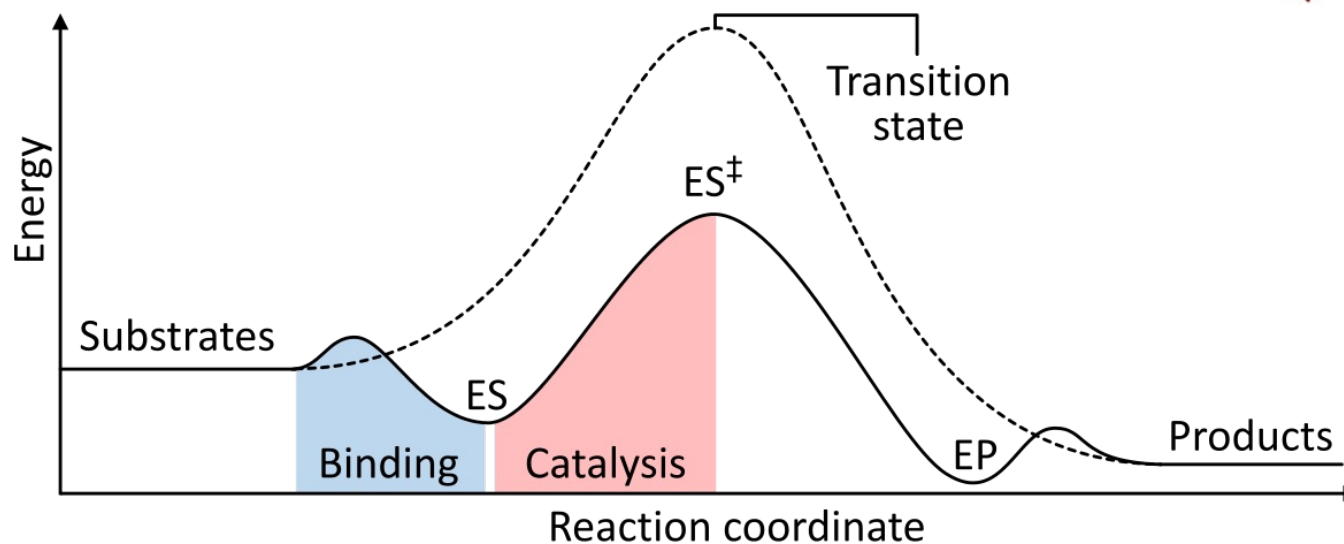
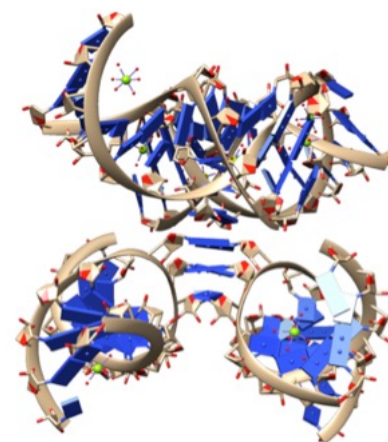
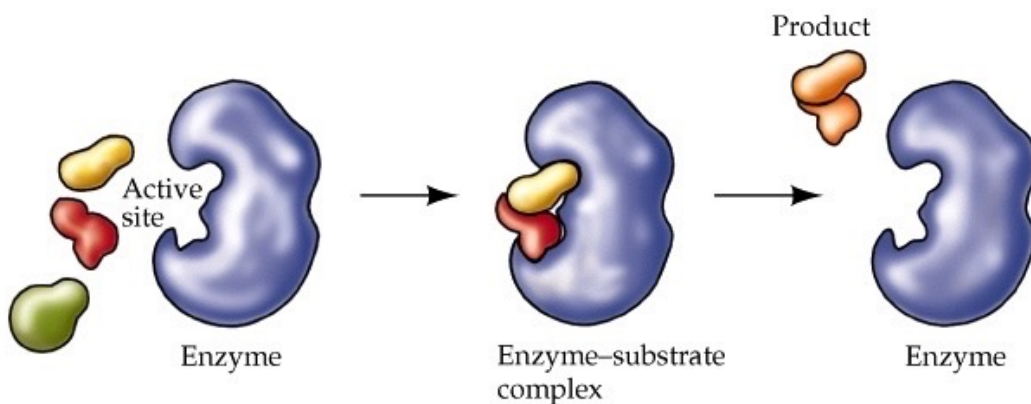
Σχόλια αξιολόγησης

- ❖ Υψηλό επίπεδο προαπαιτούμενης γνώσης
(επιπλέον ώρες στα εισαγωγικά)
- ❖ Διάθεση για εργαστήρια επίδειξης
(το εργαστήριο είναι ανοιχτό – συμμετοχή στα group seminar)
- ❖ Εξοικείωση με βάσεις δεδομένων και εργαλεία βιοπληροφορικής
(στο σεμινάριο θα δούμε βάσεις δεδομένων και λογισμικά)
- ❖ Οι παρουσιάσεις απαιτούν πολύ χρόνο
(10 ECTS=250-300 ώρες απασχόλησης)
- ❖ Περισσότερα παραδείγματα από τις εφαρμογές - Λιγότερες τεχνικές, περισσότερο βάθος σε αυτές που αναλύονται
(Είναι λιγότερες λόγω νέου σχεδιασμού και θα δοθούν παραδείγματα από βιβλιογραφία σε αυτές που μελετηθούν)

Ένζυμα και βιοκατάλυση

Τα ένζυμα ως καταλύτες

Κυρίως πρωτεϊνικής φύσεως



Χαρακτηριστικά ενζύμων

Πλεονεκτήματα:

- Αποδοτικοί καταλύτες
- Ήπιες συνθήκες αντίδρασης
- Μη χρήση οργανικών διαλυτών
- Αρκετές αντιδράσεις καλύπτονται
- Υψηλή εκλεκτικότητα
- Λιγότερα στάδια
- Προσαρμόσιμοι στη σύνθεση
- Βιοδιασπώμενοι καταλύτες

Μειονεκτήματα:

- Διαθεσιμότητα / τιμή
- Σταθερότητα
- Παρεμπόδιση υποστρώματος / προϊόντος
- Δεν υπάρχουν διαθέσιμα ένζυμα για όλες τις χημικές αντιδράσεις
- Συμπαράγοντες
- Υψηλή μοριακή περιπλοκότητα

Σημασία της εκλεκτικότητας

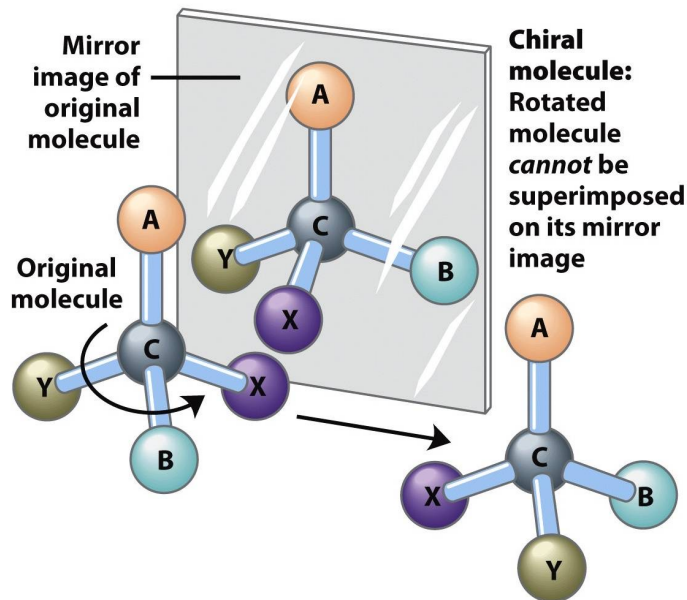


Figure 1-19a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

(R) - enantiomers	(S) - enantiomers
A. R - (+) - Thalidomide (R)-Thalidomide: Effective sedative agent	A. S - (-) - Thalidomide (S)-Thalidomide: Teratogenic
B. (R) - Ibuprofen: Inactive	B. (S)- Ibuprofen: painkiller (has a desired pharmacological activity)
C. (R) - Naproxen: Used for arthralgia pain	C. (S)-Naproxen: Teratogenic
D. (R)-Ofloxacin – is less active	D. (S)-Ofloxacin – is 8-128 more active

Βραβεία Πράσινης Χημείας

Πηγή: <https://www.epa.gov/greenchemistry/green-chemistry-challenge-winners>

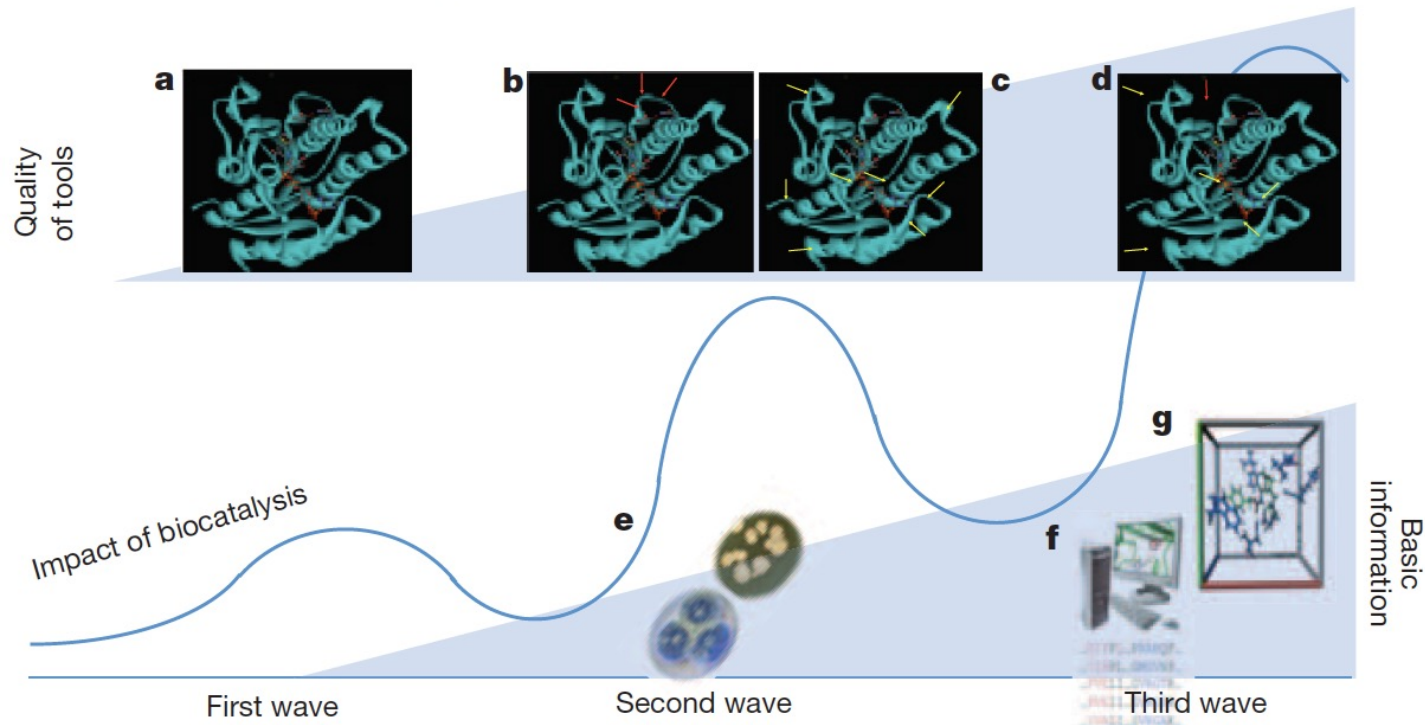
Έτος	Βραβευθέντες	Τεχνολογία
2020	Genomatica	Βελτιωμένο στέλεχος <i>E. coli</i> για την παραγωγή 1,3-βουτανοδιόλης από σάκχαρα (και το 2011 για 1,4-βουτανοδιόλης)
2019	Kalion, Inc.	Μικροβιακή παραγωγή σακχαρικού οξέος για βιοπλαστικά
2016	New light technologies	Βιοκαταλυτική παραγωγή θερμοπλαστικών πολυμερών από αέρια θερμοκηπίου
2015	Algenol	Παραγωγή αιθανόλης με κυανοβακτήρια, διατηρώντας τη φωτοσυνθετική τους ικανότητα
2015	LanzaTech	Παραγωγή αιθανόλης και χημικών από αέριους ρύπους βιομηχανίας με μικροοργανισμούς
2014	Solazyme	Βελτιωμένα μικροάλγη που παράγουν τριγλυκερίδια (καλλυντικά, λιπαντικά, καύσιμα)
2014	Amyris	Βελτιωμένη ζύμη για την παραγωγή β-φαρνεσίνης (εφαρμογή σε βιοκαύσιμα)
2012	Codexis & UCLA	Σύνθεση της σимвαστατίνης (Zocor) με βελτιωμένη ακυλοτρανσφεράση
2010	Merck & Co. & Codexis	Βελτιωμένη (<i>R</i>)-εκλεκτική τρανσαμινάση για την βιοσύνθεση της σιταγλιπτίνης (Januvia)

Πως αναπτύσσουμε μία διεργασία;



Το τρίτο “κύμα” της βιοκατάλυσης

“In the past, an enzyme-based process was designed around the limitations of the enzyme; today, the enzyme is engineered to fit the process specifications”



Bornscheuer et al. (2012) Nature 485, 185-194

Από το DNA στην πρωτεΐνη

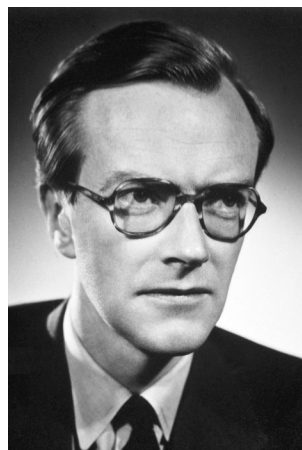
DNA – Η βάση της ζωής



James D. Watson



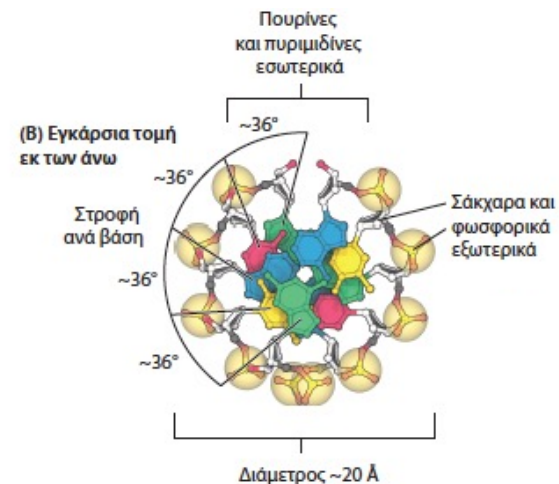
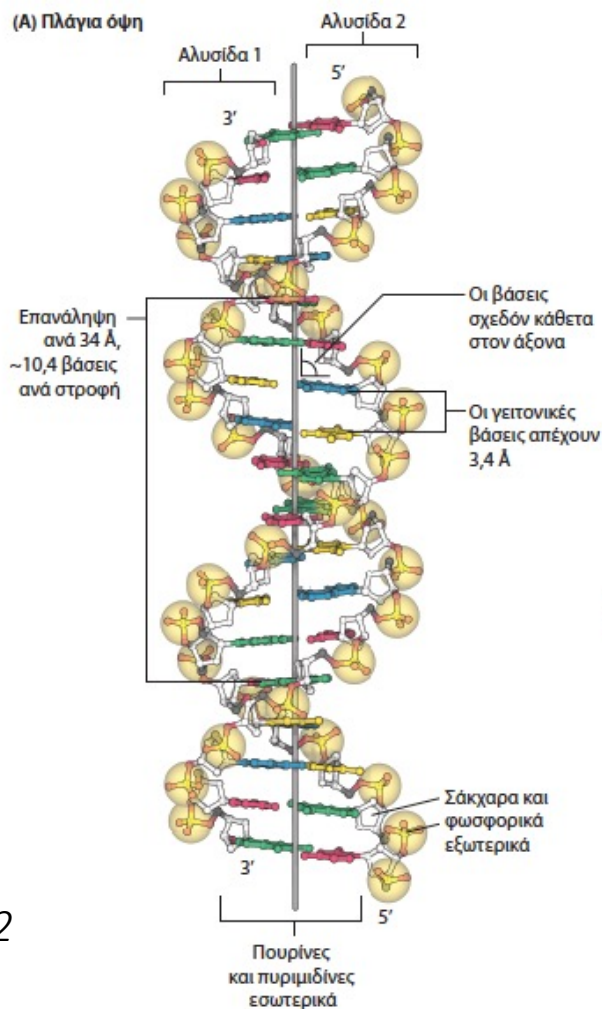
Francis Crick,



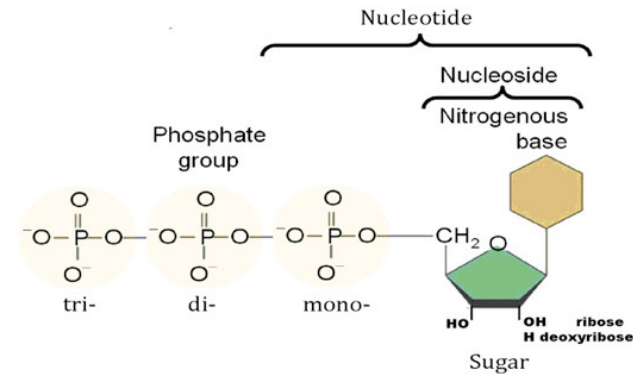
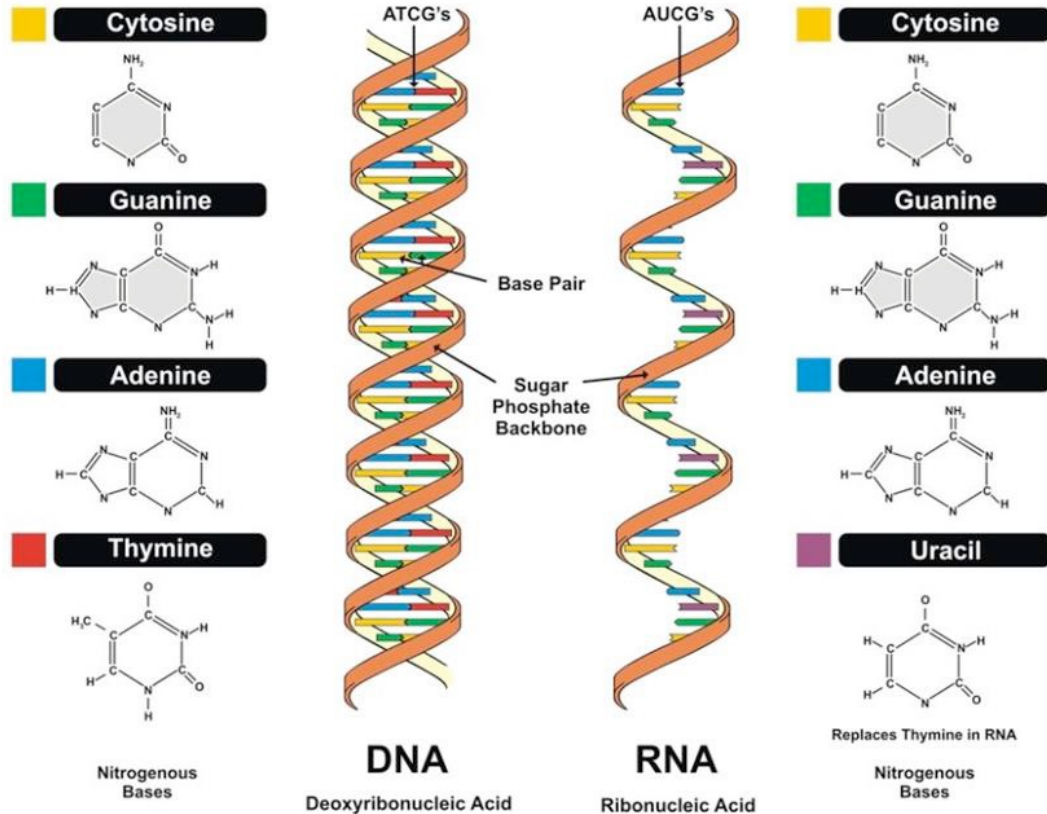
Maurice H.F. Wilkins



Nobel Ιατρικής 1962

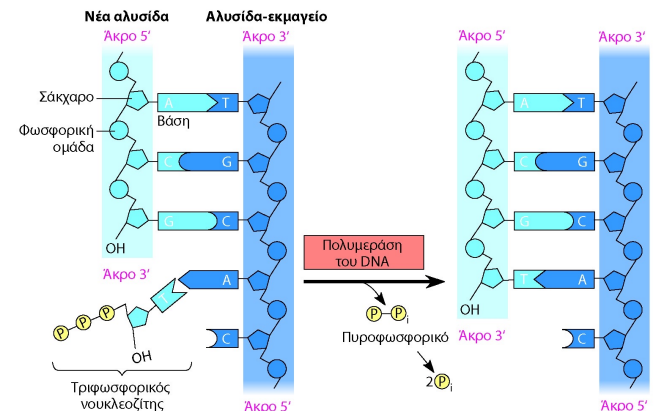


Δομικοί λίθοι των νουκλεϊκών οξέων

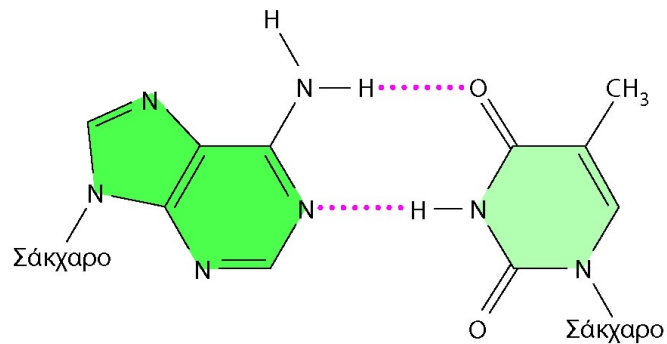


Θέση 2': RNA vs. DNA

Πάντα διαβάζουμε 5'→3'

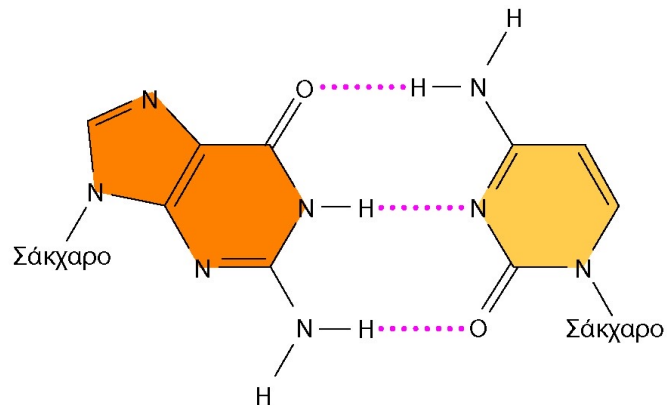


Ασθενείς αλληλεπιδράσεις



Αδερίνη (A)

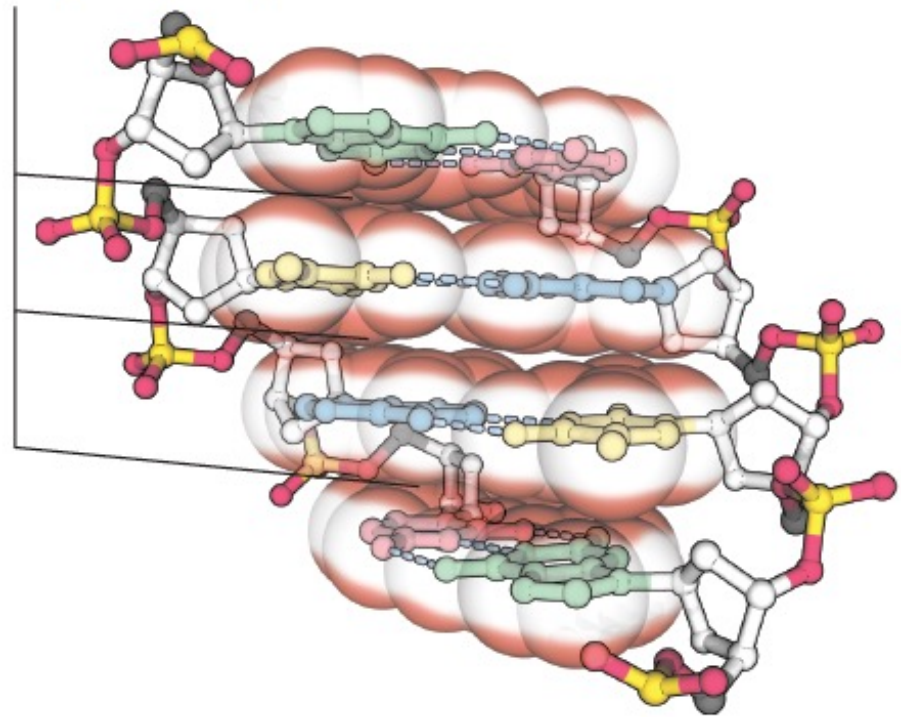
Θυμίνη (T)



Γουανίνη (G)

Κυτοσίνη (C)

Επιστοίβαξη βάσεων
(Αλληλεπιδράσεις van der Waals)



Το κεντρικό δόγμα

Εκείνη την εποχή δεν ήταν αυτονόητο

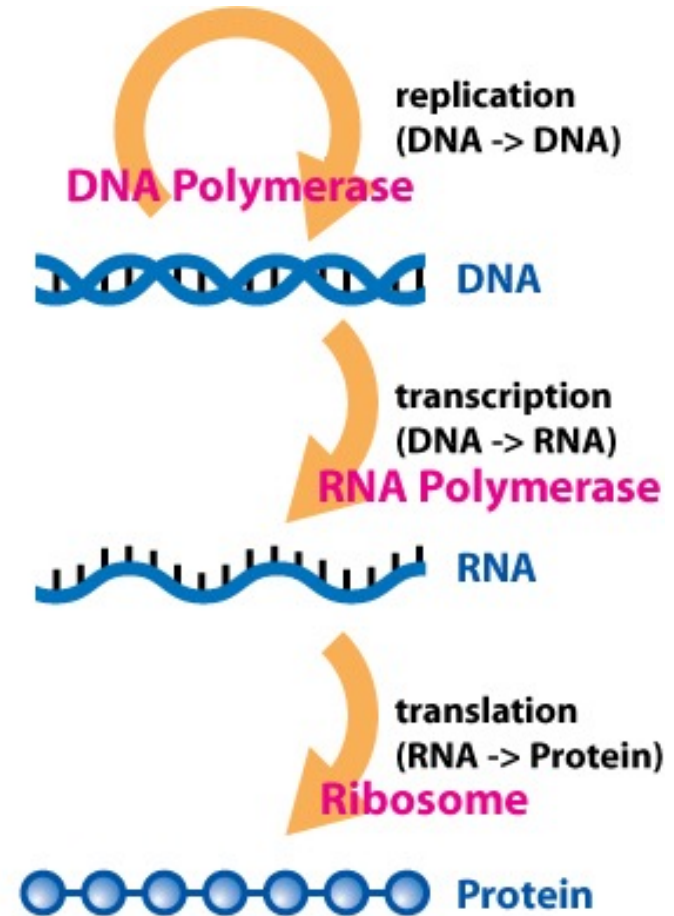
Υπάρχουν 20 αμινοξέα στις πρωτεΐνες

Ένα κωδικόνιο κωδικοποιεί ένα αμινοξύ

❖ Διπλέτες δίνουν 16 συνδυασμούς

❖ Τριπλέτες δίνουν 64 συνδυασμούς

Εκφυλισμός του γενετικού κώδικα



Το κεντρικό δόγμα

Εκείνη την εποχή δεν ήταν αυτονόητο

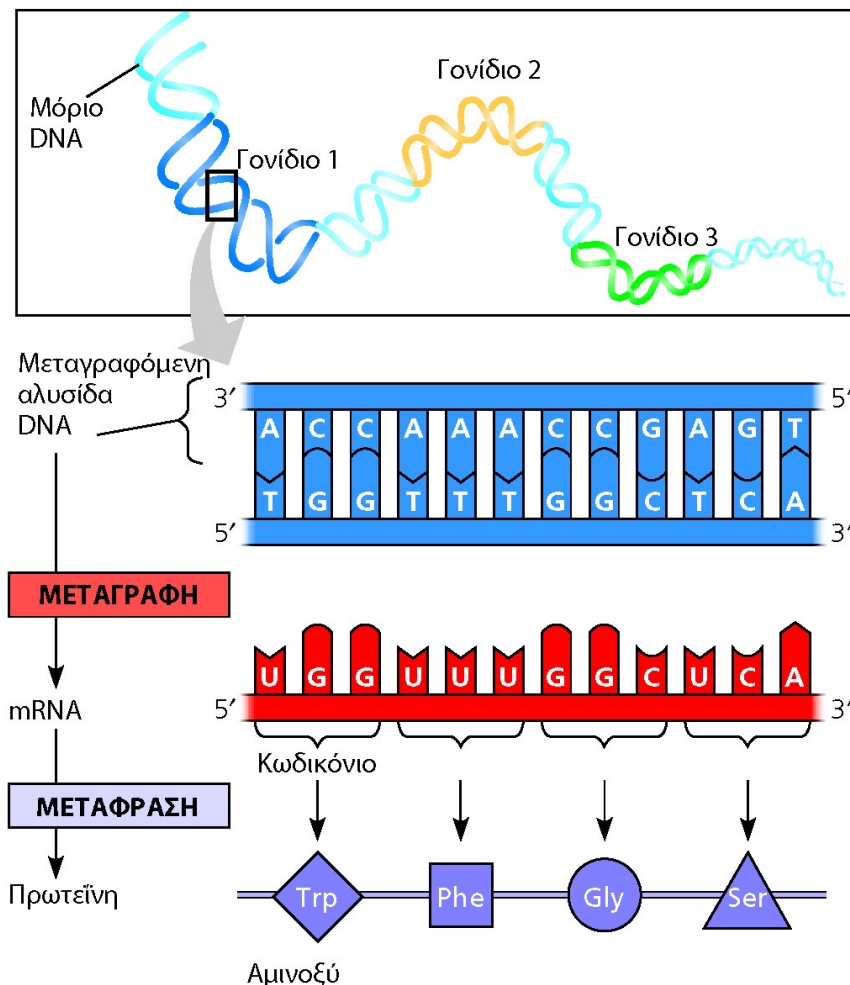
Υπάρχουν 20 αμινοξέα στις πρωτεΐνες

Ένα κωδικόνιο κωδικοποιεί ένα αμινοξύ

❖ Διπλέτες δίνουν 16 συνδυασμούς

❖ Τριπλέτες δίνουν 64 συνδυασμούς

Εκφυλισμός του γενετικού κώδικα



Εκφυλισμός του γενετικού κώδικα

CODON USAGE IN *E. COLI* GENES¹

	Codon	Amino acid ²	% ³	Ratio ⁴	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	
U	UUU	Phe (F)	1.9	0.51	UCU	Ser (S)	1.1	0.19	UAU	Tyr (Y)	1.6	0.53	UGU	Cys (C)	0.4	0.43	U
	UUC	Phe (F)	1.8	0.49	UCC	Ser (S)	1.0	0.17	UAC	Tyr (Y)	1.4	0.47	UGC	Cys (C)	0.6	0.57	
	UUA	Leu (L)	1.0	0.11	UCA	Ser (S)	0.7	0.12	UAA	STOP	0.2	0.62	UGA	STOP	0.1	0.30	
	UUG	Leu (L)	1.1	0.11	UCG	Ser (S)	0.8	0.13	UAG	STOP	0.03	0.09	UGG	Tyr (Y)	1.4	1.00	
C	CUU	Leu (L)	1.0	0.10	CCU	Pro (P)	0.7	0.16	CAU	His (H)	1.2	0.52	CGU	Arg (R)	2.4	0.42	C
	CUC	Leu (L)	0.9	0.10	CCC	Pro (P)	0.4	0.10	CAC	His (H)	1.1	0.48	CGC	Arg (R)	2.2	0.37	
	CUA	Leu (L)	0.3	0.03	CCA	Pro (P)	0.8	0.20	CAA	Gln (Q)	1.3	0.31	CGA	Arg (R)	0.3	0.05	
	CUG	Leu (L)	5.2	0.55	CCG	Pro (P)	2.4	0.55	CAG	Gln (Q)	2.9	0.69	CGG	Arg (R)	0.5	0.08	
A	AUU	Ile (I)	2.7	0.47	ACU	Thr (T)	1.2	0.21	AAU	Asn (N)	1.6	0.39	AGU	Ser (S)	0.7	0.13	A
	AUC	Ile (I)	2.7	0.46	ACC	Thr (T)	2.4	0.43	AAC	Asn (N)	2.6	0.61	AGC	Ser (S)	1.5	0.27	
	AUA	Ile (I)	0.4	0.07	ACA	Thr (T)	0.1	0.30	AAA	Lys (K)	3.8	0.76	AGA	Arg (R)	0.2	0.04	
	AUG	Met (M)	2.6	1.00	ACG	Thr (T)	1.3	0.23	AAG	Lys (K)	1.2	0.24	AGG	Arg (R)	0.2	0.03	
G	GUU	Val (V)	2.0	0.29	GCU	Ala (A)	1.8	0.19	GAU	Asp (D)	3.3	0.59	GGU	Gly (G)	2.8	0.38	G
	GUC	Val (V)	1.4	0.20	GCC	Ala (A)	2.3	0.25	GAC	Asp (D)	2.3	0.41	GGC	Gly (G)	3.0	0.40	
	GUA	Val (V)	1.2	0.17	GCA	Ala (A)	2.1	0.22	GAA	Glu (E)	4.4	0.70	GGA	Gly (G)	0.7	0.09	
	GUG	Val (V)	2.4	0.34	GCG	Ala (A)	3.2	0.34	GAG	Glu (E)	1.9	0.30	GGG	Gly (G)	0.9	0.13	
	U				C				A				G				

¹ The data shown in this table is from the Arabidopsis Research Companion on the World Wide Web (<http://weeds.mgh.harvard.edu>). Codon frequencies for many other bacteria can be found at <http://morgan.angis.su.oz.au/Angis/Tables.html>.

² The letter in parenthesis represents the one-letter code for the amino acid.

³ % represents the average frequency this codon is used per 100 codons.

⁴ Ratio represents the abundance of that codon relative to all of the codons for that particular amino acid.

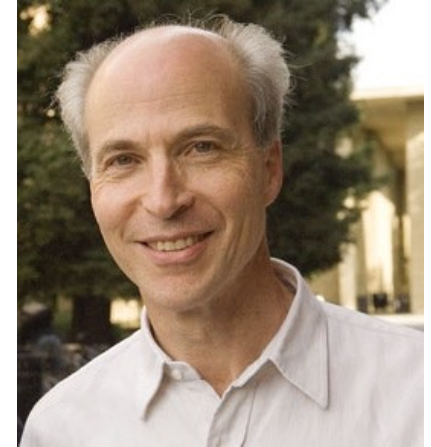
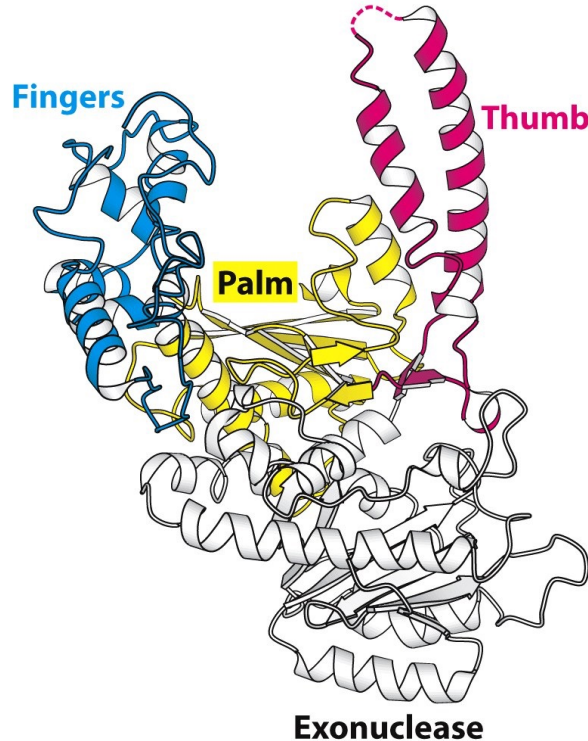
Αντιγραφή DNA



Arthur Kornberg

Nobel Ιατρικής 1959

Μηχανισμός σύνθεσης DNA



Roger Kornberg

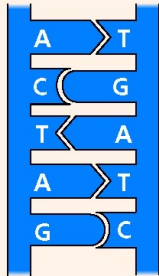
Nobel Χημείας 2006

Ευκαρυωτική μεταγραφή

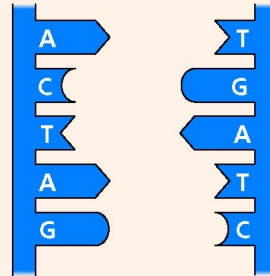
DNA Πολυμεράση I: 20 b/s, επεξεργασία, επιδιόρθωση και αφαίρεση εκκινητών

DNA Πολυμεράση III: 1000 b/s, κύριο ένζυμο αντιγραφής DNA

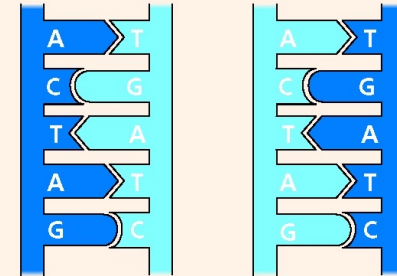
Αντιγραφή DNA



(α) Το γονικό μόριο DNA έχει δύο συμπληρωματικές αλυσίδες. Κάθε βάση ζευγαρώνει μέσω δεσμών υδρογόνου με τη συμπληρωματική της: η Α με την Τ και η Γ με την C.

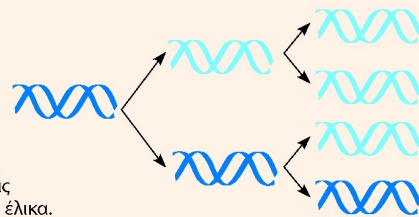


(β) Πρώτο βήμα της αντιγραφής είναι ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου DNA. Κάθε αρχική αλυσίδα μπορεί τώρα να αποτελέσει το εκμαγείο που θα καθορίσει τη σειρά των νουκλεοτιδίων κατά μήκος της νέας, συμπληρωματικής αλυσίδας.

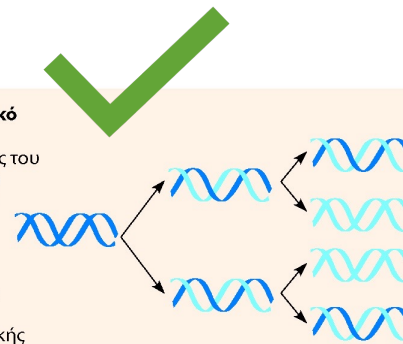


(γ) Τα συμπληρωματικά νουκλεοτίδια στοιχίζονται και κατόπιν ενώνονται, σχηματίζοντας τον σακχαροφωσφορικό σκελετό των νέων αλυσίδων. Κάθε «θυγατρικό» μόριο DNA αποτελείται από μία γονική (σκούρο μπλε) και μία νέα αλυσίδα (ανοικτό μπλε).

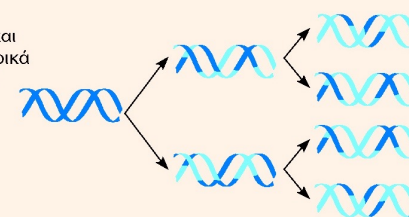
(α) Συντηρητικό μοντέλο.
Αφού δράσουν ως εκμαγεία για τη σύνθεση νέων αλυσίδων, οι δύο γονικές αλυσίδες επανενώνονται, αποκαθιστώντας τη γονική διπλή έλικα.



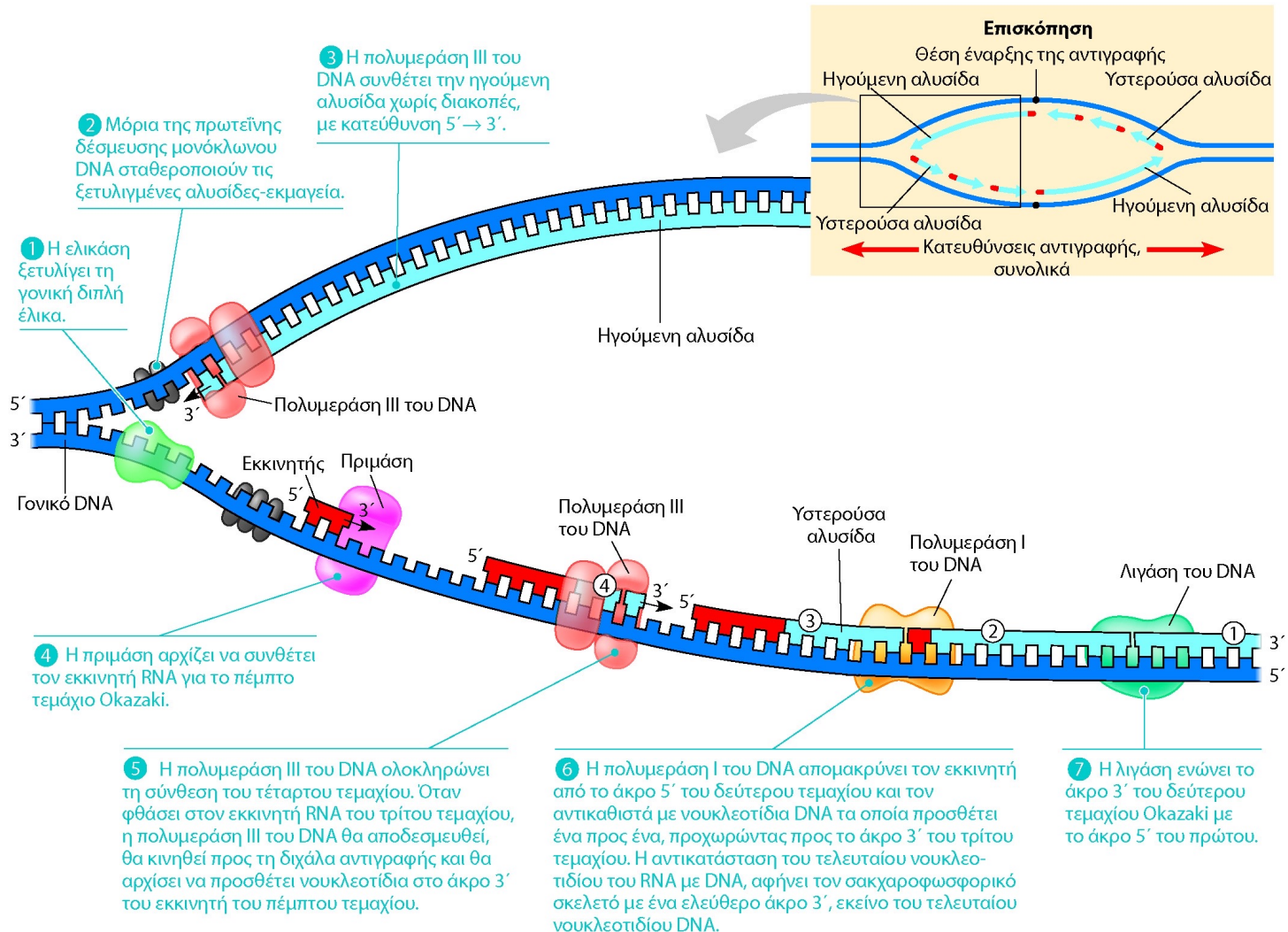
(β) Ημισυντηρητικό μοντέλο.
Οι δύο αλυσίδες του γονικού μορίου αποχωρίζονται και καθεμία λειτουργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση μιας νέας, συμπληρωματικής αλυσίδας.



(γ) Μοντέλο διασποράς.
Κάθε αλυσίδα και στα δύο θυγατρικά μόρια αποτελεί ένα μείγμα από παλιό και νέο DNA.

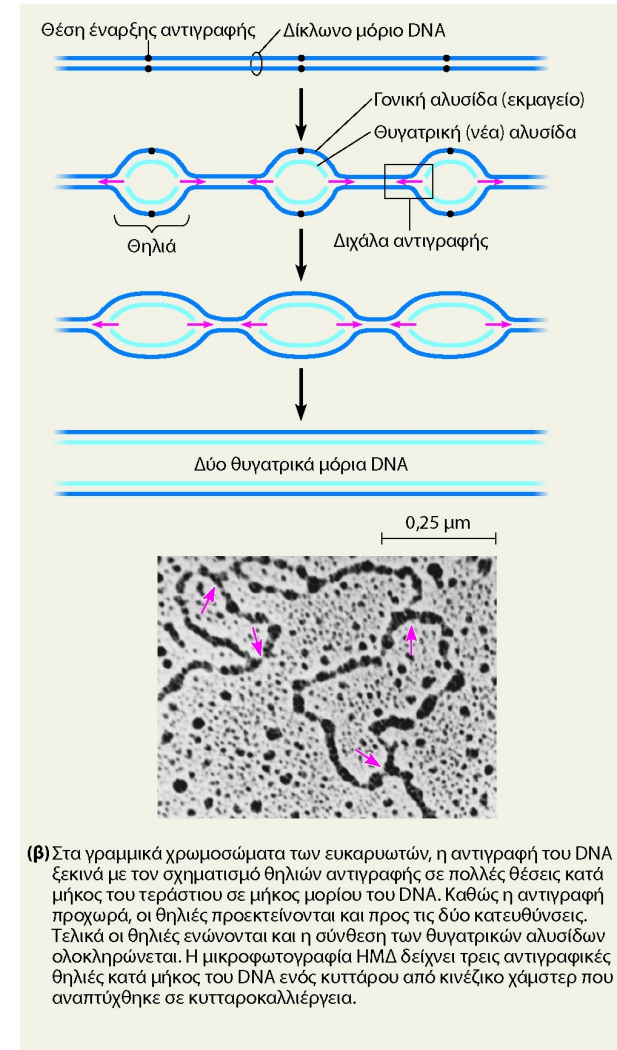
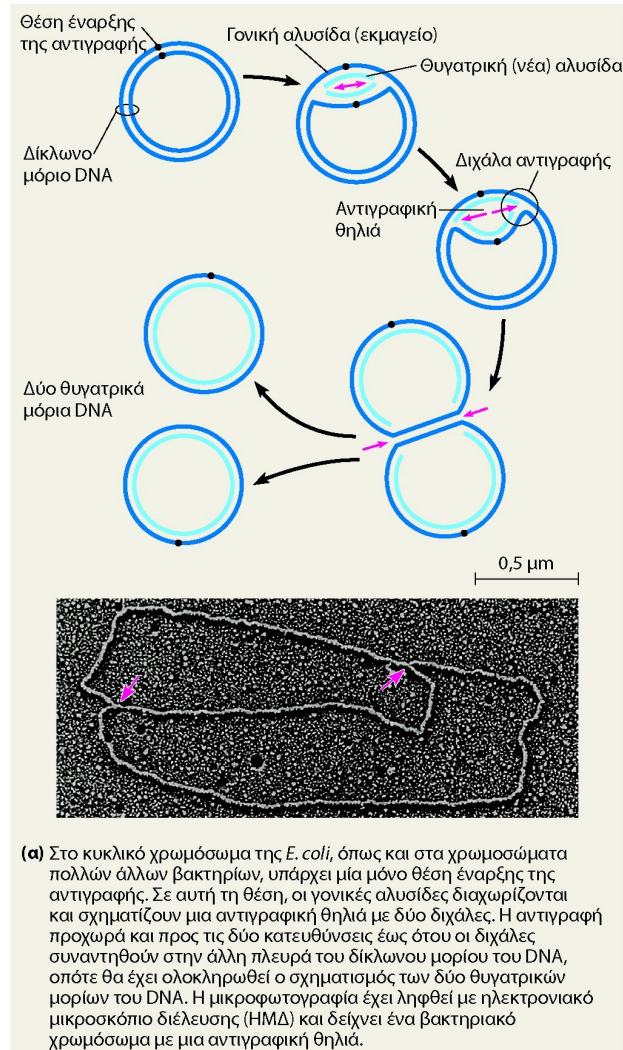


Αντιγραφή βακτηριακού DNA

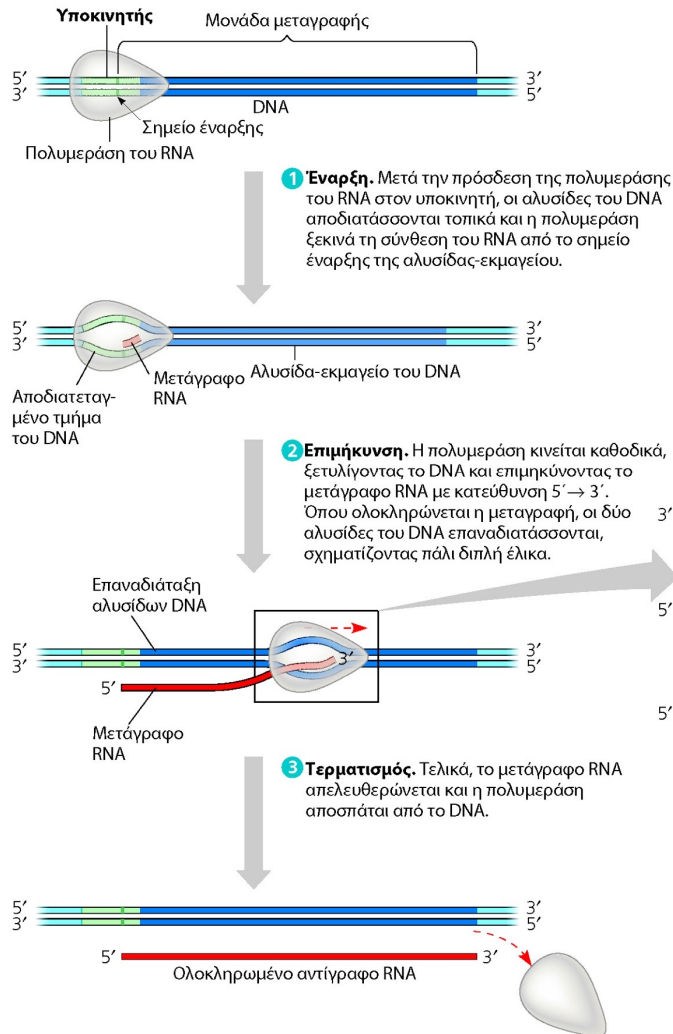


Έναρξη αντιγραφής

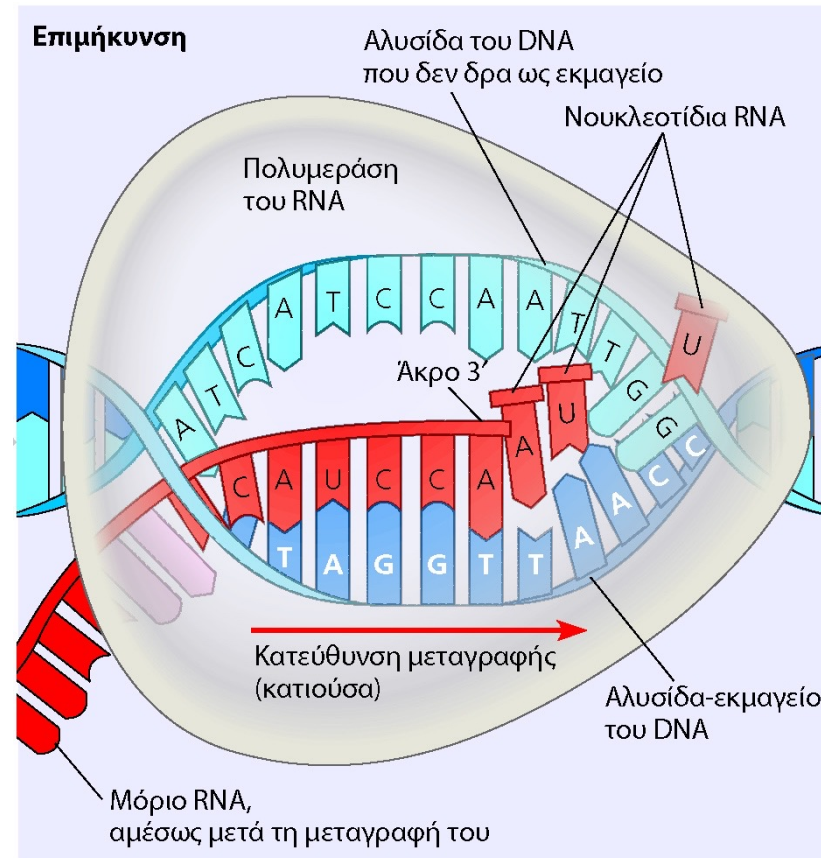
Ori: Origin of replication
(αφετηρία αντιγραφής)



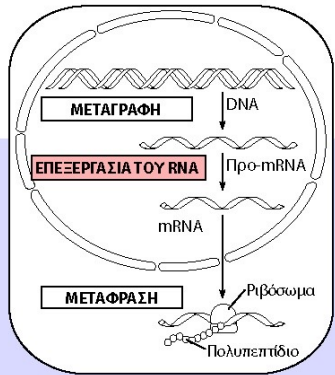
Μεταγραφή



Υποκινητής = promoter
Τερματιστής = terminator

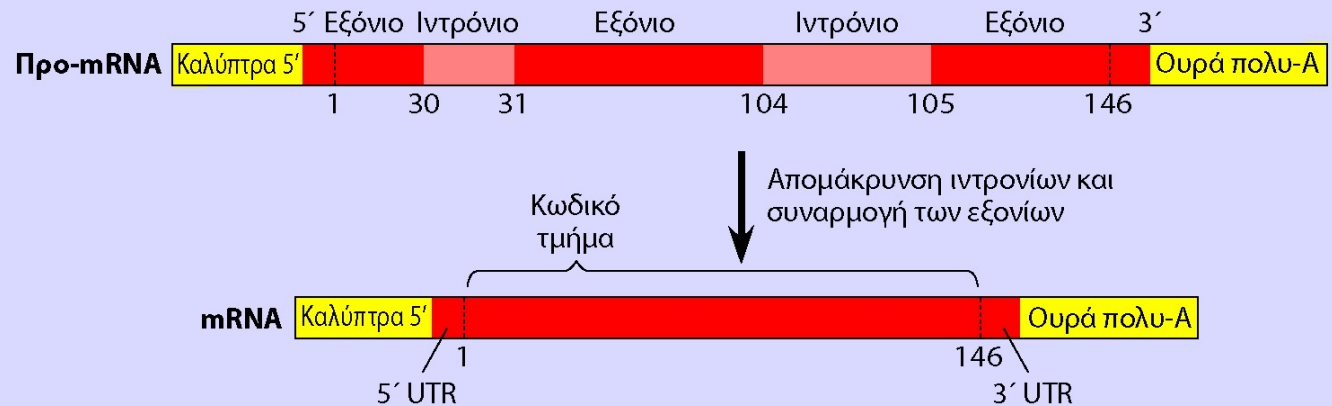
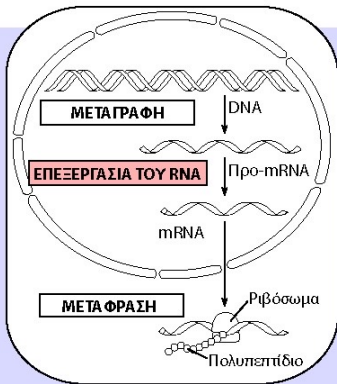
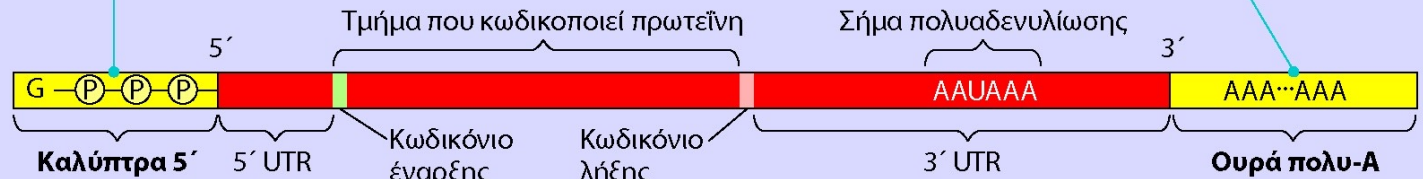


Επεξεργασία και συναρμογή του RNA (ευκαρυωτικοί οργανισμοί)

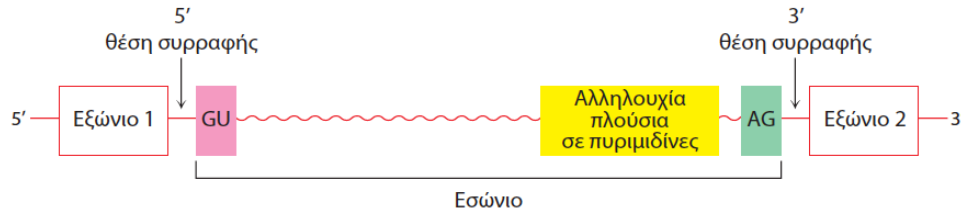


Στο άκρο 5' προστίθεται ένα τροποποιημένο νουκλεοτίδιο γουανίνης

Προσθήκη 50 έως 250 νουκλεοτιδίων αδενίνης στο άκρο 3'

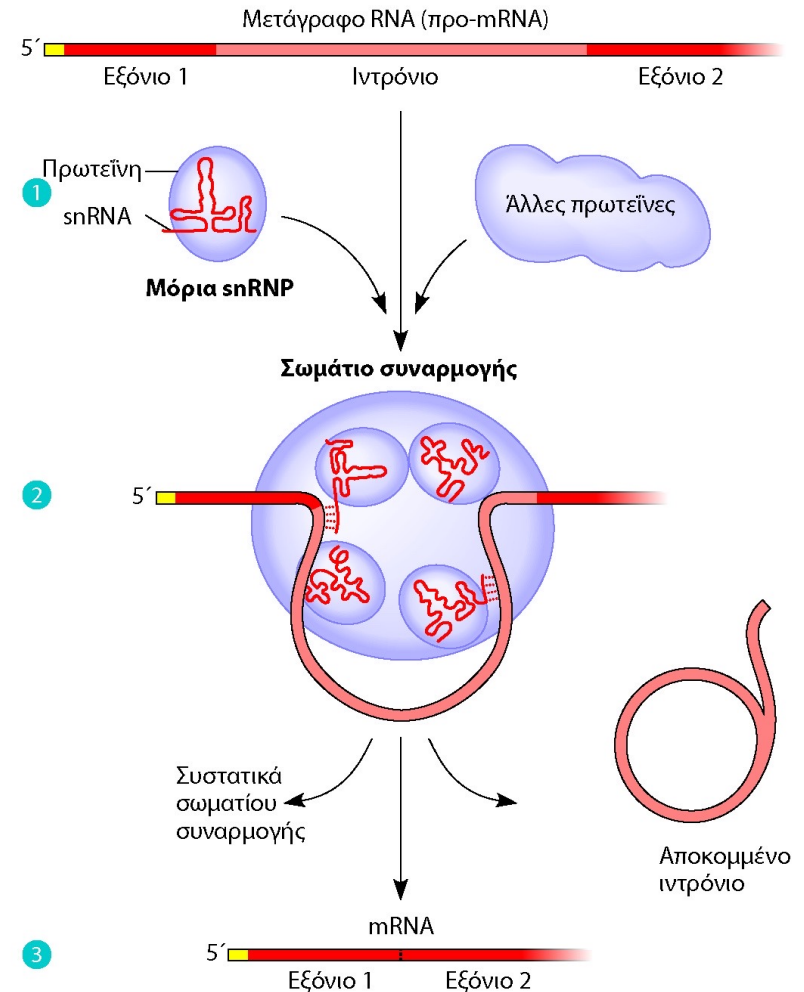


Επεξεργασία και συναρμογή του RNA (ευκαρυωτικοί οργανισμοί)

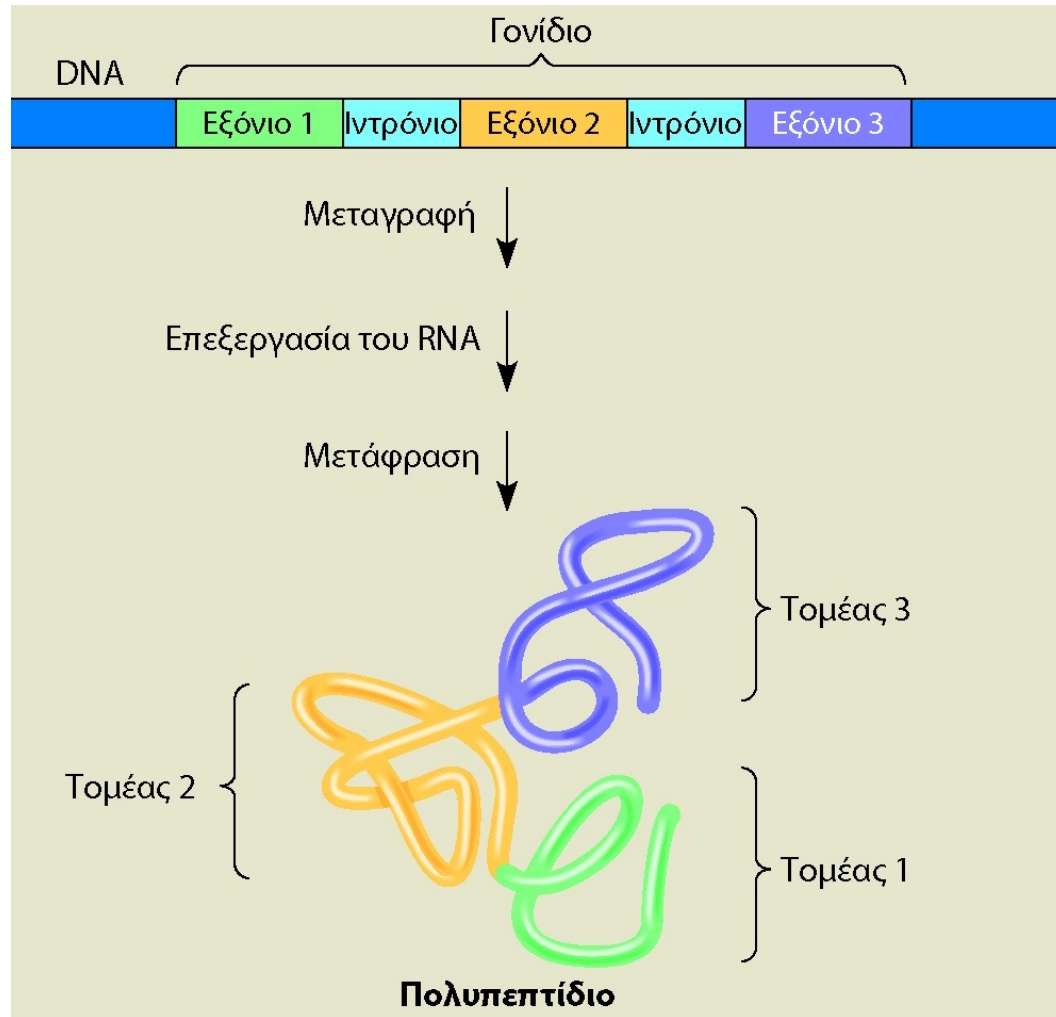


Αναγνώριση του εσωνίου από
συγκεκριμένες αλληλουχίες.

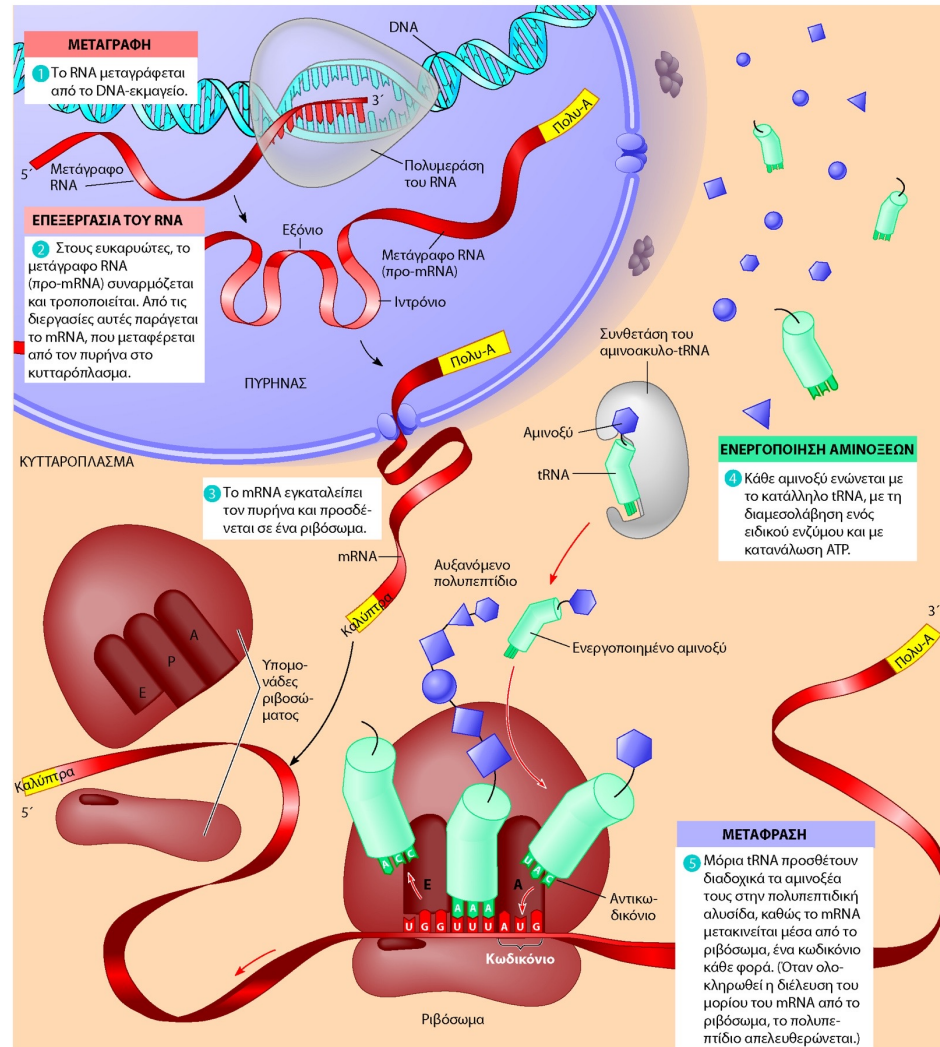
snRNP: μικρές πυρηνικές
ριβονουκλεοπρωτεΐνες

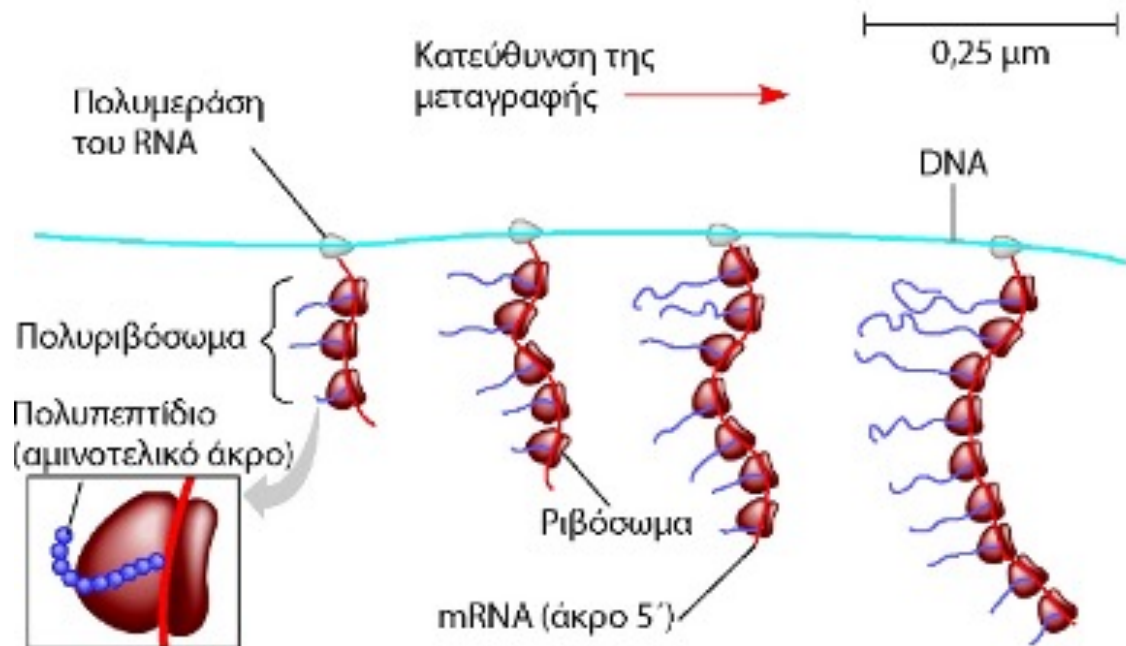
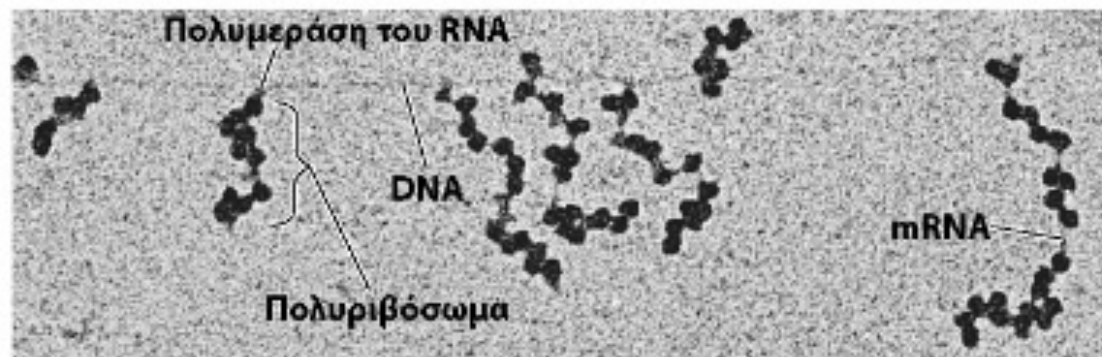


Συσχετισμός εξωνίων – πρωτεΐνης

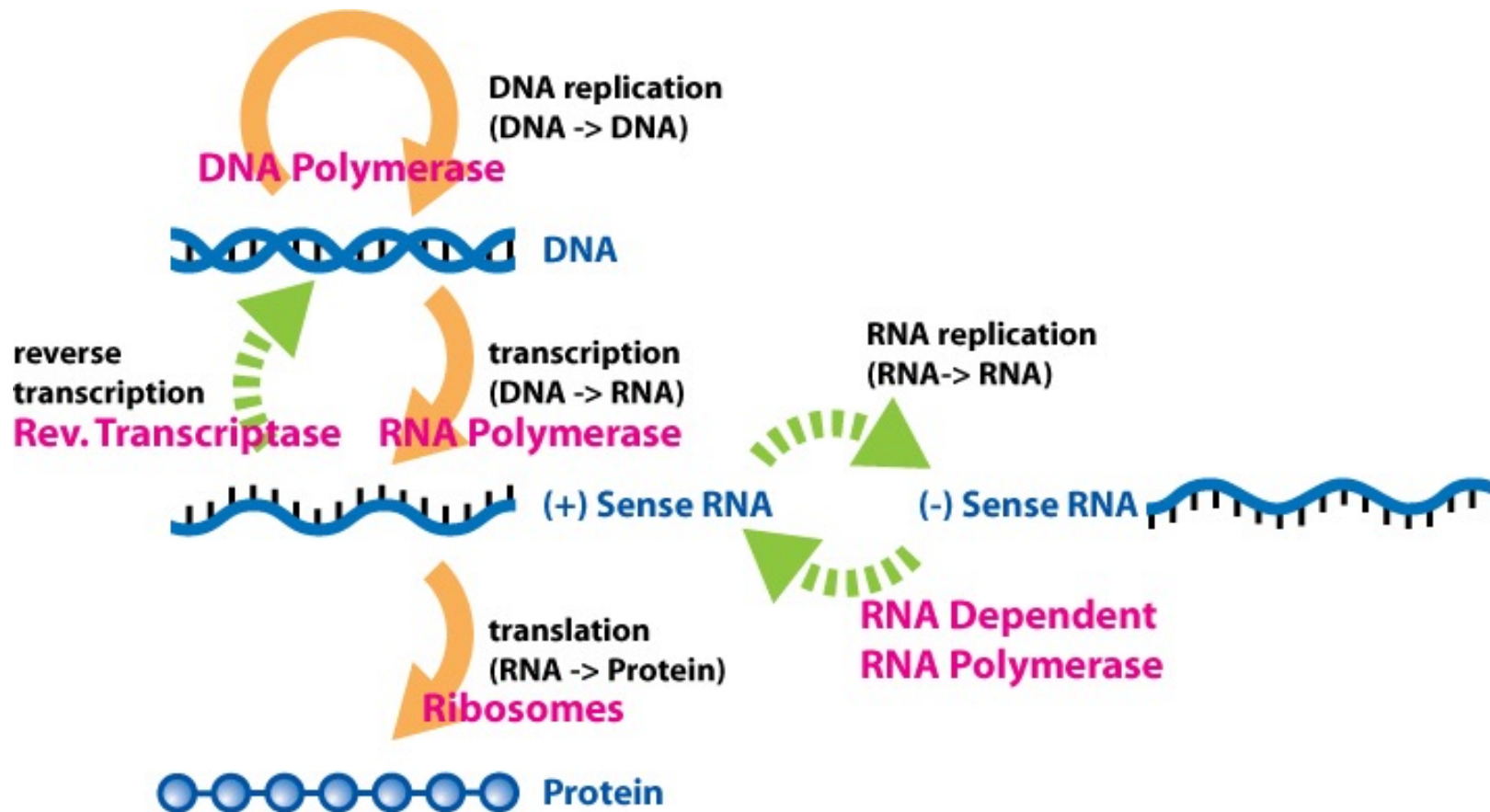


Μεταγραφή και μετάφραση (ευκαρυωτικά κύτταρα)



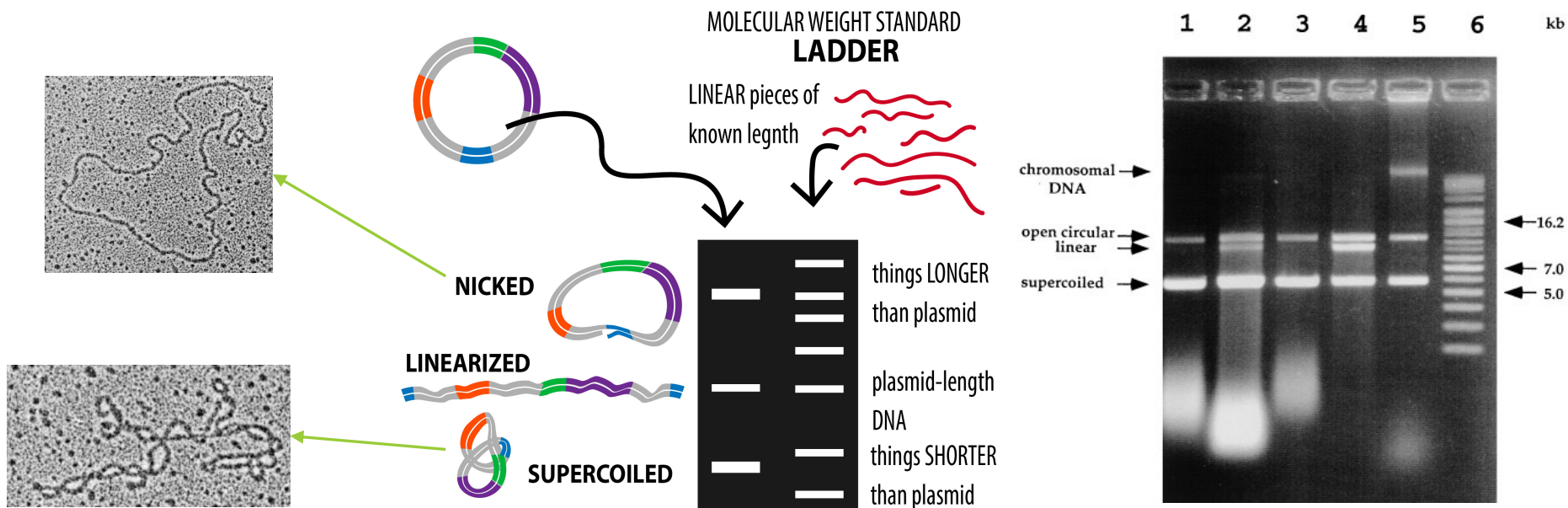


Το κεντρικό δόγμα αναθεωρημένο



Πλασμίδια

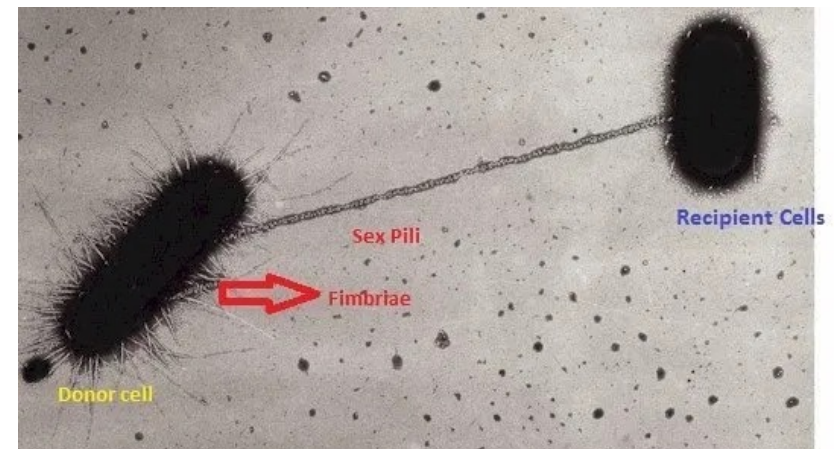
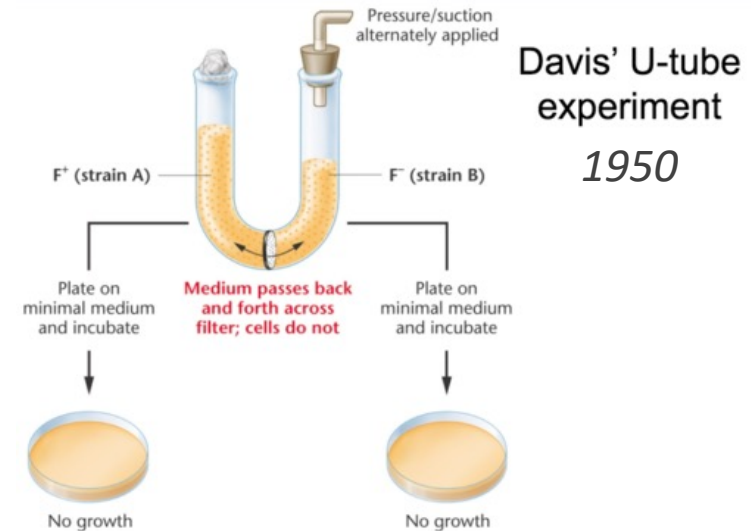
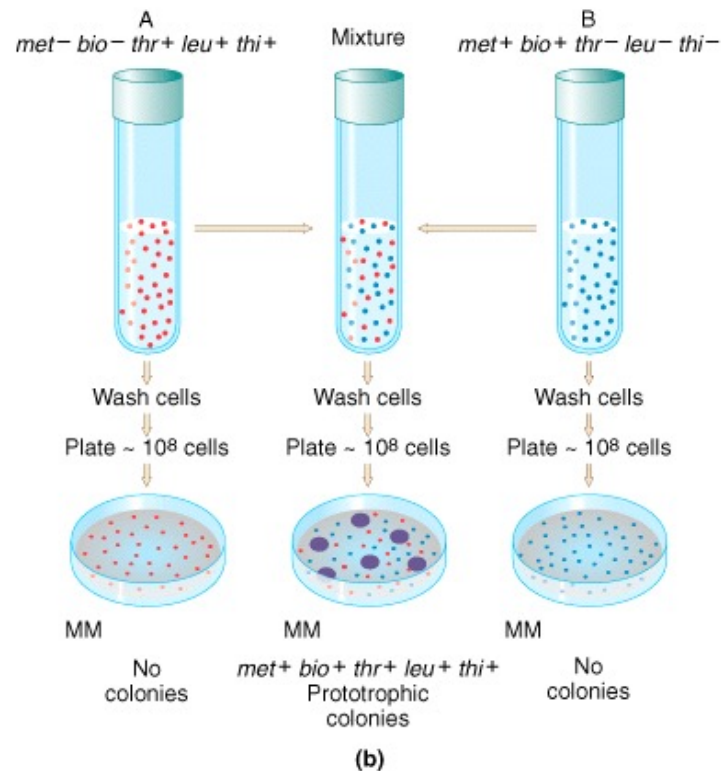
- ❖ Κυκλικά μόρια DNA, βακτηριακής προέλευσης
- ❖ Μεταθετά στοιχεία που μεταφέρουν δευτερογενή χαρακτηριστικά (ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, καταβολικά ένζυμα, τοξικές ενώσεις κ.ά.)
- ❖ Μπορούν να βρεθούν σε τρεις κύριες διαμορφώσεις



Πλασμίδια

- ❖ Μέγεθος 2-100 kb
- ❖ Αυτόνομη αναπαραγωγή (*ori*)
- ❖ Ανάλογα το *ori* κάθε κύτταρο μπορεί να έχει από 2 έως 50 αντίγραφα (low copy, high copy vectors)
- ❖ Ασυμβατότητα μεταξύ πλασμιδίων
- ❖ Ταυτοποιήθηκαν από την μεταφορά αντοχής σε αντιβιοτικά μεταξύ βακτηρίων μέσω σύζευξης
- ❖ Τρεις μηχανισμοί μεταφοράς: σύζευξη, μεταγωγή, μετασχηματισμός
- ❖ Τέλειος φορέας για μεταφορά DNA σε άλλο οργανισμό

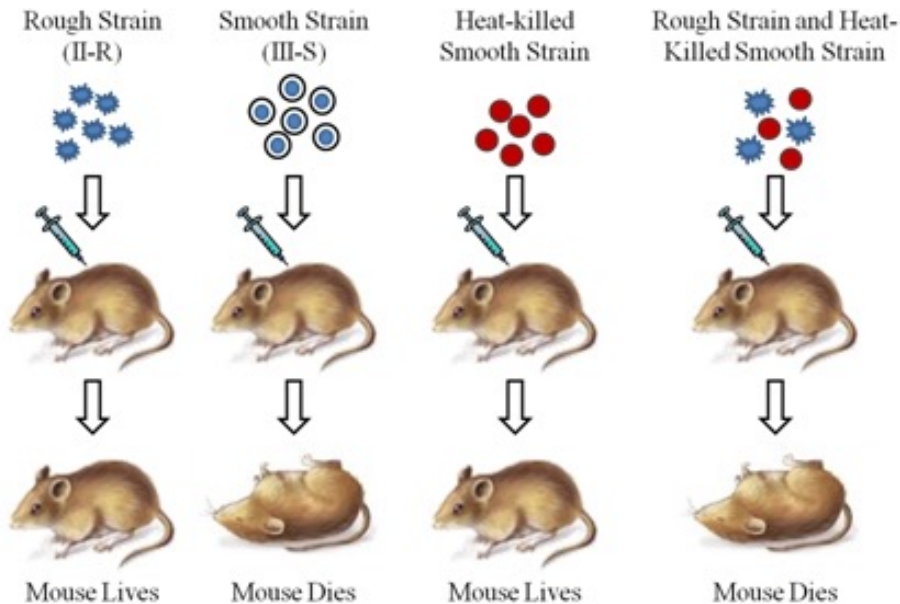
Πλασμίδια – σύζευξη



Πλασμίδια - μετασχηματισμός

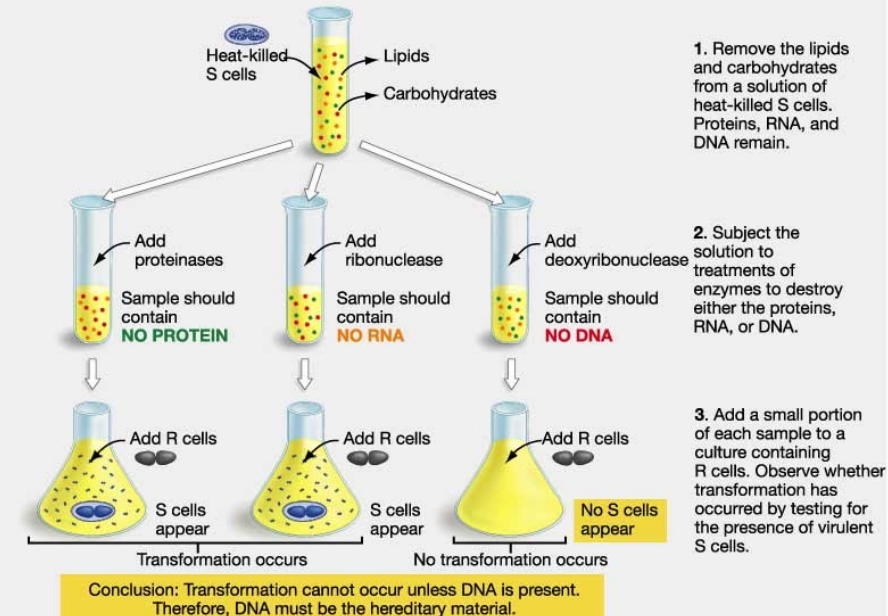
Πείραμα του Griffith, 1928

Χρήση στελεχών πνευμονιόκοκκου



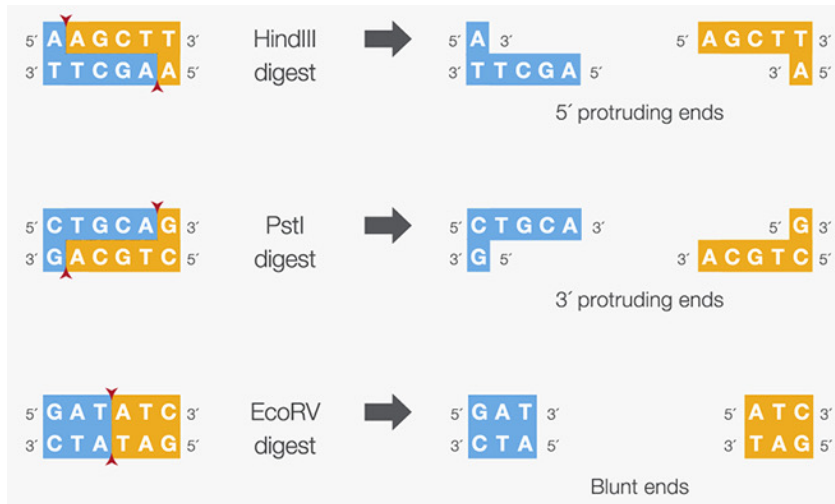
Πείραμα των Avery, MacLeod, McCarty, 1944

DETERMINING THAT DNA IS THE HEREDITARY MATERIAL



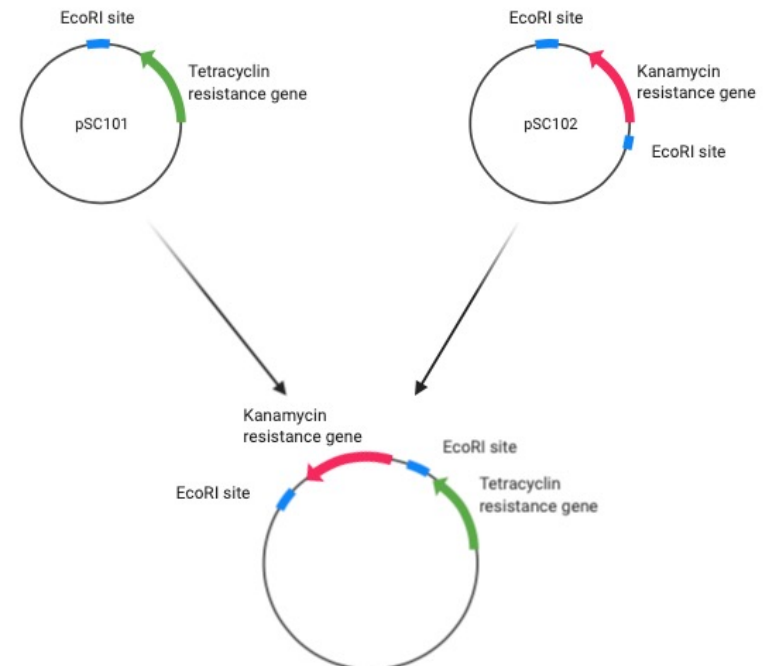
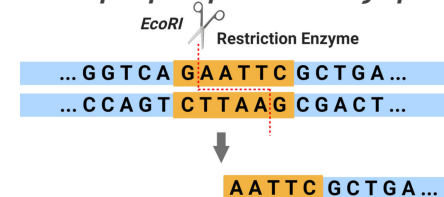
Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

- ❖ Ένζυμα που αναγνωρίζουν αλληλουχίες και κόβουν νουκλεϊκά οξέα
- ❖ Αναγνώριση παλινδρομικών αλληλουχιών
- ❖ 4 Τύποι, ανάλογα με το που και τι κόβουν
- ❖ Κολλοειδή ή τυφλά άκρα

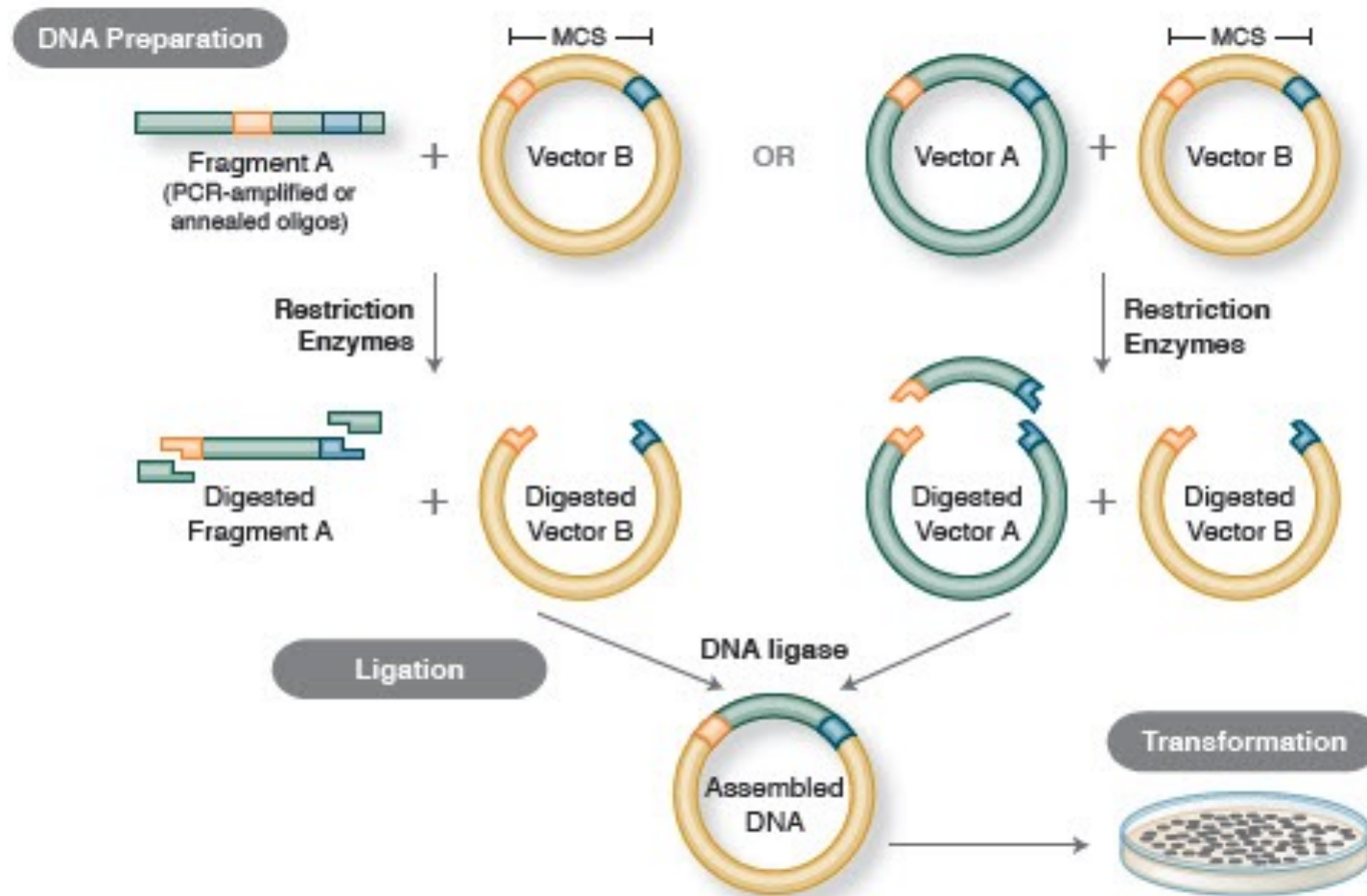


Cohen & Boyer, 1973

Πρώτο πείραμα με το ένζυμο *EcoRI*

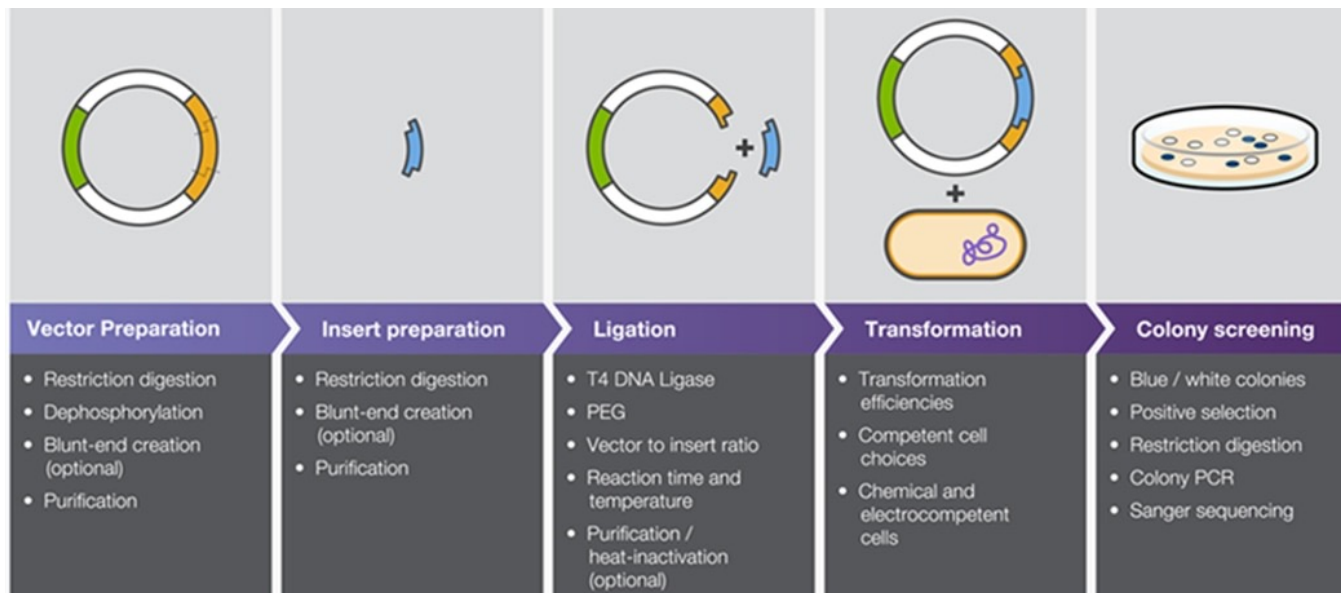


Κλωνοποίηση γονιδίων



Σημαντικά ένζυμα για κλωνοποίηση

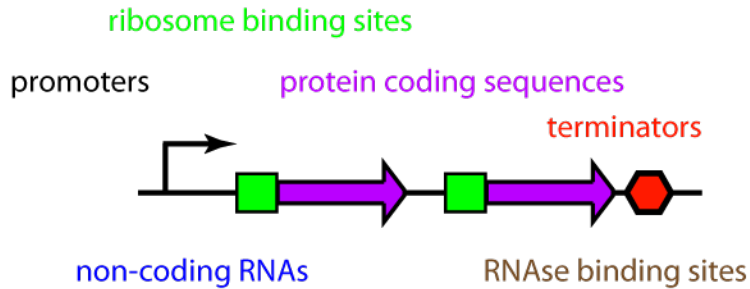
- ❖ **DNA πολυμεράση:** Αντιγραφή DNA (υψηλής πιστότητας, τύπου III)
- ❖ **Περιοριστικά ένζυμα:** αναγνώριση αλληλουχιών και λύση (5' φωσφορυλιωμένο)
- ❖ **Αλκαλική φωσφατάση:** Αποφωσφορυλιώνει το 5' - άκρο
- ❖ **Λιγάση:** Σύνδεση γειτονικών άκρων DNA (5' με 3') με χρήση ATP



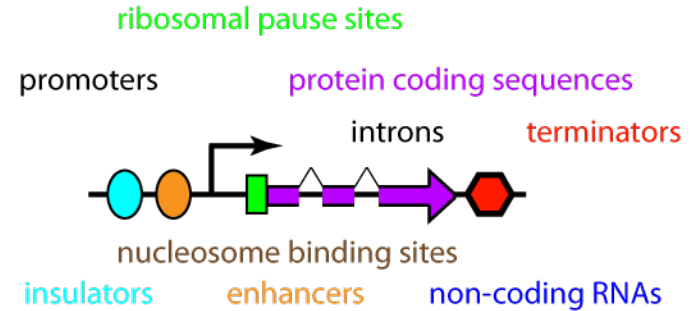
Ορολογία

- ❖ **Γονίδιο:** Μονάδα κληρονομικότητας που καταλαμβάνει έναν ειδικό τόπο
- ❖ **Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame):** Πιθανό πλαίσιο ανάγνωσης DNA που μπορεί να μεταφραστεί σε πρωτεΐνη
- ❖ **Οπερόνιο (operon):** Ομάδες βακτηριακών γονιδίων με ίδιο υποκινητή
- ❖ **Υποκινητής (promoter):** Περιοχή DNA όπου προσδένεται η RNA πολυμεράση
- ❖ **Τερματιστής (terminator):** Αλληλουχία DNA που αναγκάζει την RNA πολυμεράση να διακόψει την μεταγραφή
- ❖ **RBS (ribosome binding site):** Αλληλουχία πρόσδεσης στο RNA που θα προσδεθεί το ριβόσωμα.

Γονίδιο

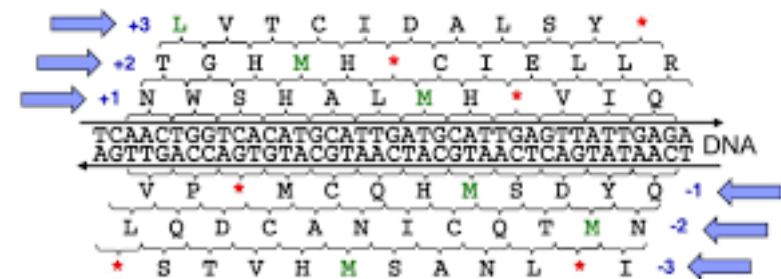


Prokaryotic Genetic Parts

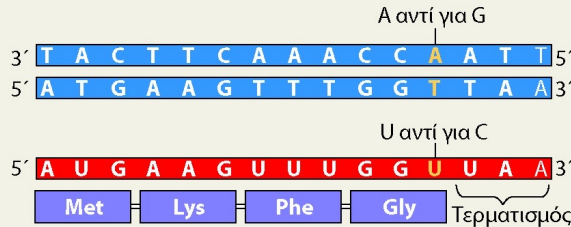
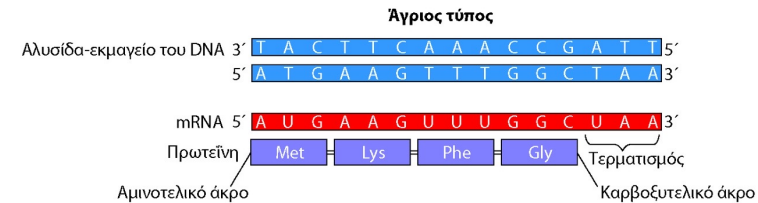


Eukaryotic Genetic Parts

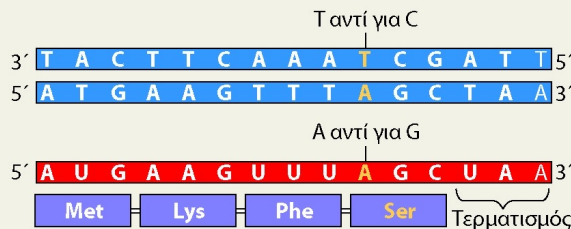
- ❖ Όλα τα στοιχεία είναι απαραίτητα για την έκφραση μίας πρωτεΐνης
- ❖ 6 πλαίσια ανάγνωσης ανά δίκλωνο DNA
- ❖ Προσοχή στην κλωνοποίηση για την χρήση σωστού πλαισίου ανάγνωσης



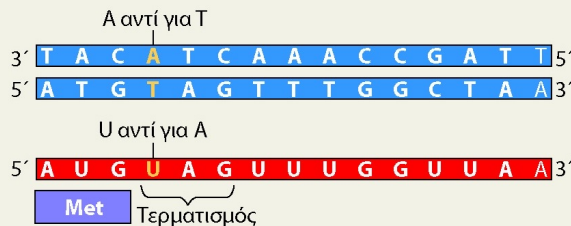
Τύποι μεταλλάξεων



Σιωπηρή μετάλλαξη (καμιά επίδραση στην ακολουθία των αμινοξέων)

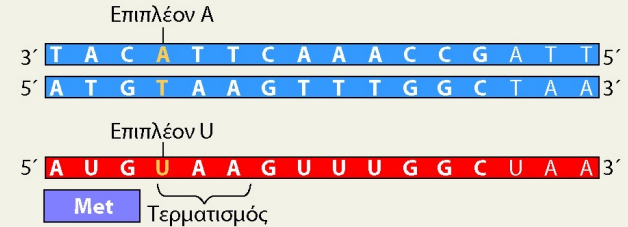


Παρανοηματική μετάλλαξη

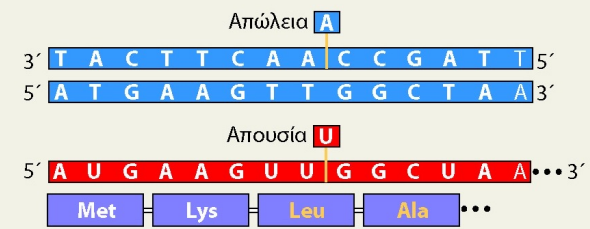


Μη νοηματική μετάλλαξη

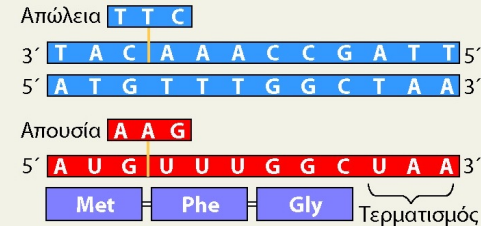
(α) Αντικατάσταση ζεύγους βάσεων



Μετατόπιση πλαισίου που προκαλεί αμέσως μη νοηματική μετάλλαξη (ένθεση 1 ζεύγους βάσεων)



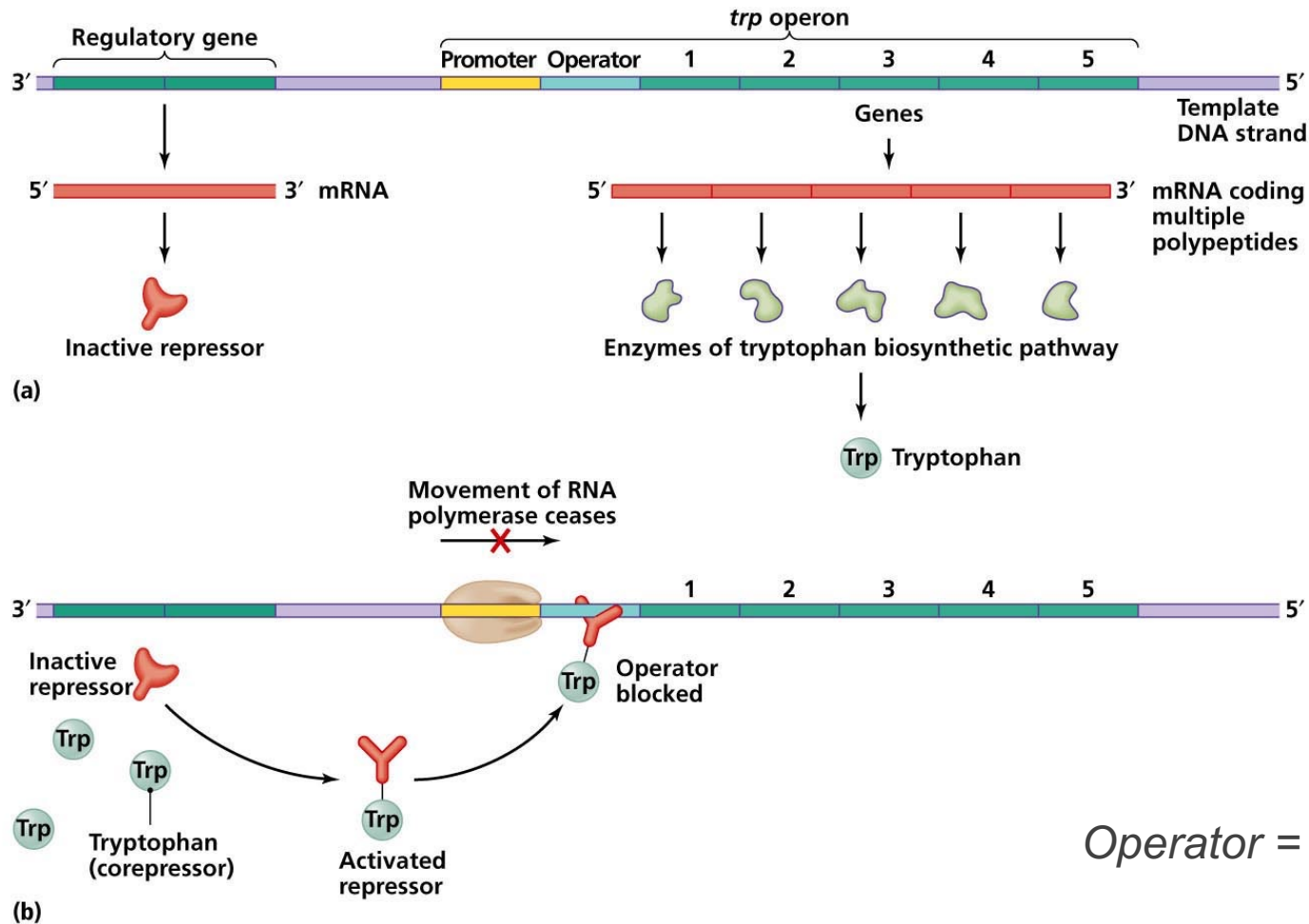
Μετατόπιση πλαισίου που προκαλεί πλήθος παρανοηματικών μεταλλάξεων (έλλειμμα 1 ζεύγους βάσεων)



Το αναγνωστικό πλαίσιο δεν μετατοπίζεται, αλλά απουσιάζει 1 αμινοξύ (έλλειμμα 3 ζευγών βάσεων). Αν συνέβαινε ένθεση 3 ζευγών βάσεων (δεν παρουσιάζεται), θα υπήρχε ένα επιπλέον αμινοξύ.

(β) Ένθεση ή έλλειμμα ζεύγους βάσεων

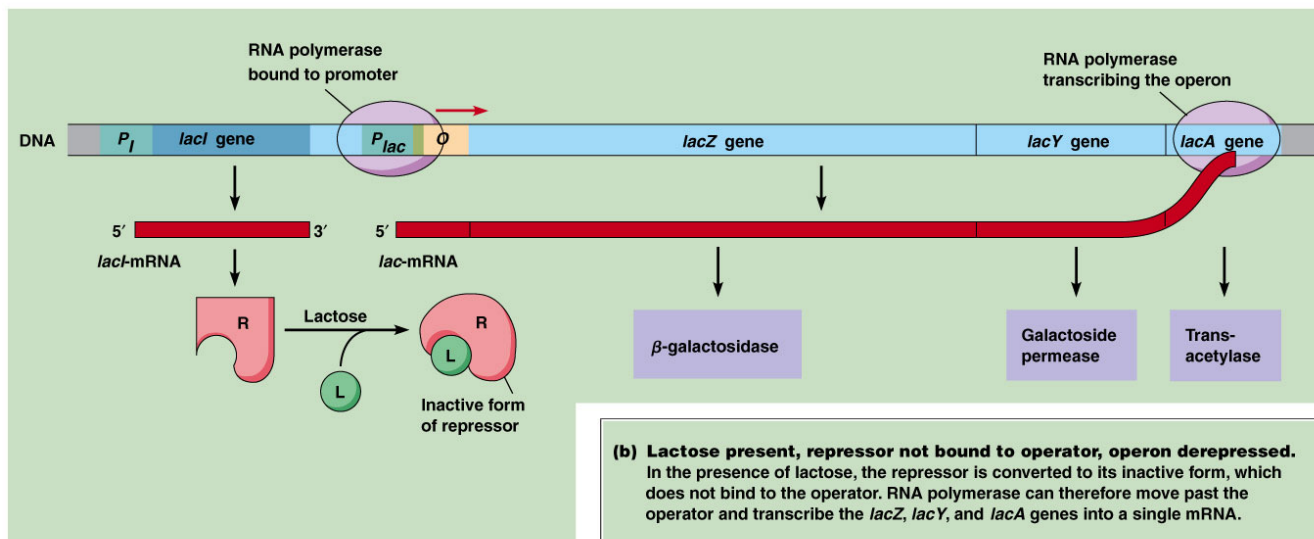
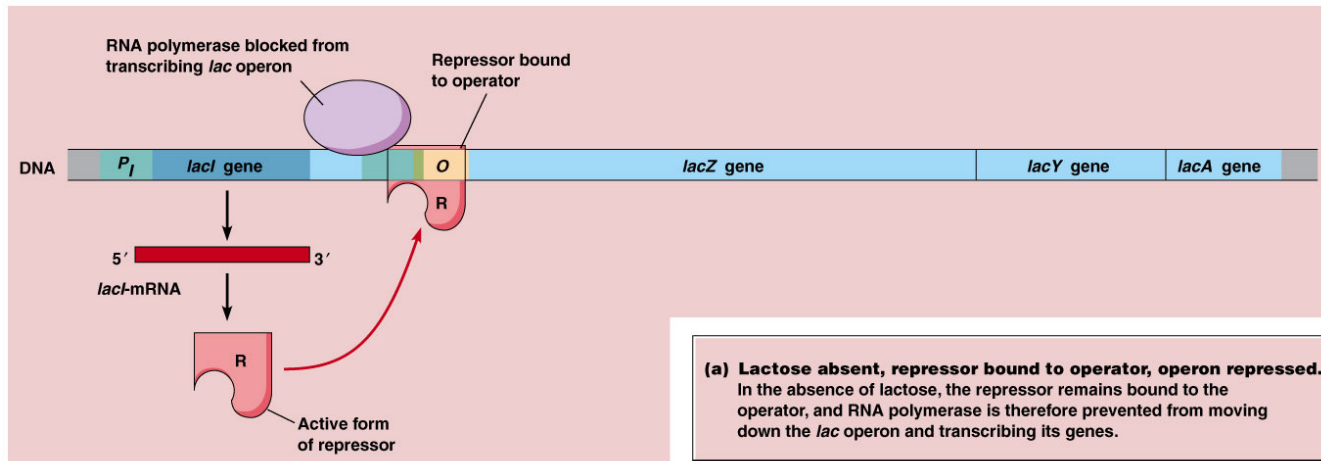
Αρνητικός έλεγχος οπερονίου



Operator = χειριστής

Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Θετικός έλεγχος σπερονίου



© 2012 Pearson Education, Inc.

Ενδεικτική Βιβλιογραφία

Textbooks γενετικής, μοριακής βιολογίας και κυτταρικής βιολογίας.

Ενδεικτικά:

- ❖ Watson et al. «Μοριακή βιολογία του γονιδίου» (2017 2^η έκδοση), Εκδόσεις Utopia
- ❖ Alberts B. «Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας» (2018, 4^η έκδοση), Εκδόσεις Πασχαλίδης
- ❖ Lewin B. « Γονίδια, Χ» (2012, 10^η έκδοση), Εκδόσεις Πασχαλίδης