

Химические основы биологических процессов

**Тишков
Владимир Иванович**

zamdekana07@gmail.com

комната 210 корпуса кафедры химической энзимологии



В.И. Тишков

**“Поиск и получение
биокатализаторов в
постгеномную эпоху”**

**Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
Химический факультет**



ФЕРМЕНТЫ. ПРЕИМУЩЕСТВА

**Ферменты – в основном
белковые молекулы,
которые катализируют
химический реакции с
невероятной для обычной
химии активностью и
специфичностью**



БИОКАТАЛИЗАТОРЫ

Ферменты (или их смеси)

Пищевая промышленность
Фармацевтическая
промышленность
Тонкий органический синтез
Аналитическая биотехнология
Наука
Медицина
Текстильная промышленность
Целлюлозно-бумажная
промышленность

Более 99% используемых ферментов
являются рекомбинантными !!!

Целые клетки

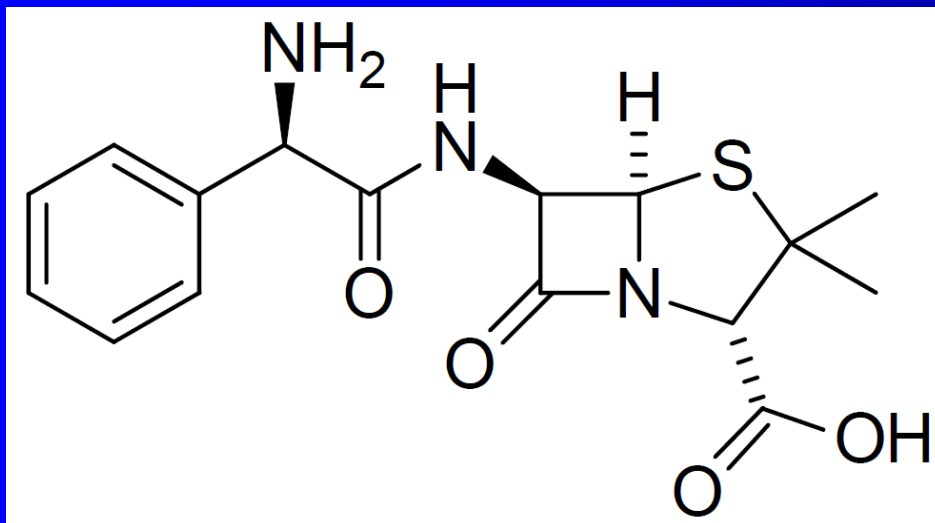
Пищевая промышленность
Фармацевтическая
промышленность
Тонкий органический синтез
Аналитическая биотехнология
Наука
Охрана окружающей среды
Крупнотоннажный синтез
органических соединений

Более 85% используемых промышленных
штаммов получены с помощью
методов классической селекции !!!

ФЕРМЕНТЫ. НЕДОСТАТКИ

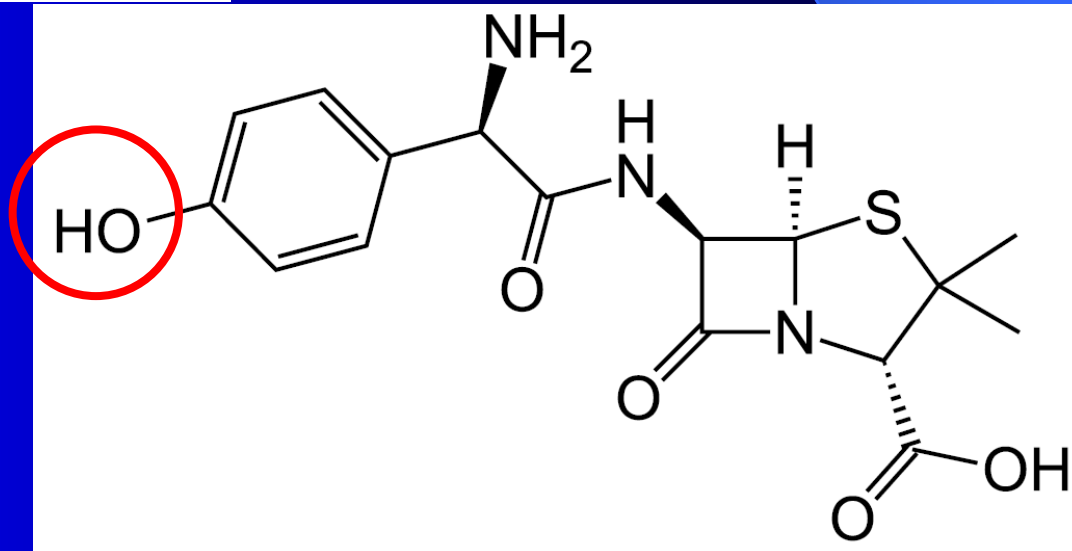
- 1. Как правило, ферменты высокоактивны и селективны с природными молекулами и очень часто малоактивны с их аналогами**
- 2. Оптимальные условия активности большинства ферментов далеки от оптимальных условий реального процесса**
- 3. Даже самый активный фермент имеет предел эффективности**
- 4. Проблема операционной и температурной стабильности**

Субстратная специфичность ферментов. Пенициллинацилаза *E.coli*



ампициллин

амоксициллин



Что делать???!!!!

Что делать????!!!

**Создавать новые
биокатализаторы с
нужными свойствами**

The Ideal Biocatalyst - a new paradigm

Conventional design

NON-IDEAL CATALYST



REACTION CONSTRAINTS

IDEAL design paradigm

REACTION CONSTRAINTS



SEARCH FOR THE IDEAL CATALYST

Ферменты – создание «идеального биокатализатора»

- Оптимизация экспрессии в штамме-хозяине
- Увеличение каталитической активности
- Изменение рН-оптимума активности
- Изменение субстратной и (или) коферментной специфичности
- Повышение термостабильности
- Повышение «операционной» стабильности
- Адаптация к органическим растворителям и другим нетрадиционным средам

Ферменты – создание «идеального биокатализатора»

- Поиск и выбор исходного фермента
- Создание штамма – продуцента рекомбинантного белка
- Оптимизация условий культивирования для достижения максимального выхода.
- Изменение свойств

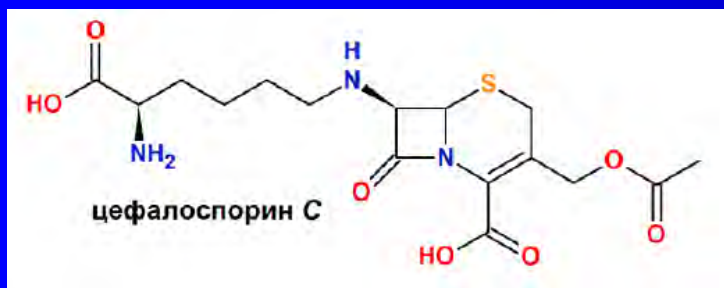
Исходный фермент: формиатдегидрогеназа *Pseudomonas* sp.101 vs *Candida boidinii*

Параметр	wt-PseFDH	wt-CboFDH
Удельная активность, U/mg	10.0	6.3
Относительная термостабильность	200	1
Предпочтение NAD ⁺ /NADP ⁺	2 300	300 000
Устойчивость к органическим растворителям	очень высокая	низкая
Устойчивость к протеазам	очень высокая	умеренная

Поиск и выбор исходного фермента

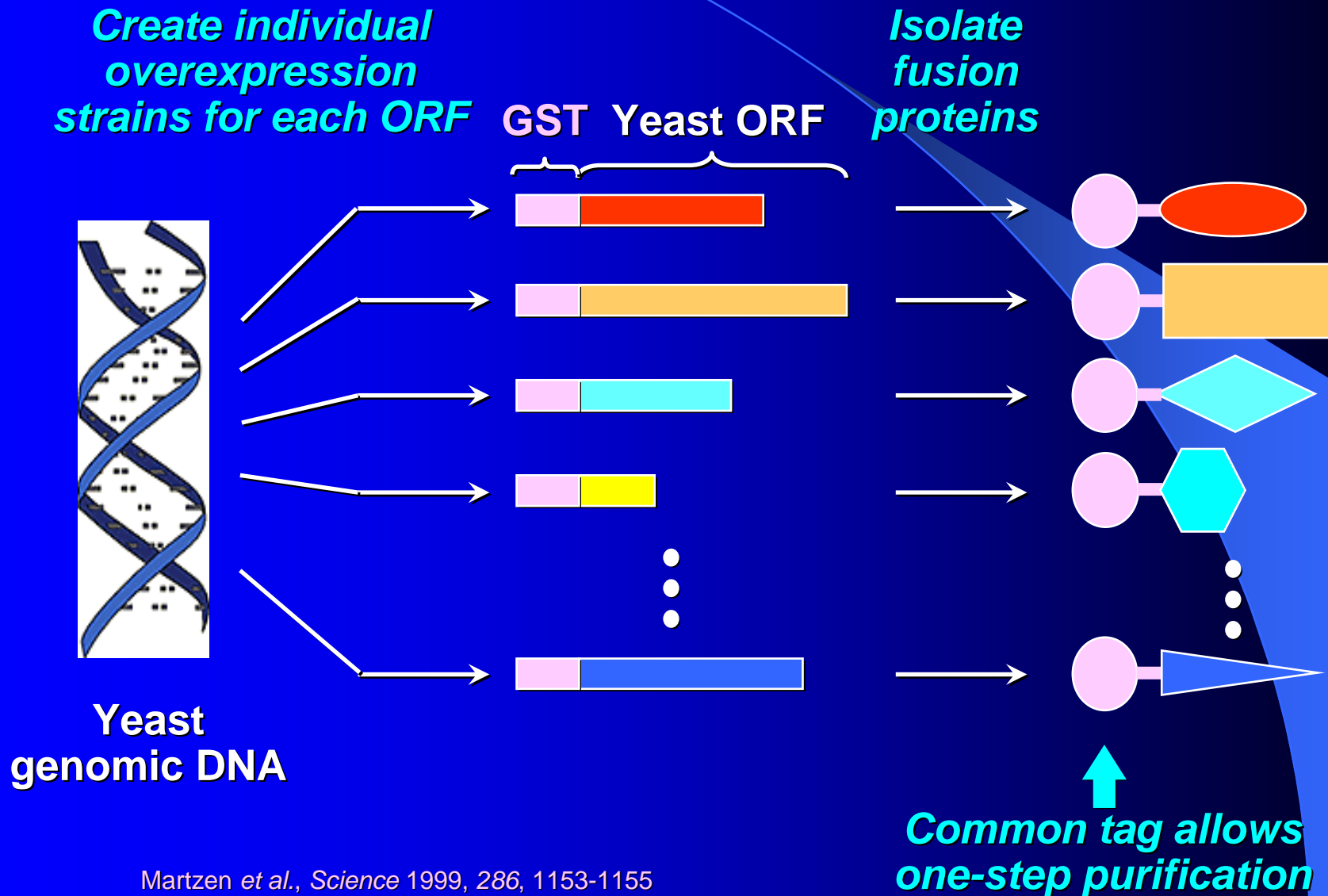
- **Классический скрининг**
 - длительный по времени и трудоемкий
 - малая предсказуемость успеха
 - проблема «молчащих» генов
- **“Genome mining”**
 - в настоящее время определены последовательности нескольких тысяч геномов, большинство – в открытом доступе
- **Genome screening**
 - поиск на основе известных последовательностей в геноме отдельно выделенных организмов
- **Metagenome screening**
 - решается проблема некультивируемых микроорганизмов

Анализ последовательностей в банках данных



<i>T. variabilis</i>	INQRSHVLKRDLPK-LEGAMS-AICQRNPWFKN	TVDSFEI
<i>N. crassa</i>	QKAVLYRRAQDEAAGFAGPLSDGLFVRNPWYKDLVP--DY	
<i>F. solani</i>	QKSRIQRNRVDTEKAQRSGFDPALFSKEPWFKNMFE--DF	
<i>S. pombe</i>	ADLRELWEYEPKHD-----KIRSWNTYVVRDF	
	β6B	α4
	----->	<-----
<i>R. gracilis</i>	KGTRRFAQNE	DGLLGHW-----YKDITP--NY
<i>C. boidinii</i>	KPSTEYWDFY	PGDE-----KVNSLKQYLKDFK
<i>D. discoideum</i>	KKVNEIFRR	PHPED-----PEWKPYIKSFRR
<i>S. coelicolor</i>	LEGV-LGET	GLDEVDG-----WAAARLPGLR
<i>H. sapiens</i> DASPO	VSGWQIFQ	STPTEEV-----PFWADVVLGFRK
<i>A. protophormiae</i>	RRGLNVDH	LPGADRS-----WTRIVAGTEE
<i>M. musculus</i>	VSGWQIFR	SVPAEEV-----PFWADVVLGFRK
<i>D. melanogaster</i>	LSGYIYSRT	SPSIVRN-----HFIEKLLPVYRR
	β3B	α5 β1B
	----->	<-----<-----
<i>H. sapiens</i>	ISGYNLFHEA	IPD-----PSWKDTVLGFRK
<i>D. rerio</i>	QSGYNLCAETAAD-----PSFKDTVLGFRQ	
	β2B	
	----->	
Pig kidney	VSGYNLFREAVPD-----PYWKDMVLGFRK	
<i>O. cuniculus</i>	ISGYNLF	FRKAVPD-----PSWKDTVLGFRK
<i>C. elegans</i>	VSGHIQSDN	LESJKQQQ-----RAYGDIVYNFRF
<i>R. norvegicus</i>	ISGYNLF	RDEVPD-----PFWKSTVLGFRK
<i>M. leprae</i>	APAVTVGD	LPGANANG-----LAAKLIPDLRP

Mining of *S.cerevisiae* genome for search of new NAD(P)-specific dehydrogenases



Yeast Oxidoreductases

Aldose Reductases

YBR149w	<i>ARA1</i>	Native	GST
YDL124w	---	Native	GST
YDR368w	<i>YPR1</i>	Native	GST
YHR104w	<i>GRE3</i>	Native	
YJR096w	---	Native	GST
YOR120w	<i>GCY1</i>	Native	

Short-Chain Dehydrogenases

YCR107w	<i>AAD3</i>	Native	GST
YDR541c	---	Native	GST
YGL039w	---	Native	GST
YGL157w	---	Native	GST
YNL331c	<i>AAD14</i>	Native	GST
YOL151w	<i>GRE2</i>	Native	GST

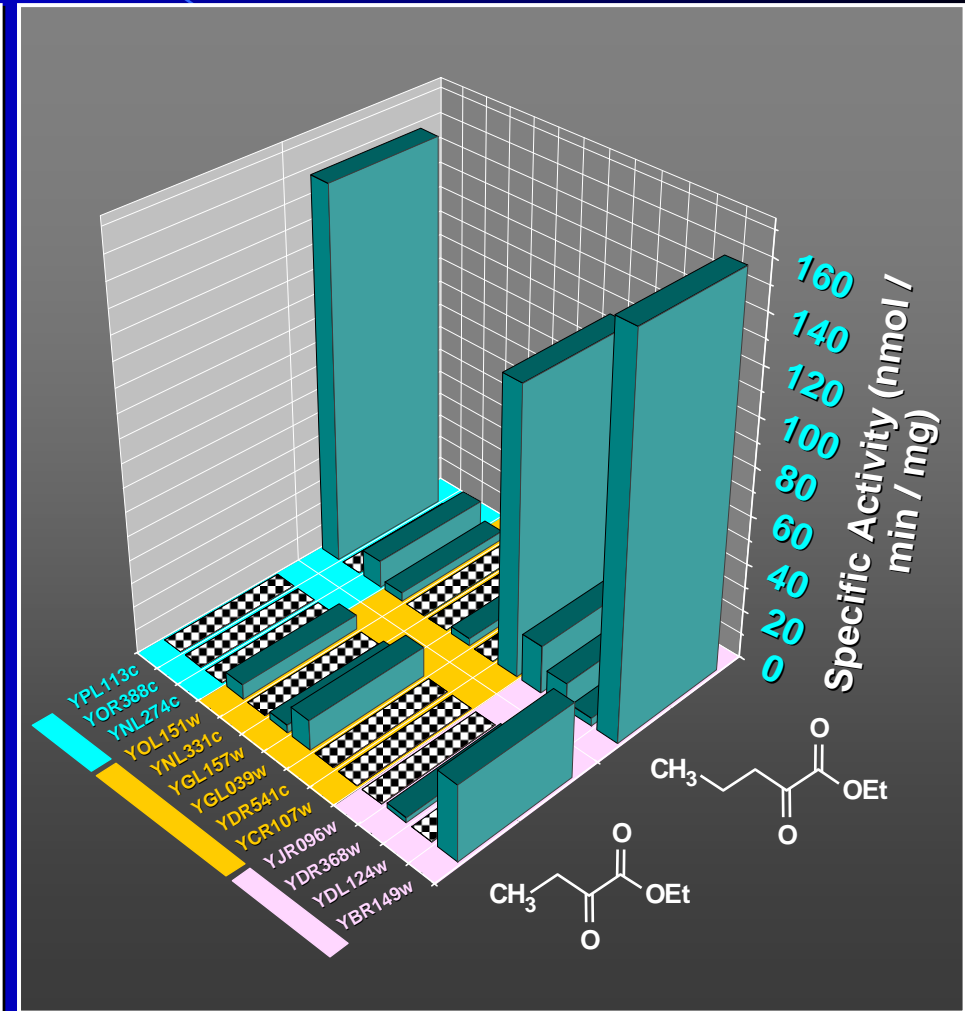
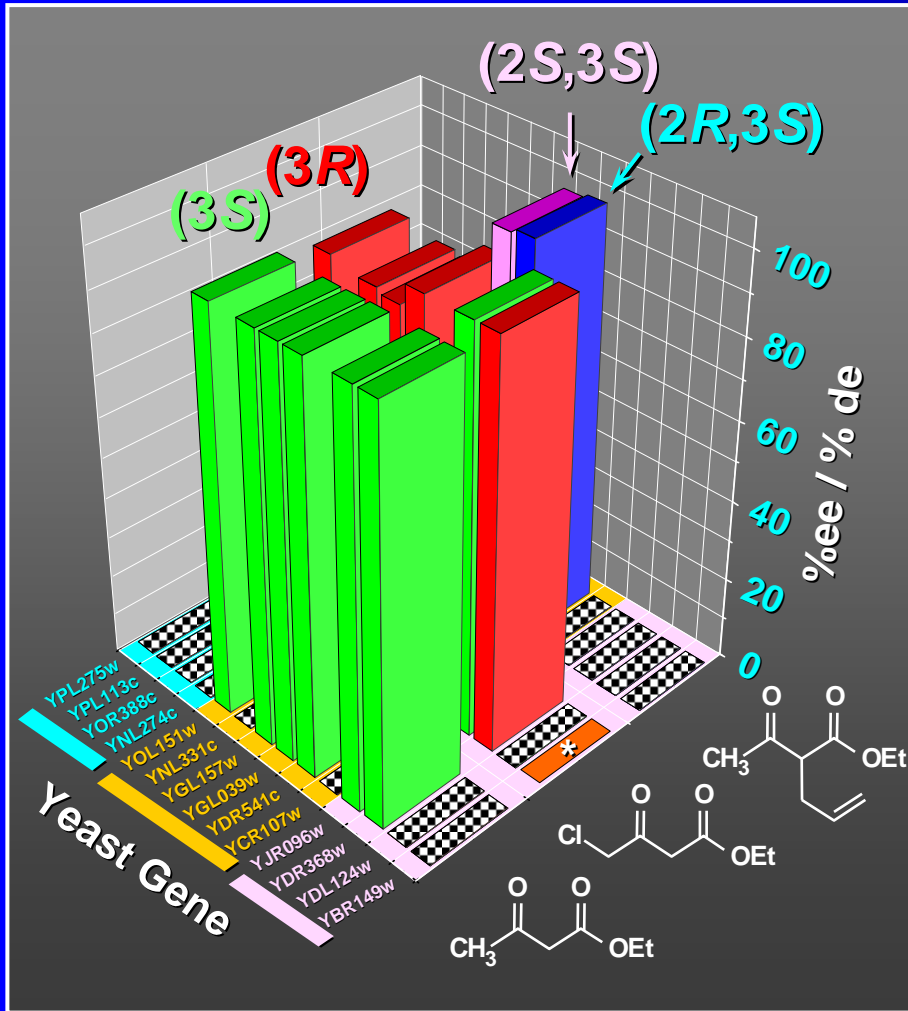
Medium-Chain Dehydrogenases

YAL060w	---	Native	GST
YAL061w	---	Native	GST
YCR105w	<i>ADH7</i>	Native	GST
YJR159w	<i>SOR1</i>		
YLR070c	<i>XYL2</i>	Native	GST
YMR318c	<i>ADH6</i>	Native	

D-Hydroxyacid Dehydrogenases

YGL185c	---	Native	GST
YNL274c	---	Native	GST
YOR388c	<i>FDH1</i>	Native	GST
YPL113c	---	Native	GST
YPL275w	<i>FDH2</i>	Native	GST

Standard Assays of Putative Yeast Reductases



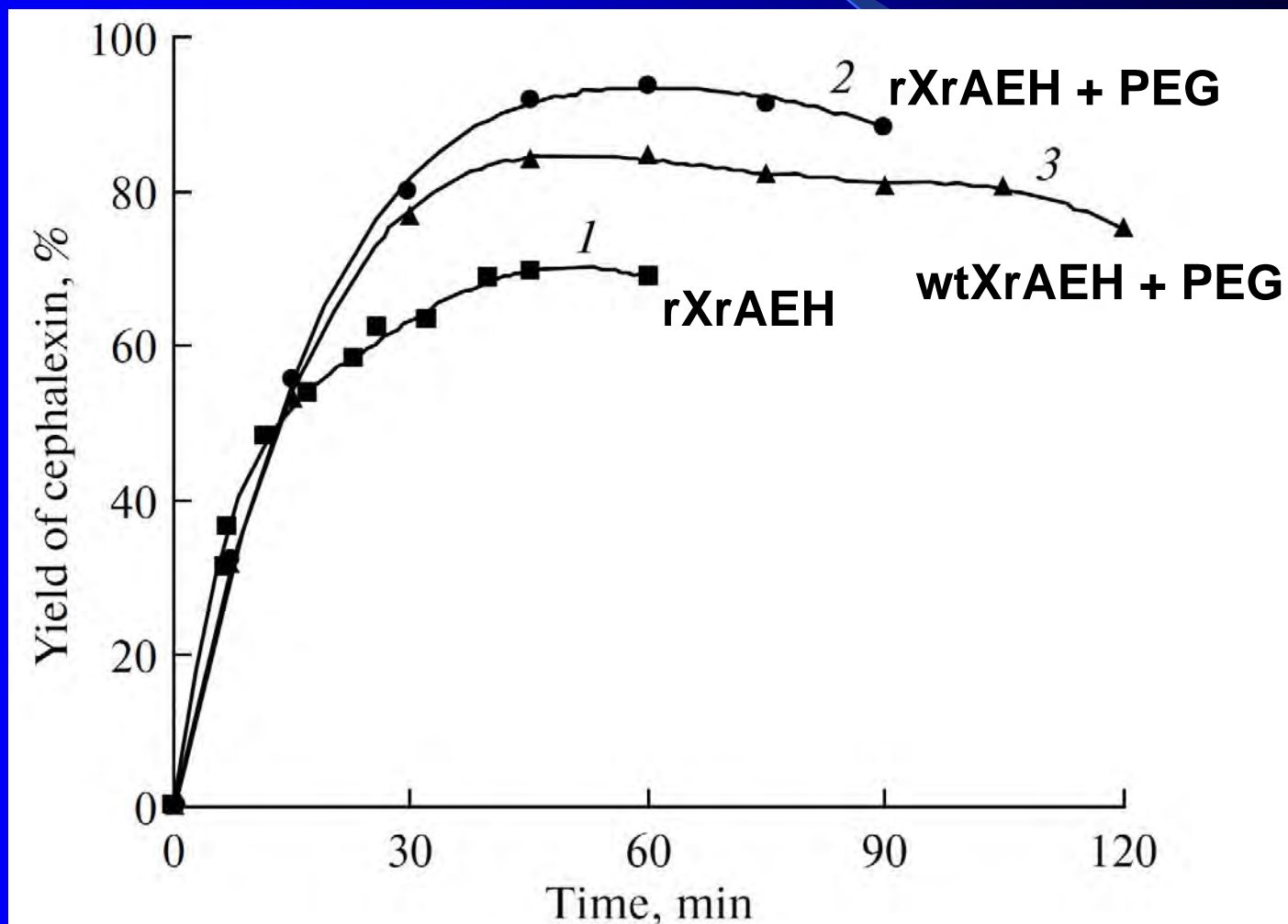
Новые ферменты для синтеза β -лактамных антибиотиков

Гидролаза эфиров α -D-аимнонокислот (АЕН)

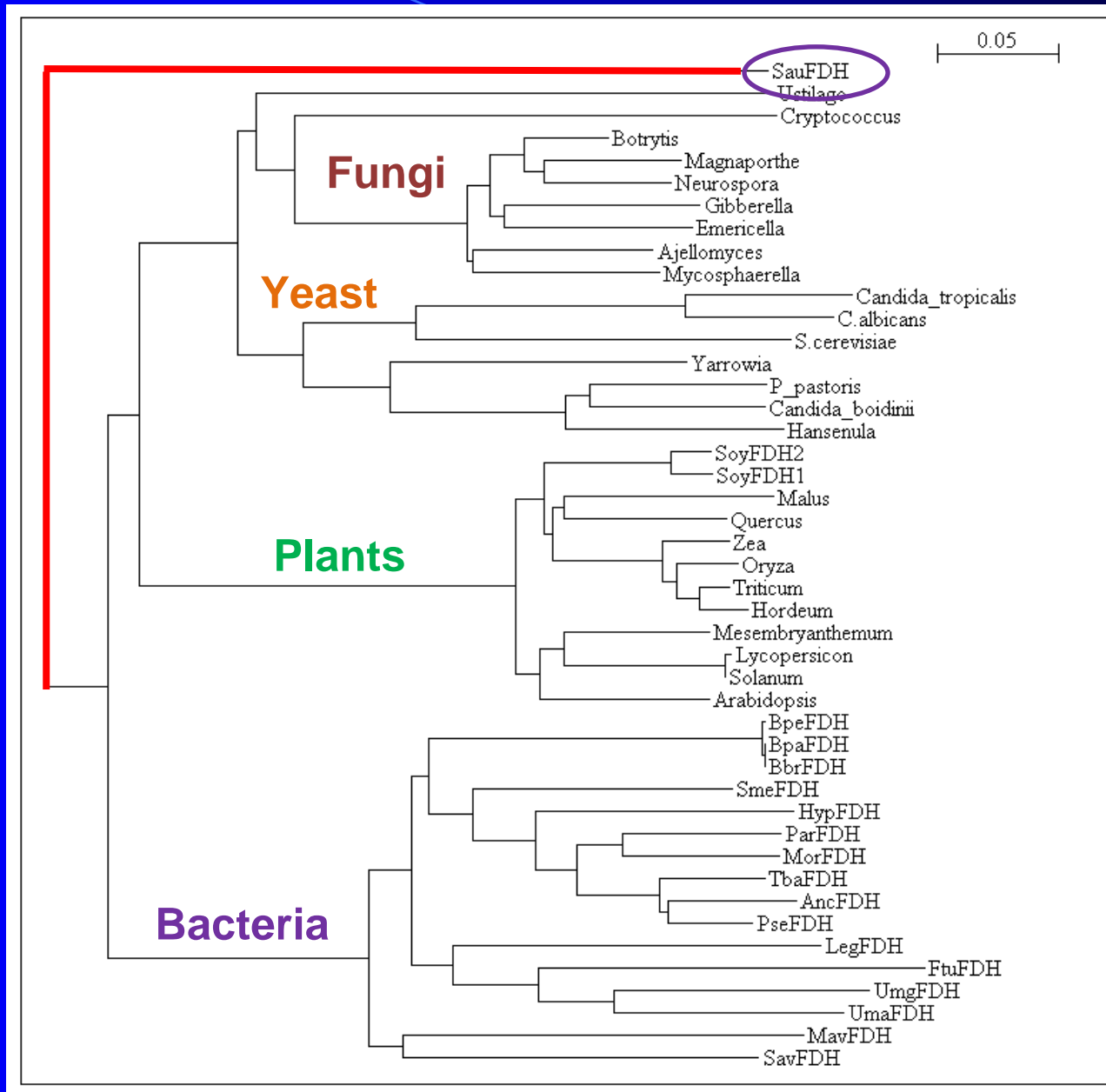
При сотрудничестве с лабораторией проф. С.В. Яроцкого



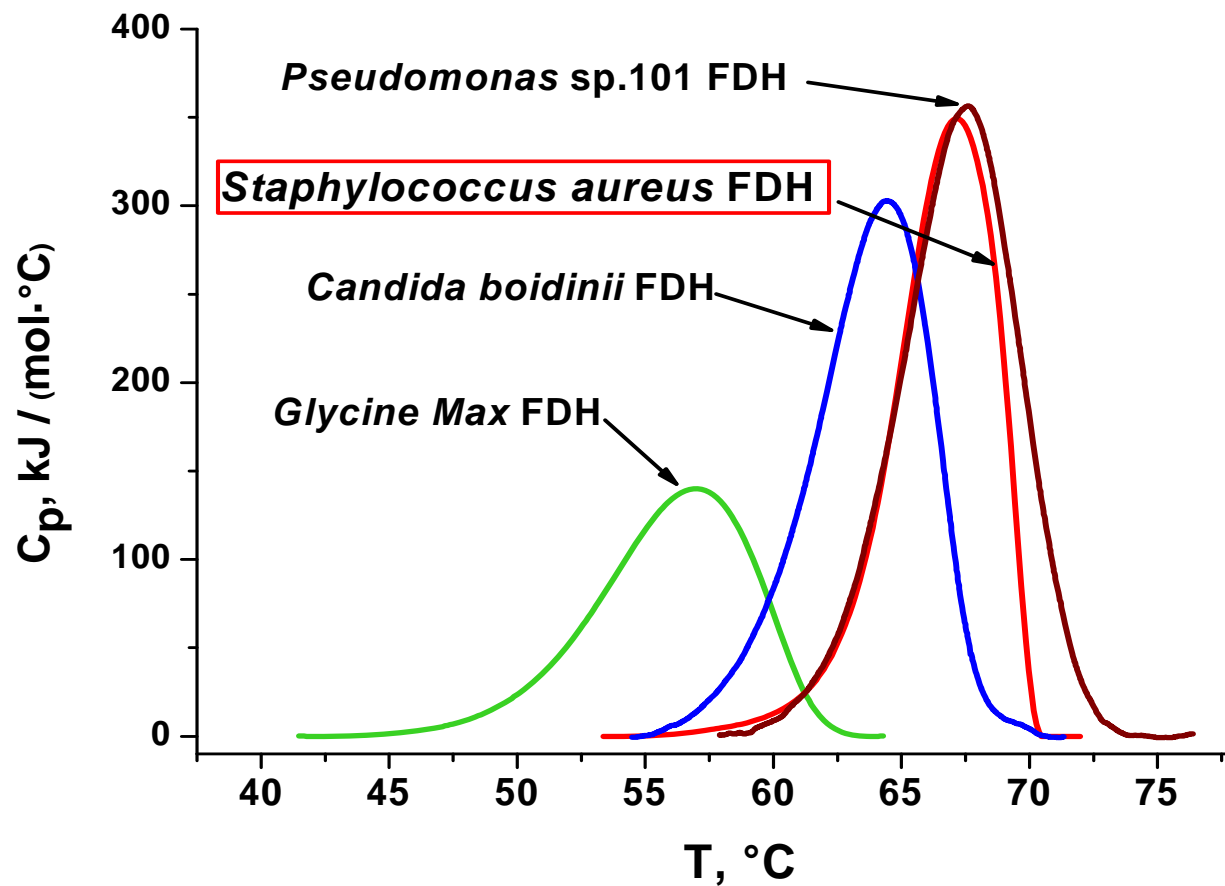
Comparison of yields in cephalalexin synthesis with wild-type and recombinant XrAEH



ФДГ из *Staphylococcus aureus*



Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) различных формиатдегидрогеназ



Enzyme	T_{max}
PseFDH	67.6
SauFDH	67.1
CboFDH	64.4
SoyFDH	57.0



Клонирование новой формиатдегидрогеназы из термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1 (*Hansenula polymorpha*)

- Принадлежат к ограниченному числу метилотрофных дрожжей
- Термотолерантный организм
- Используется как одна из основных «фабрик»

Рекомбинатных ферментов



Хромосомная ДНК была любезно предоставлена сотрудниками лаборатории проф. О.А. Донцовой (НИИ ФХБ, МГУ)



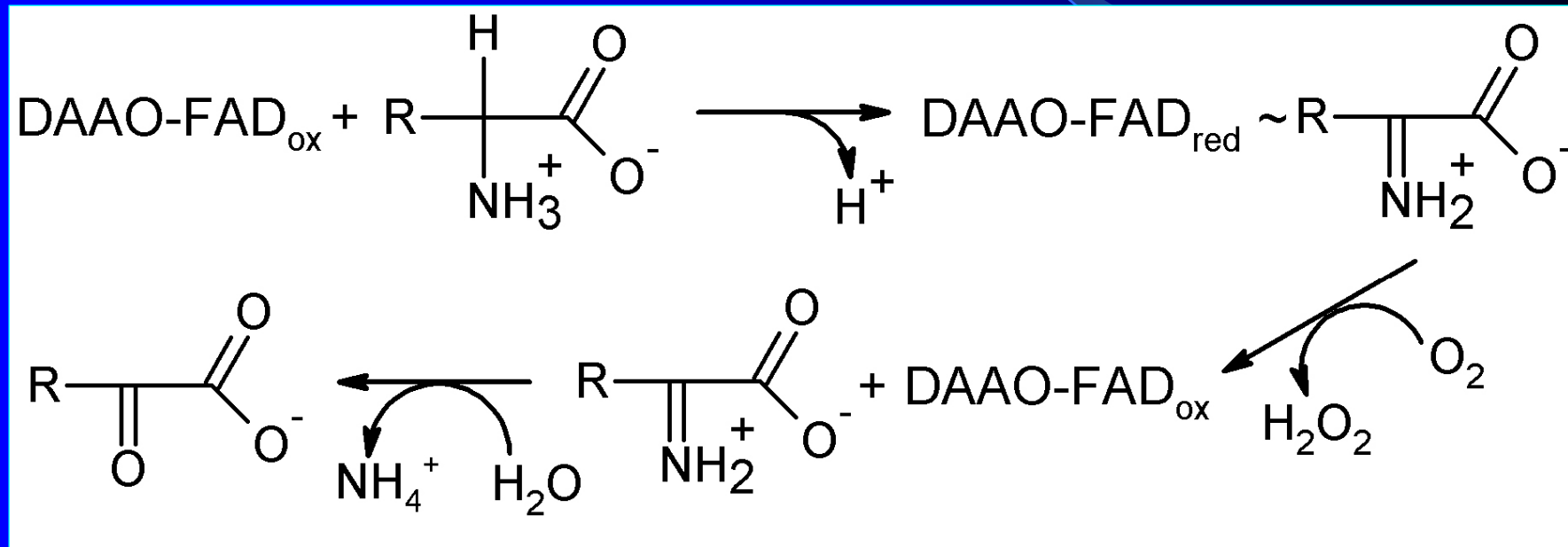
Kinetic properties of formate dehydrogenases from different sources

FDH source	$K_M^{\text{NAD}^+}$, mkM	$K_M^{\text{HCOO}^-}$, mM	k_{cat} , s^{-1}	$\frac{k_{cat}}{K_M^{\text{NAD}^+}}$, $(s \cdot \text{mkM})^{-1}$	$\frac{k_{cat}}{K_M^{\text{HCOO}^-}}$, $(s \cdot \text{mM})^{-1}$
<i>Pseudomonas sp. 101</i>	65	6,5	7,3	0,11	1,12
<i>C. boidini</i>	37	5,9	3,7	0,10	0,63
<i>O. parapolyomorpha</i>	14	1,3	4,6	0,32	3,5
<i>A. thaliana</i>	50	2,8	3,8	0,08	1,36
<i>Glycine max</i>	13	1,5	2,9	0,22	1,93
<i>D. patens</i>	39	2,6	3,4	0,09	1,31



D-amino acid oxidase (DAAO)

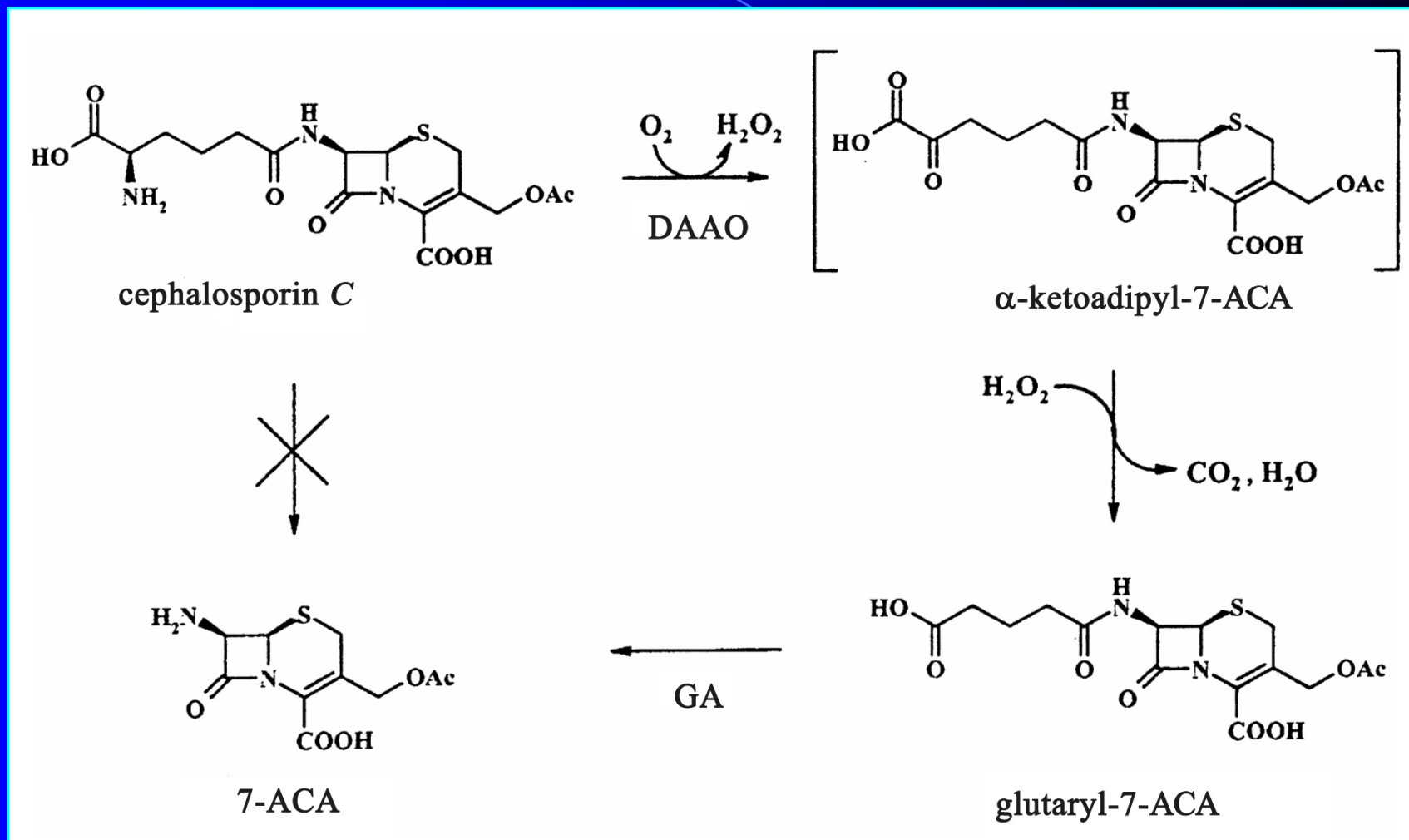
catalyses oxidative deamination of D-amino acids yielding the corresponding α -keto acids



the enzyme consists of two identical subunits
and contains one FAD molecule per subunit



Preparation of 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) from cephalosporin C



Genome mining of *O.parapolyomorpha* for new DAAOs

1. Genome analysis of *O.parapolyomorpha* resulted in 6 ORF which could be potential DAAO
2. Genome analysis of other methanol utioizing yeasts *Candida boidinii*, *Pichia pastoris* resulted ONLY in 2 (!!!) ORF which could be potential DAAO (one is DASPO, the second DAAO)



Alignment of DAAOs

```

OpaDAAO1 M - - - - TFAIVGCGIVGLYTA LNLV - ESGVKGSEITIVA EYLPG - DQS - INYTS PWAGGNFSCIS - - PDDAQT L
OpaDAAO2 M - - - AKIIVI GCGVVGMTTAL E L A - QRGHN - - - VQIVARHLPG - DVD - VEYTS PFAGANWSSFA - QDGDYEMK
OpaDAAO3 M - - - KERIVVIGAGVIGLTTAL E L S - RRGYL - - - VSIVAKELPG - DEA - RFYTS PYAGAFFYHLDSLASKGWLA
OpaDAAO4 M - - - - KIVVVGAGVIGLTTAL I L KRKLNCD - - - VVVVSKEIPG - DAD - PIYTS TKAGA QWSS - - - SPGNKRA
OpaDAAO5 M - - SDTYVVV GAGIVGLYTA YSLVYEAGVSPKHITIAAAH I PG - DQS - INYTS PWAGGNFSCIS - - PGDKKSL
OpaDASPO M - - TKSIVVV GAGVVGLTCA YQLA - EEGYD - - - VTIVAKHL PSTSI ADSQYTS PWAGAHFRPFP AKTPEEYRD
RgDAAO MHSQKR V V V L G S G V I G L S S A L I L A - R K G Y S - - V H I L A R D L P E - D V S S Q T F A S P W A G A N W T P F M T L T D G P R Q A
TvDAAO M - - - AKIVVIGAGVAGLTTAL Q L L - R K G H E - - - V T I V S E F T P G - D L S - I G Y T S P W A G A N W L T F Y - - - D G G K L A
CbDAAO M - - - G D Q I V V L G S G I I G L Y T T Y C L I Y E A G C A P A K I T I V A E F L P G - D Q S - T L Y T S P W A G G N F S C I S - - P A D D T T L
ChDAAO M P P S D P I I V L G A G V I G L T T A V R L L - - E A H L G A N V H I L A D H W P S - D A L D A Q Y A S T I A G A H H L S F A - D D G D A R Q R
    
```

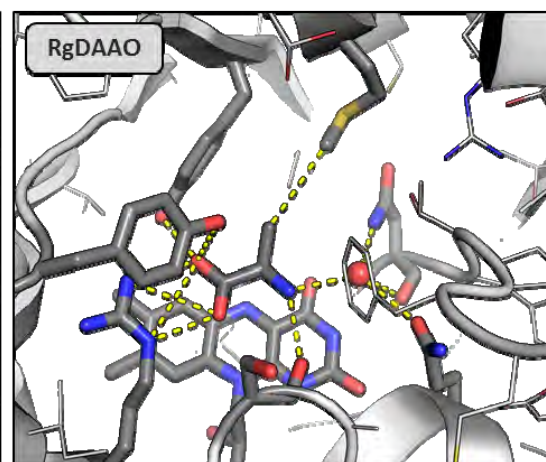
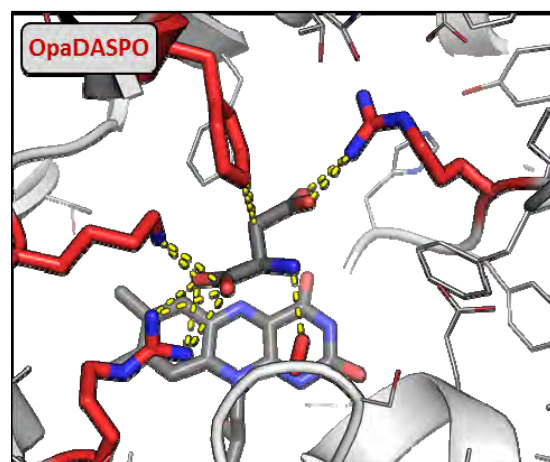
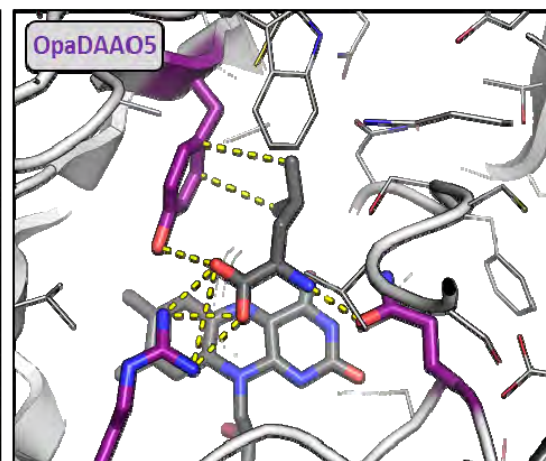
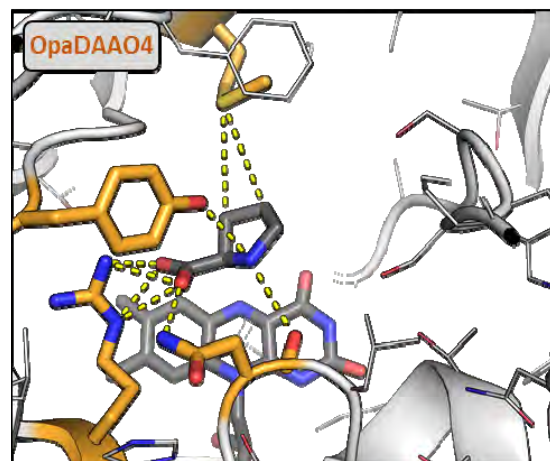
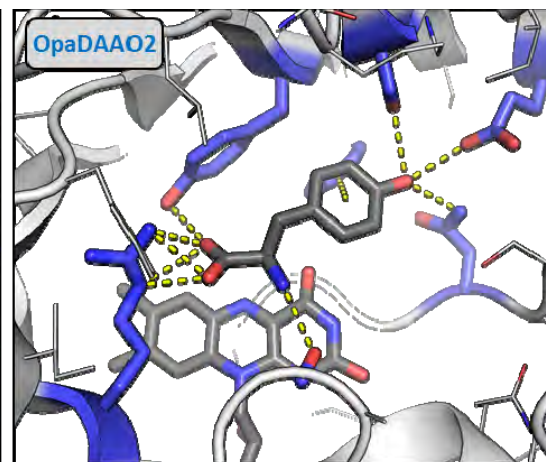
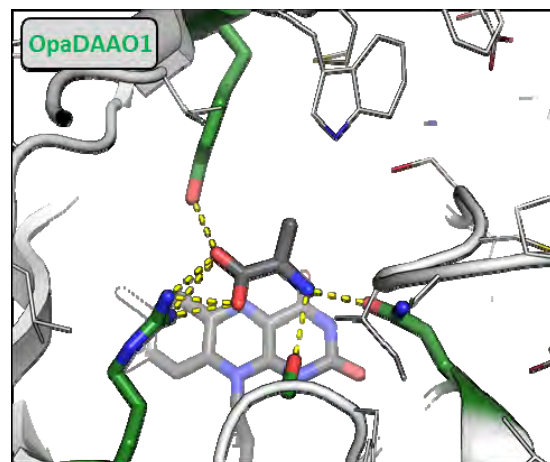
```

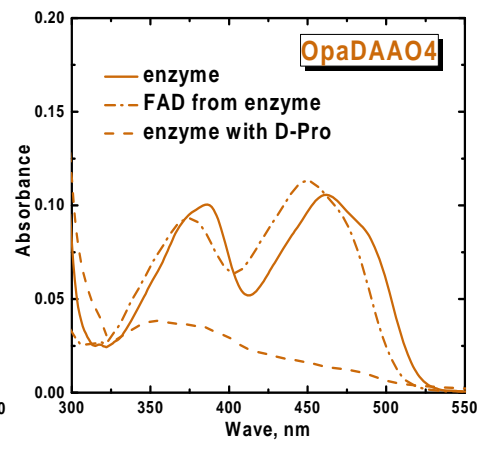
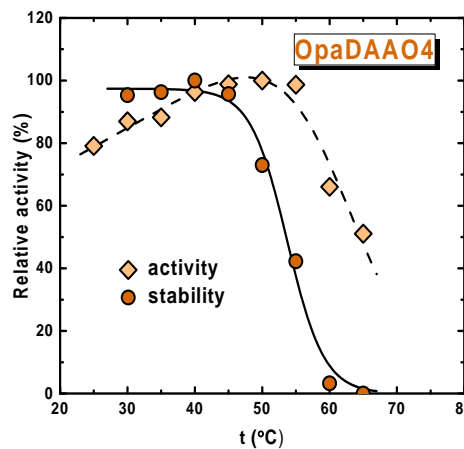
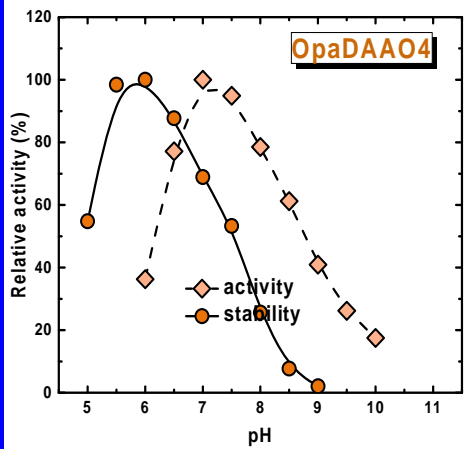
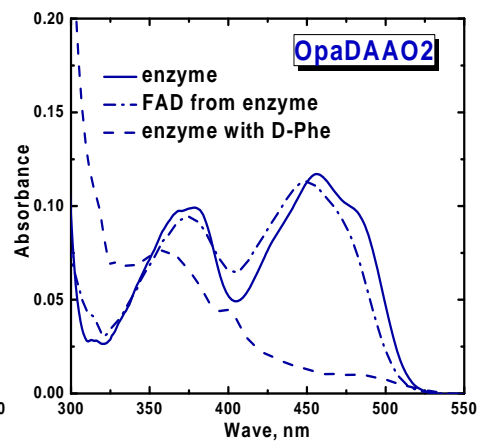
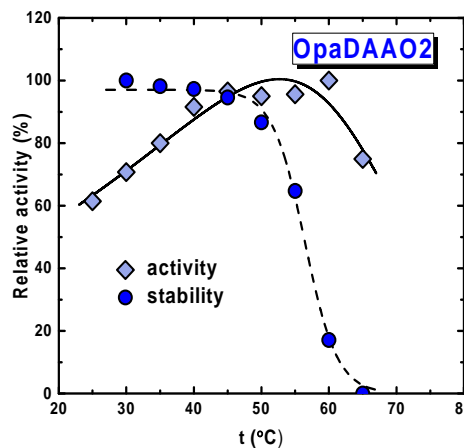
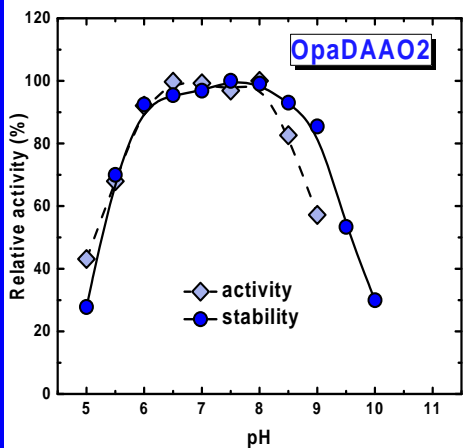
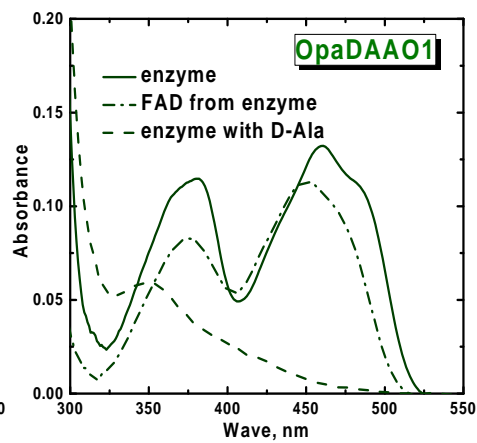
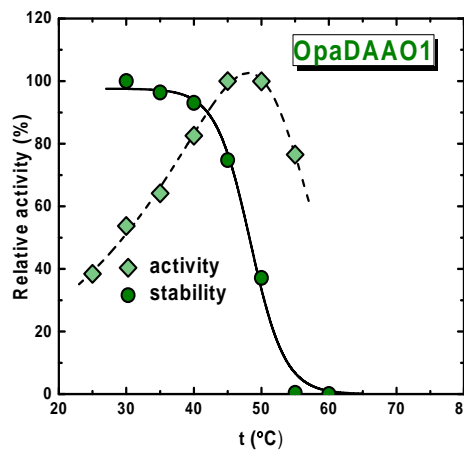
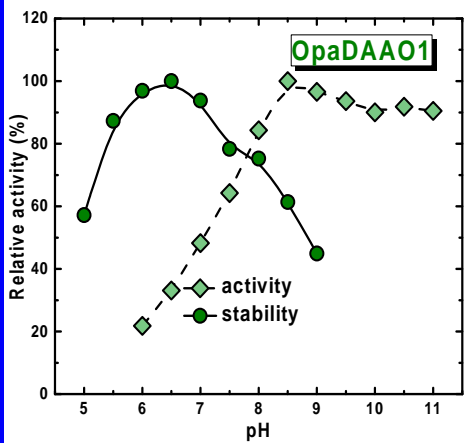
OpaDAAO1 NF - DKT TYTHLAAIQKLLG - PGCGLDRR PSTEFWDYL PDQR - - - - - KIDSLSSYLQDFA I I - - PSSQLPQ
OpaDAAO2 EW - DKLGY YRFMDLAENVP - - GSSVVRRTERILNSK - - - - - RLPWFKDFVQDFRLL - - SKEELPD
OpaDAAO3 QLQD IASYYEFLRVAQ - - - EPGSGVAERVAEVYVPRISM METGY - - - - - DGPWFKDVVRNYEVI - - DPREYPA
OpaDAAO4 EF - - - SYRIFDEL SK - VPEAWVTKIPLYKGEIDPKRPA - - - - - TEPDLKSFVDNYEWI GEDQQKFPG
OpaDAAO5 SY - DRYTYTHLAEIQKLLGGPSCGLDMR PATDYFHKYPPAK - - - - - KMESLKEYVKDFRIL - - DKSALPK
OpaDASPO SKLTRSTFQVFKKLATTFP ESSIRFMPGTD FIERDDPLYEN - - - - - VSAGYAEG IENFKVL - - PKSALPN
RgDAAO KW - EESTFKK WVELVPTGHAMWLK GTRRFAQNE DGL - - - - - LGHWYKDITPNYRPL - - PSSECP
TvDAAO DY - DAVSYPI LRELARSSPEAGIRL ISQRSHVLKRDLP KLEVAMSAICQRNPWF KNTVDSFE I IEDRSRIVHD
CbDAAO AY - DKFTY LNLFKIHKKLG GPECGLDNKPST EYWDFYPGDE - - - - - KVNSLKQYLKDFKVI - - PKSELPE
ChDAAO RW - DMRTFDVLYDEWKA VGE - RTGLMALTQTEMWEGAT - - - - - SHLAVYEGNP DFRVL - - DPRTAPC
    
```

```

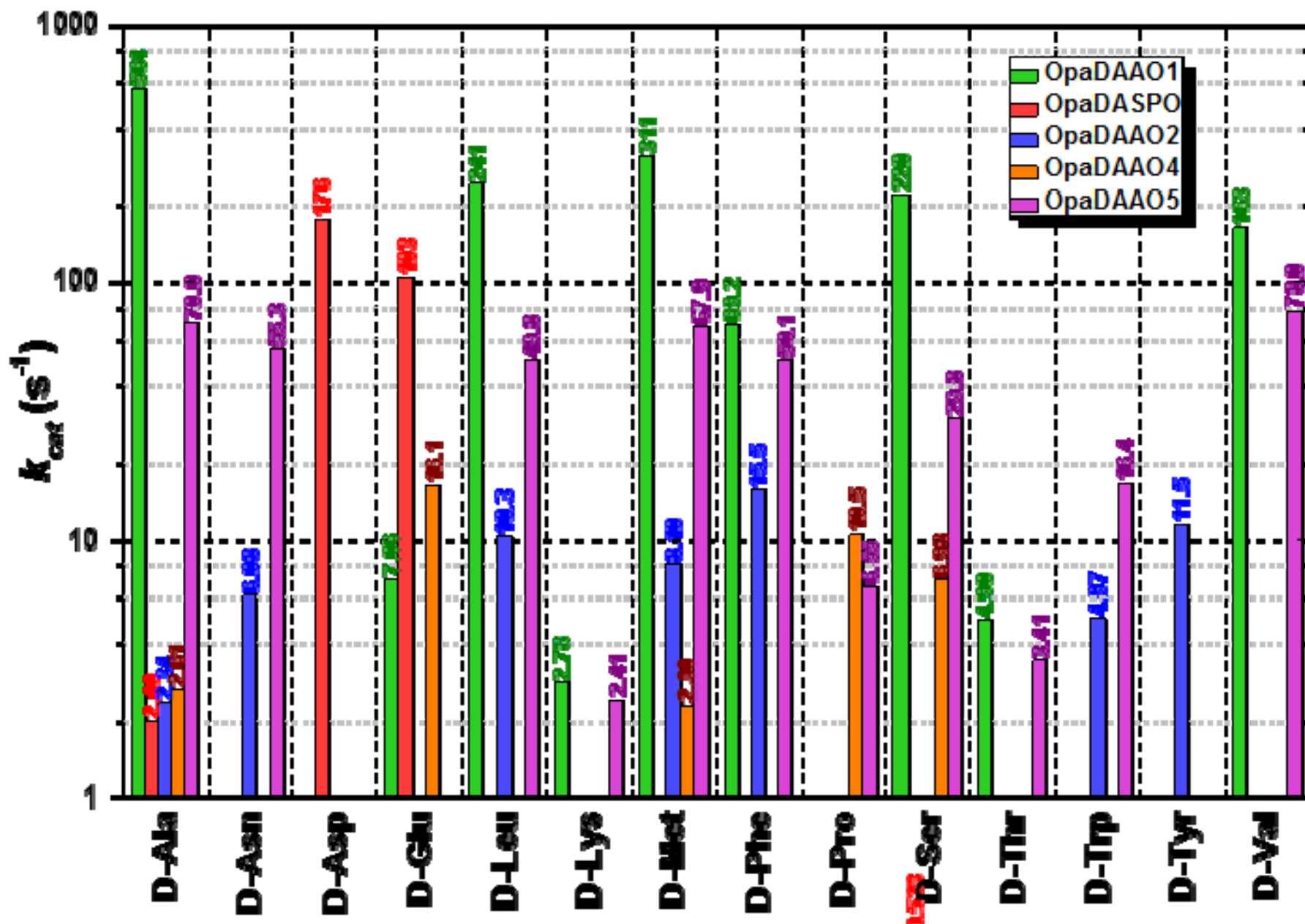
OpaDAAO1 GVA - - - FG I K Y I S W N F N C - - P K F L E V L K E Y L - A S T G I V F V R R K I Q N V - - - - - D E M F E F - - - - - A R T I F N C
OpaDAAO2 GVE - - - Y G H E Y T T V A I T V - - P I Y L H Y L L Q K L - L S L G V K L H R A H L H H I - - - - - K D A A S Y - - - - - F T D G K V D V T V N C
OpaDAAO3 GAAGDDIVFAFRYTGFTINPVQYLHYLLYRC - AQSGIN YVRRTVGSL - - - - - EEA K T L F L D G D D F V E A D L V V N C
OpaDAAO4 - - - - - V S H I Y K F D T F T I S P P Q Y L A Y L A N E L - L K L G V A I Q R G V V R N F - - - - - E D V A - - - - - A D Y V I N C
OpaDAAO5 G I V - - - F G I S Y T T W N F N C - - P L F L Q N L A S F L - E K L G V T I I K K K L E H L - - - - - S Q A F L S - - - - - P N T K I V F N C
OpaDASPO G I K - - - F G A T Y N A W C M N S - - P M Y I Q F L E R R L E M Y Y K V K I V Q E S L G S L - - - - - Q Q V A E L - - - - - F P G A T I V N C
RgDAAO GA - - - - I G V T Y D T L S V H A - - P K Y C Q Y L A R E L - Q K L G A T F E R R T V T S L - - - - - E Q A F D G - - - - - A D L V V N A
TvDAAO DVA - - - Y L V E F R S V C I H T - - G V Y L N W L M S Q C - L S L G A T V V K R R V N H I - - - - - K D A N L L - - - - - H S S G S R P D V I V N C
CbDAAO GVE - - - Y G I S Y T T W N F N C - - P V F L Q N M A N F L - N K R N V T I I R K H L T H I - - - - - S Q A Y L T - - - - - V N T K V V F N C
ChDAAO SN - - - - I T H M V S F T S L T I A P T V Y L A A L E A R V - R D L G A K L H R A H V P S L G A L R T D P A L L - - - - - A L Y T R P P A A V F V C
    
```



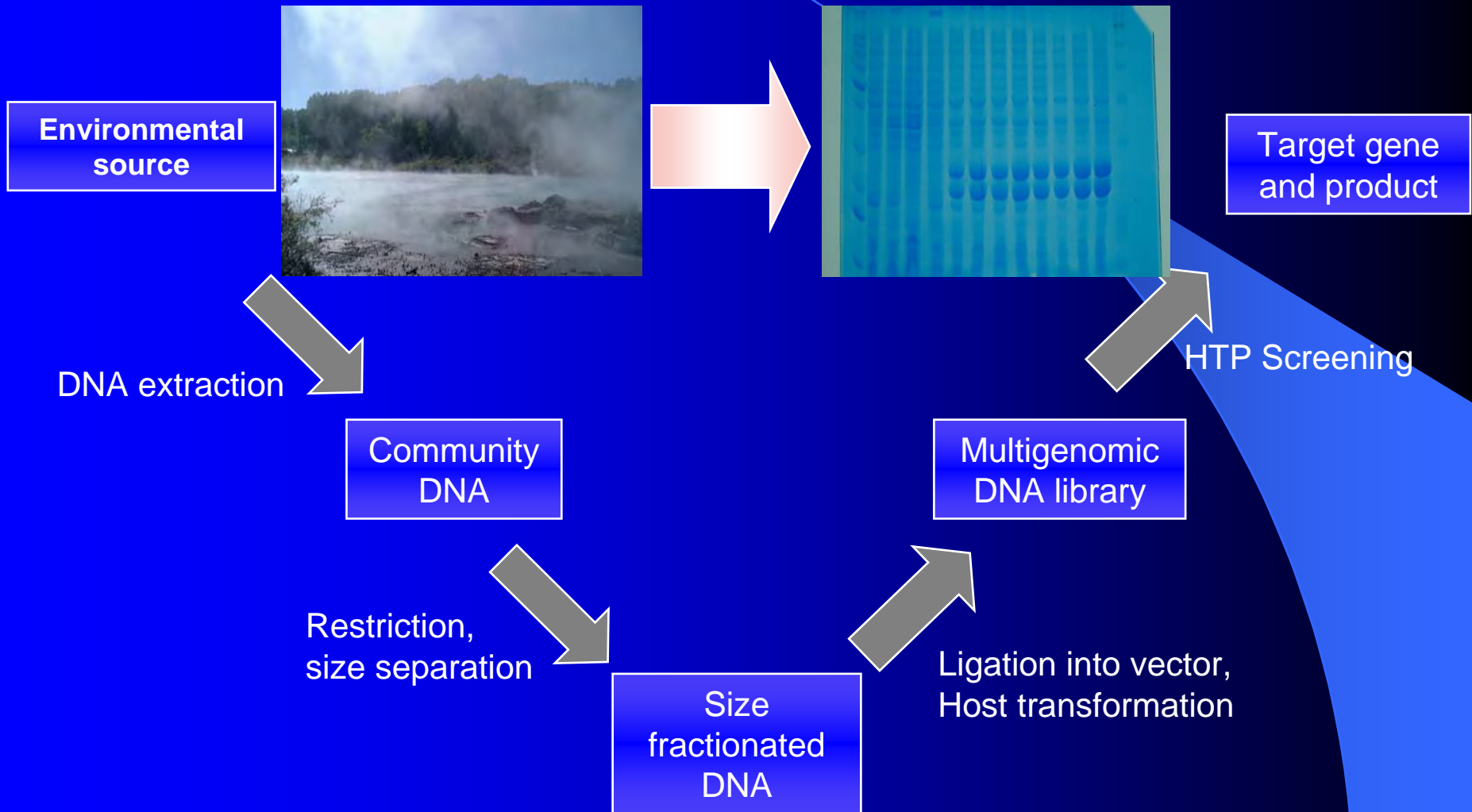




Activity of new OpaDAAOs with D-amino acids



Metagenome screening



FROM WHERE WILL MANY OF THE NEW APPLICATIONS COME?

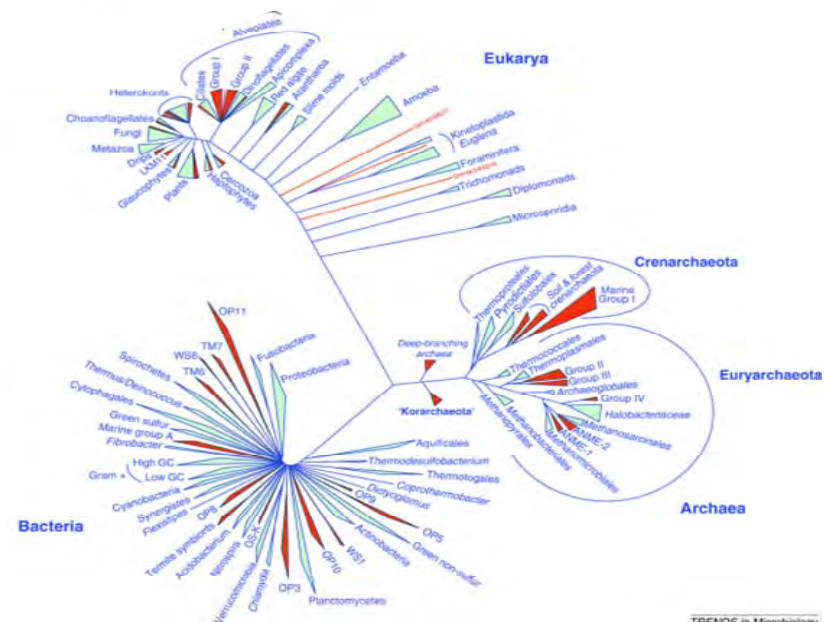
- Biodiversity

WHERE IS THE GREATEST SOURCE OF NEW BIODIVERSITY TO BE FOUND?

- The microbial world

Group of organisms	Estimated species	Accessible (known) species (as % of total)
Animals (mammals, birds, fishes)	3.5×10^4	>90
Arthropods/invertebrates	10^6 - 10^7	10
Nematodes	5×10^5	3
Higher plants	2.7×10^5	>90
Algae ^a	10^4 - 10^5	[70]
Bryophytes	2.5×10^4	70
Fungi ^a	1.5×10^6	[5]
Bacteria ^a	10^4 - 10^5	[1-10%]
Archaea ^a	10^5 - 10^6	[0.1-1%]
Viruses ^a	10^5 - 10^6	[4]

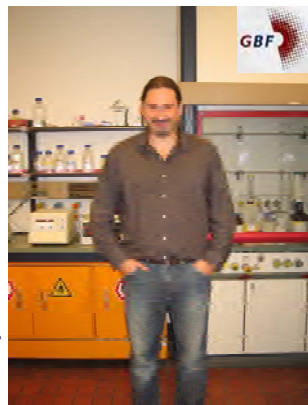
^aThese values are thought to be underestimated, possibly by one to two orders of magnitude. Estimates of accessible species will be proportionally lower.



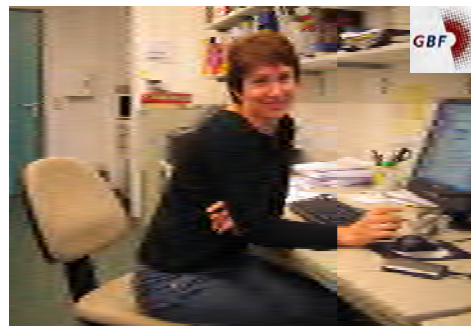
The friends that did the work and acknowledgements



Misha Yakimov-cruiser



Peter Golyshin-genomicist



Olga Golyshina-genomicist



Kenneth Timmis-environmentalist...



Biocatalysis Group-enzymologists



<http://www.proteus.fr/>

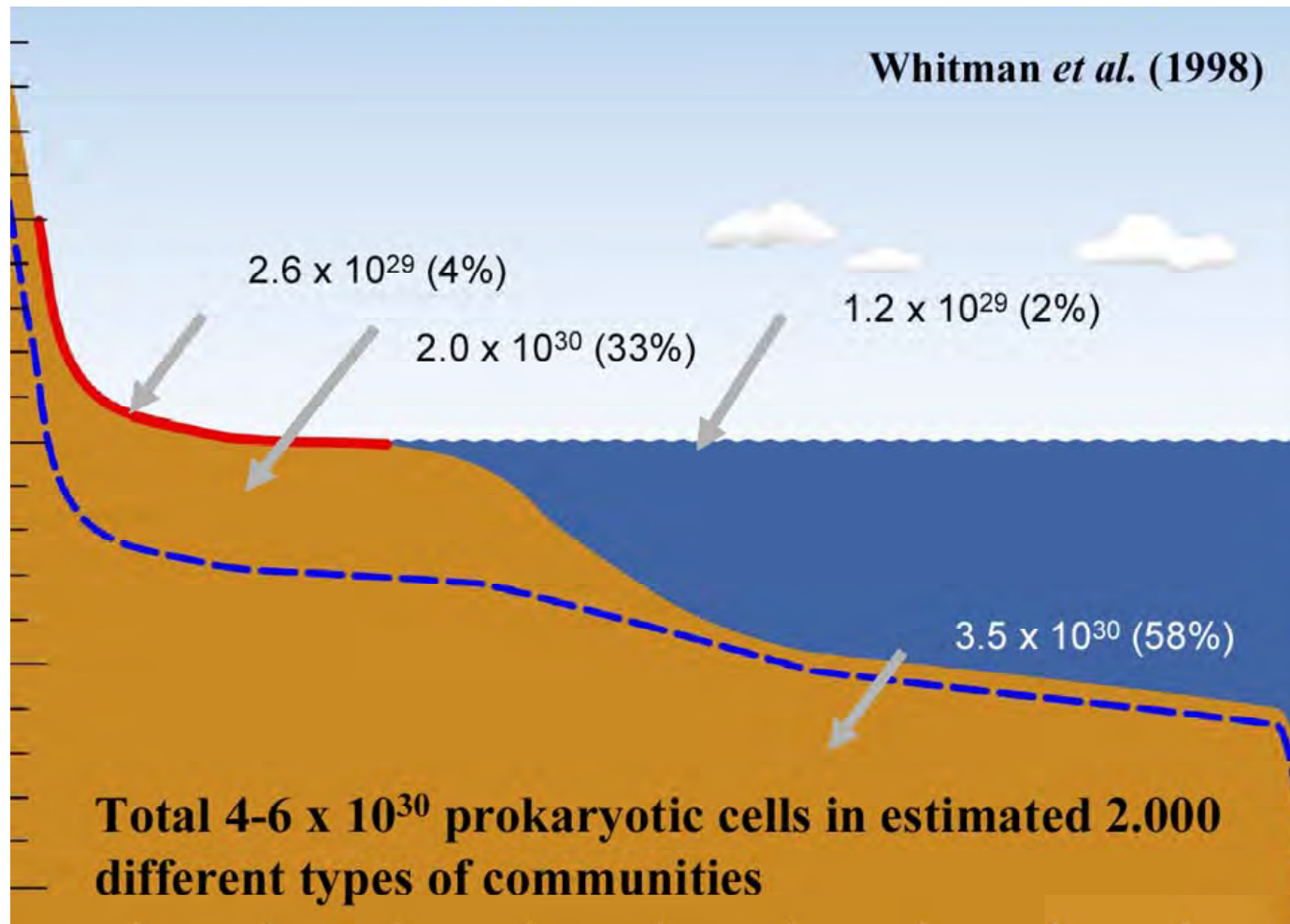
proteus

Nature has more imagination than our dreams

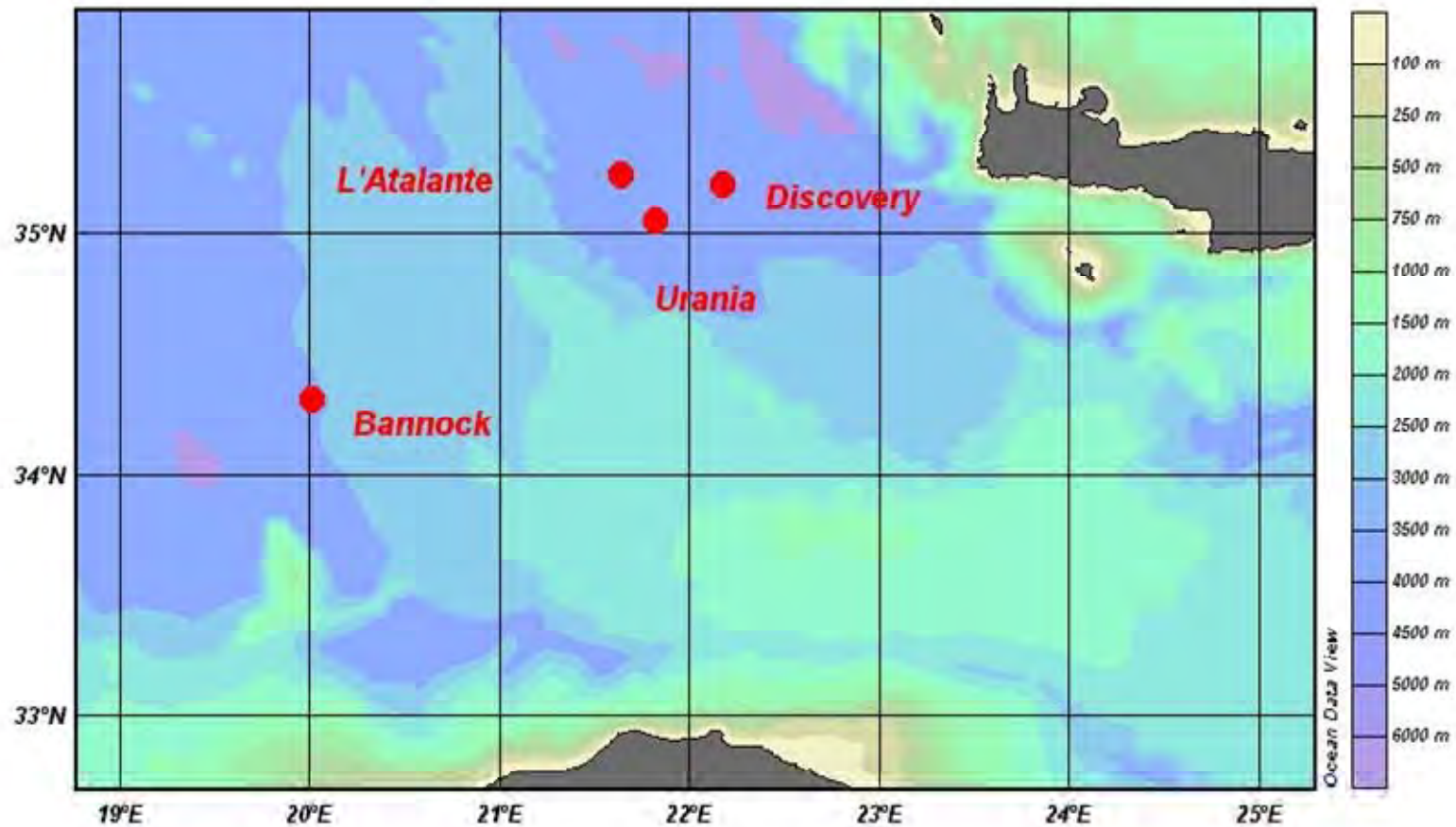


<http://www.vialactia.com/>

WHERE ARE ALL THE MICROBES?



Deep Hypersaline Anoxic Basins (DHABs) Of Mediterranean Sea



Ferrer, M., Golyshina O.V., Chernikova T.N., Khachane A.N., Martins dos Santos V.A.P., Yakimov M.M., Timmis K.N., and P.N. Golyshin. (2005). Novel microbial enzymes mined from the Urania deep-sea hypersaline anoxic basin. *Chemistry and Biology*. In Press

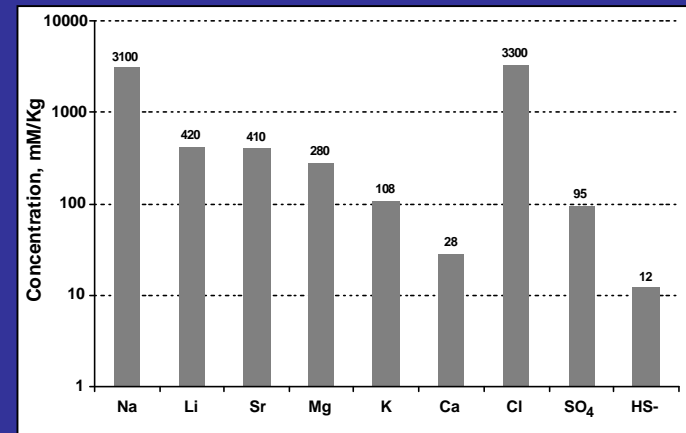
Normal Sea Water



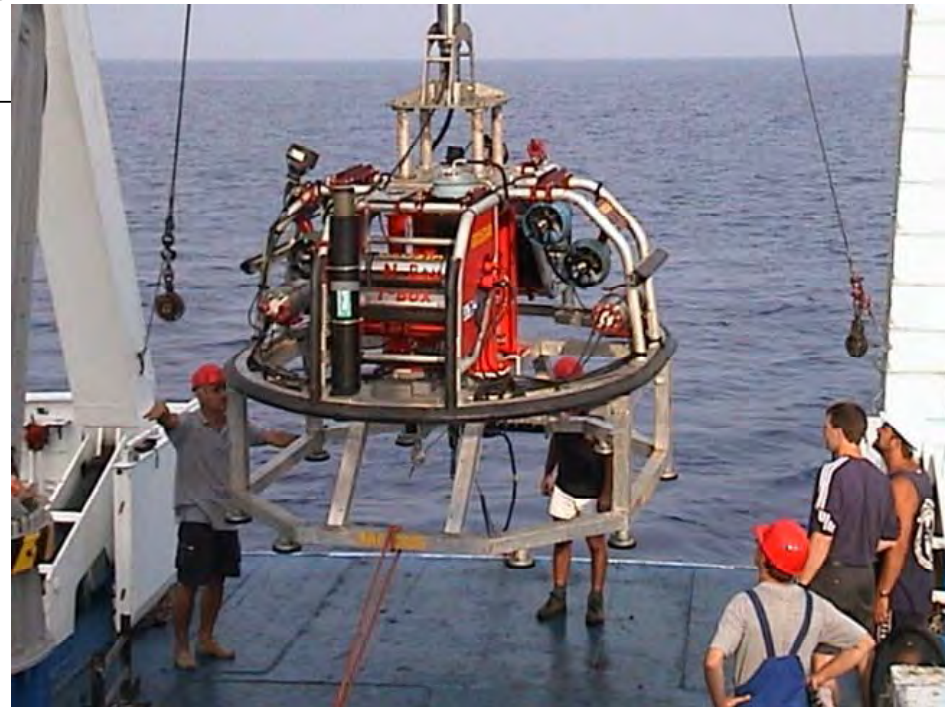
Upper Interface Layer

Lower Interface Layer

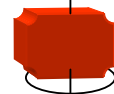
- Totally anoxic environments
- High level of H_2S
- Hypersaline
- High pressure



Sampling strategies

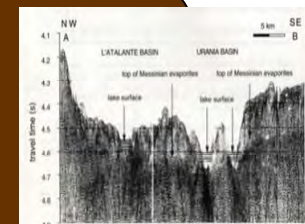


MODUS

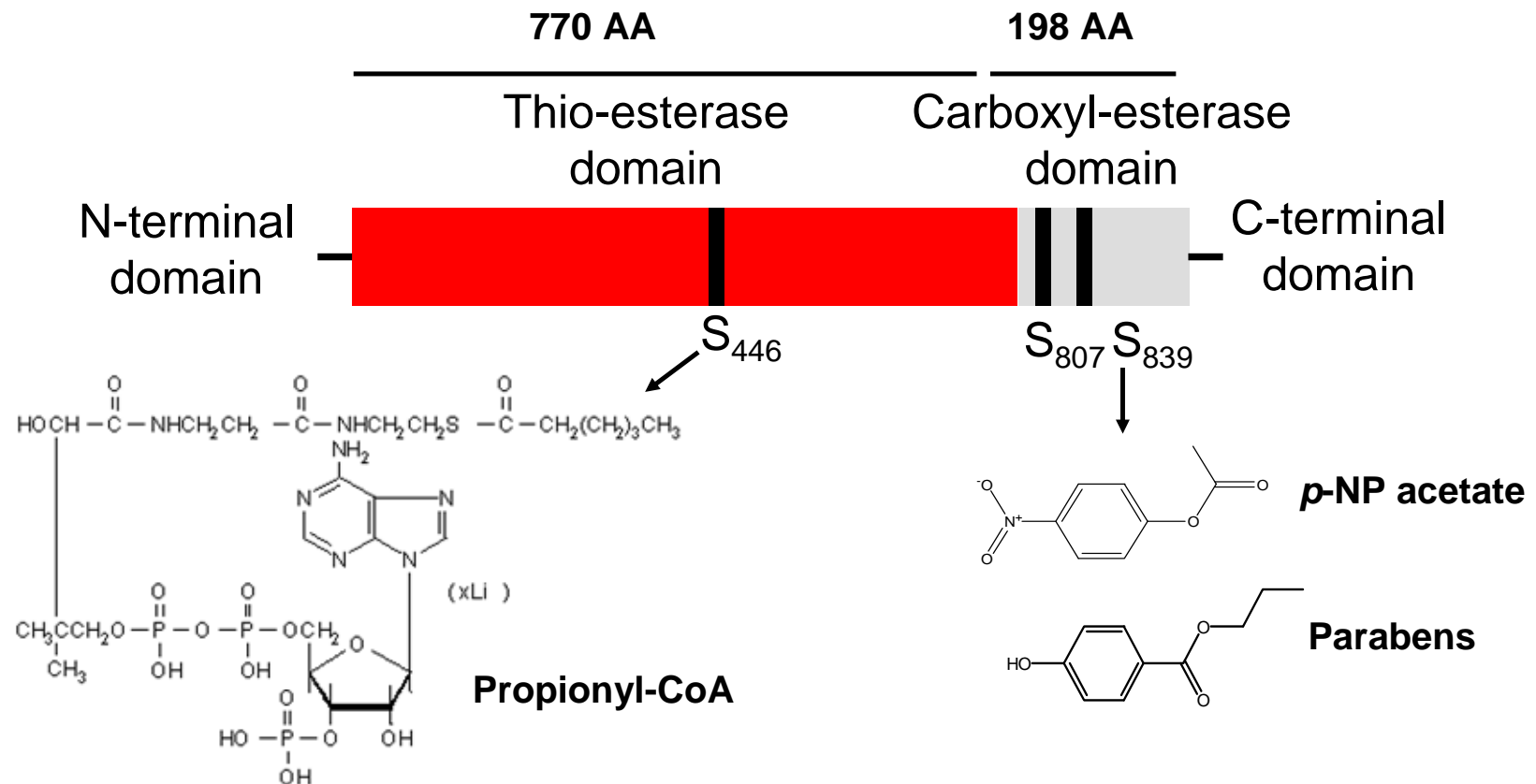


SCIPACK

BRINE



Unusual structure on one out of five DHAB esterases



- **Bifunctional: carboxylesterase + acyl CoA thioesterase activities in distinct domains**
- **3 catalytic serines and a multicatalytic site for carboxylesterase activity**



EXAMPLE 2: RUMEN ENZYMES

THE RUMEN PROJECT: EXPLORATION OF BOVINE RUMEN MICROFLORA

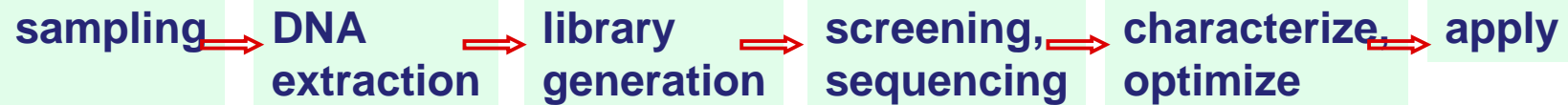


<http://www.vialactia.com/>

Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora



Generation of a genomic expression library in a surrogate host like *E. coli*



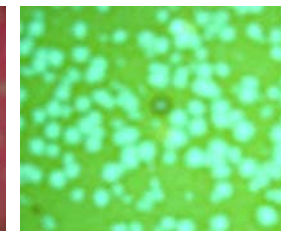
RESULTS:

- 13 novel esterases
- 9 endoglucanases
- 1 cyclodextrinase
- 25 glucosyl hydrolases
- 1 laccase

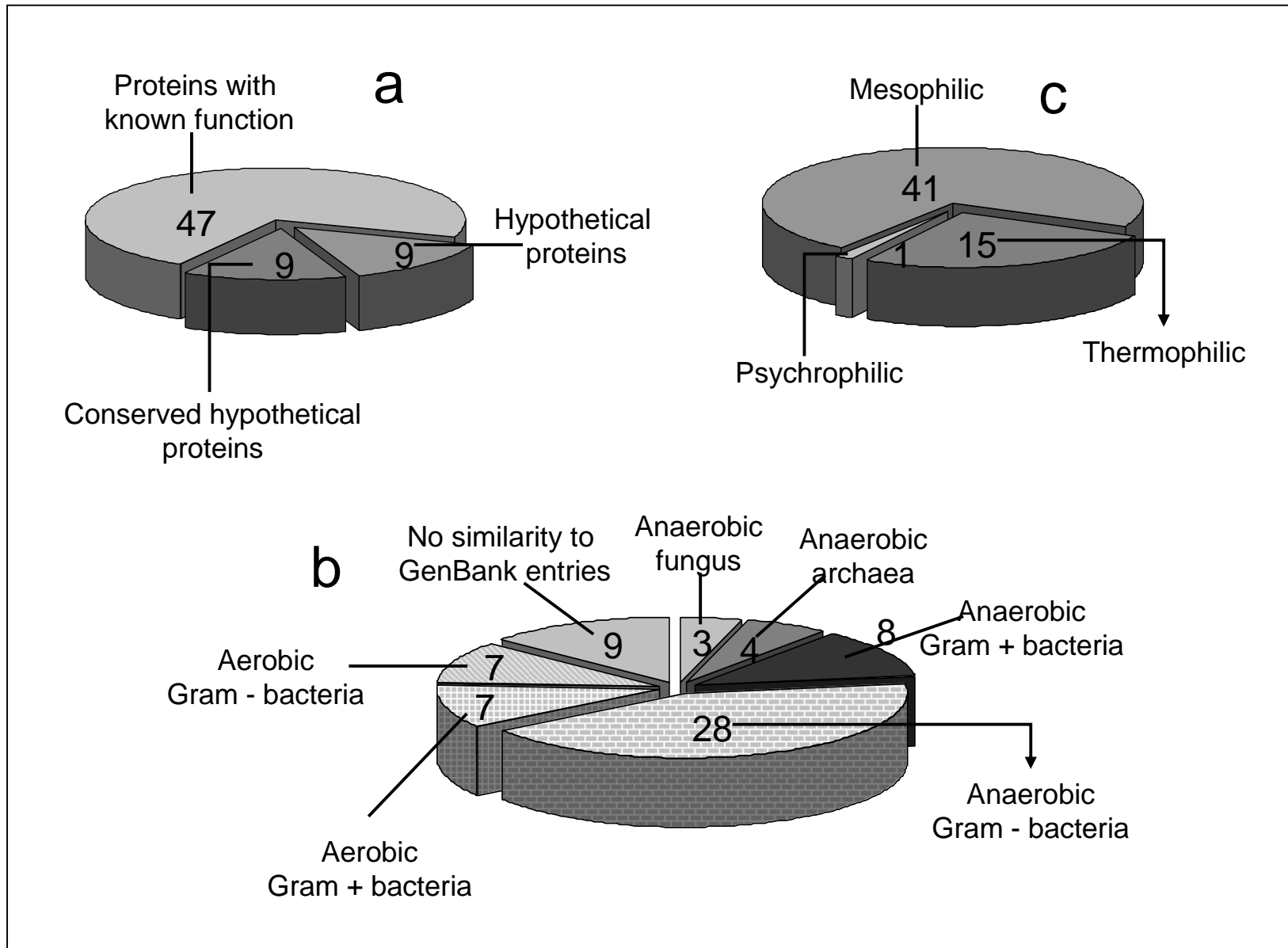
Cellulases



Esterases



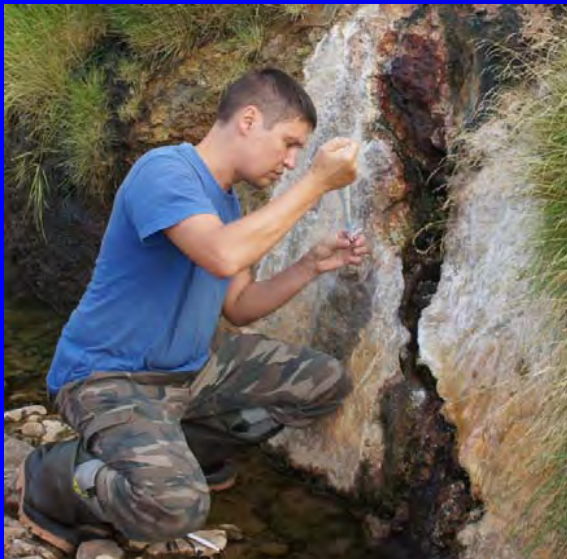
Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora

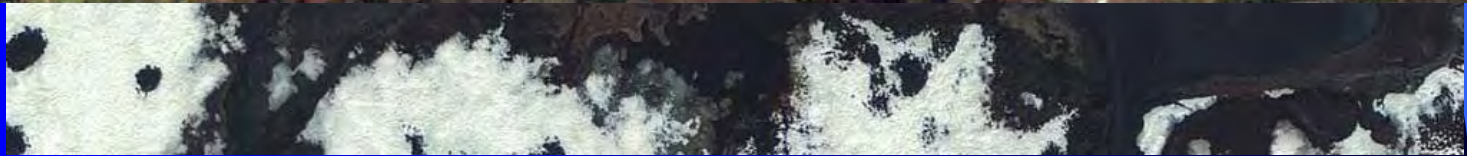
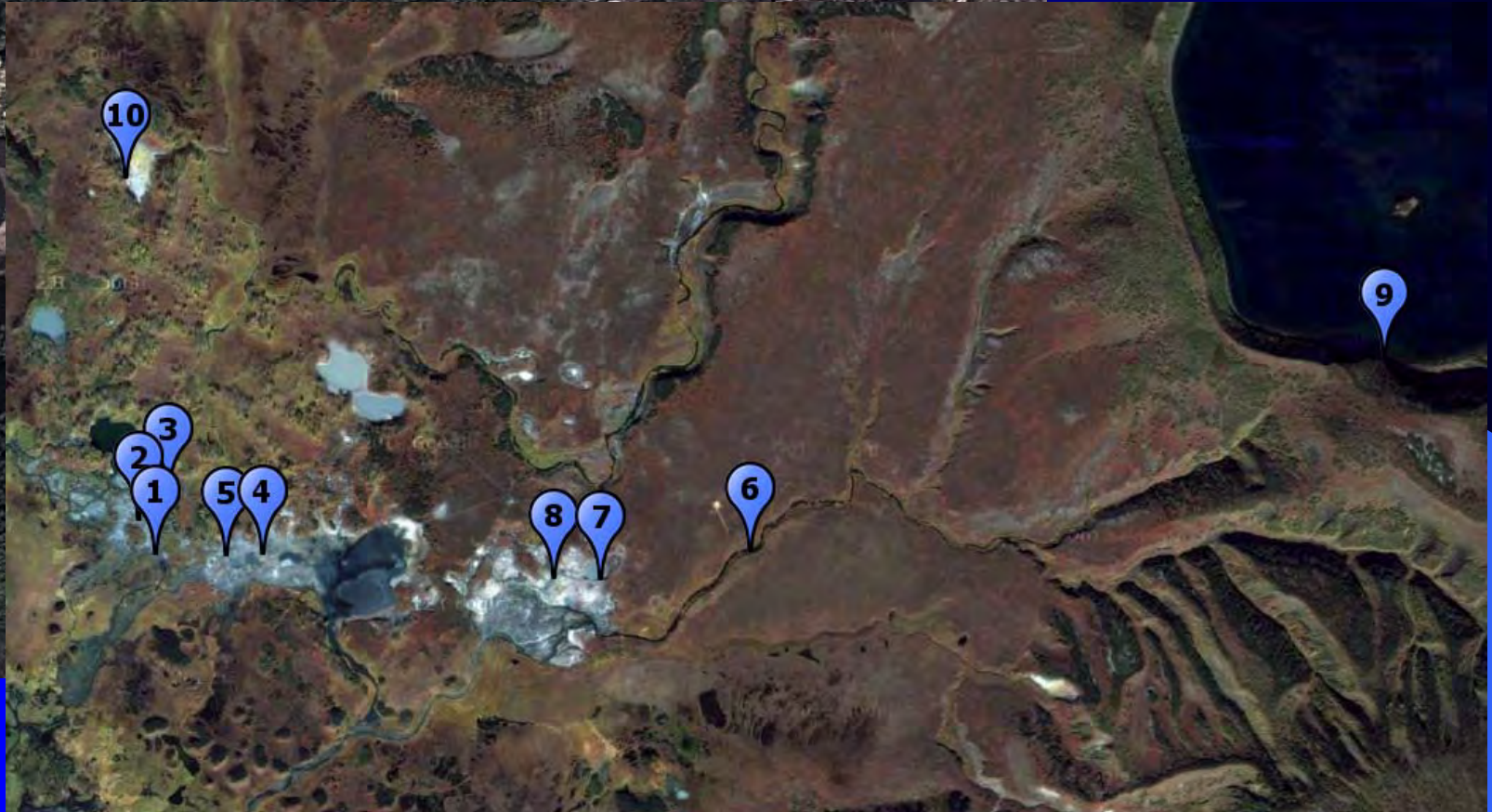


Горячие источники вулкана Этна









МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ МУТАГЕНЕЗА

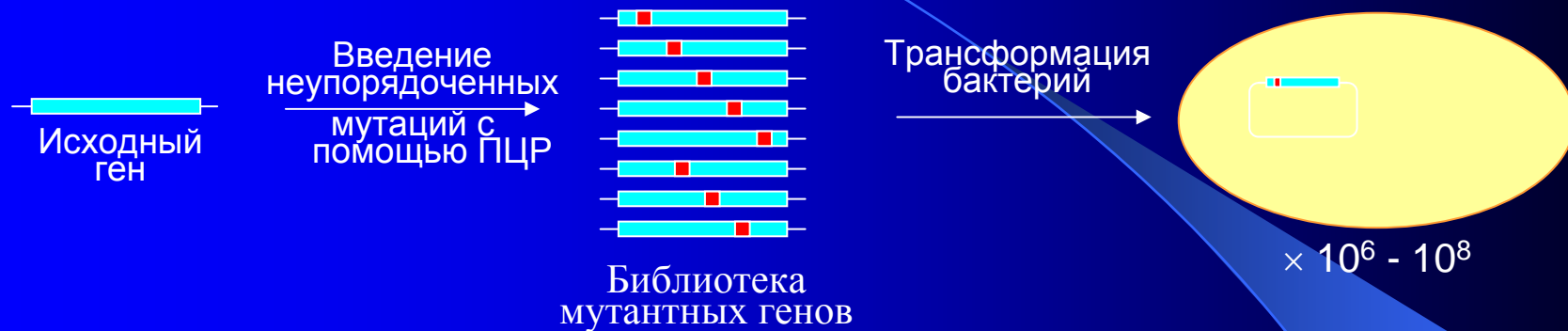
Неупорядоченный мутагенез

- Классический (обработка химическими реагентами, радиация ультрафиолет и т.д.)
- Направленная эволюция
- Мутирующий штамм E.coli
- "Gene Shuffling"
- Экспериментальная эволюция

Направленный сайт-специфический мутагенез (Rational design)

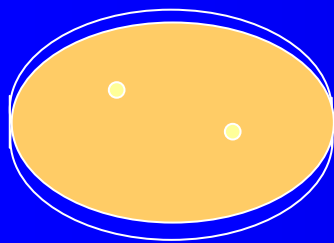
Мутагенез с помощью метода «направленной эволюции»

Получение библиотеки мутантных генов

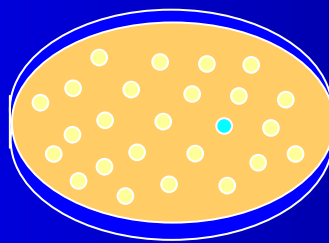


Анализ библиотеки

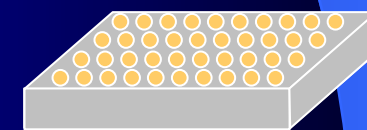
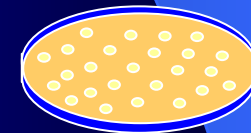
Прямой отбор



Анализ на чашках с помощью колориметрического, флуоресцентного и др. методов



Биотрансформация с помощью целых клеток



(GC/LC) MS analysis

ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ МЕТОДА «НАПРАВЛЕННОЙ ЭВОЛЮЦИИ»

- Простота методики проведения эксперимента
- Не требует знания не только пространственной структуры, но последовательности гена фермента
- Метод очень дорогой и трудоемкий – 1 положительная мутация на 10 000 – 500 000 клонов
- За один цикл нельзя ввести более 1 положительной мутации, необходимо проводить до 6-10 циклов.
- Очень часто отсутствует простая и эффективная методика скрининга библиотеки генов
- Не позволяет вводить вставки и делать делеции

Directed evolution of enzyme catalysts

O.Kuchner, F.H.Arnold, Trends in Biotechnology, 1997, 15, 553

Box 1. The number of possible variants of a protein that can be created by introducing M substitutions simultaneously over N amino acids is $19^M [N! / (N - M)! M!]$

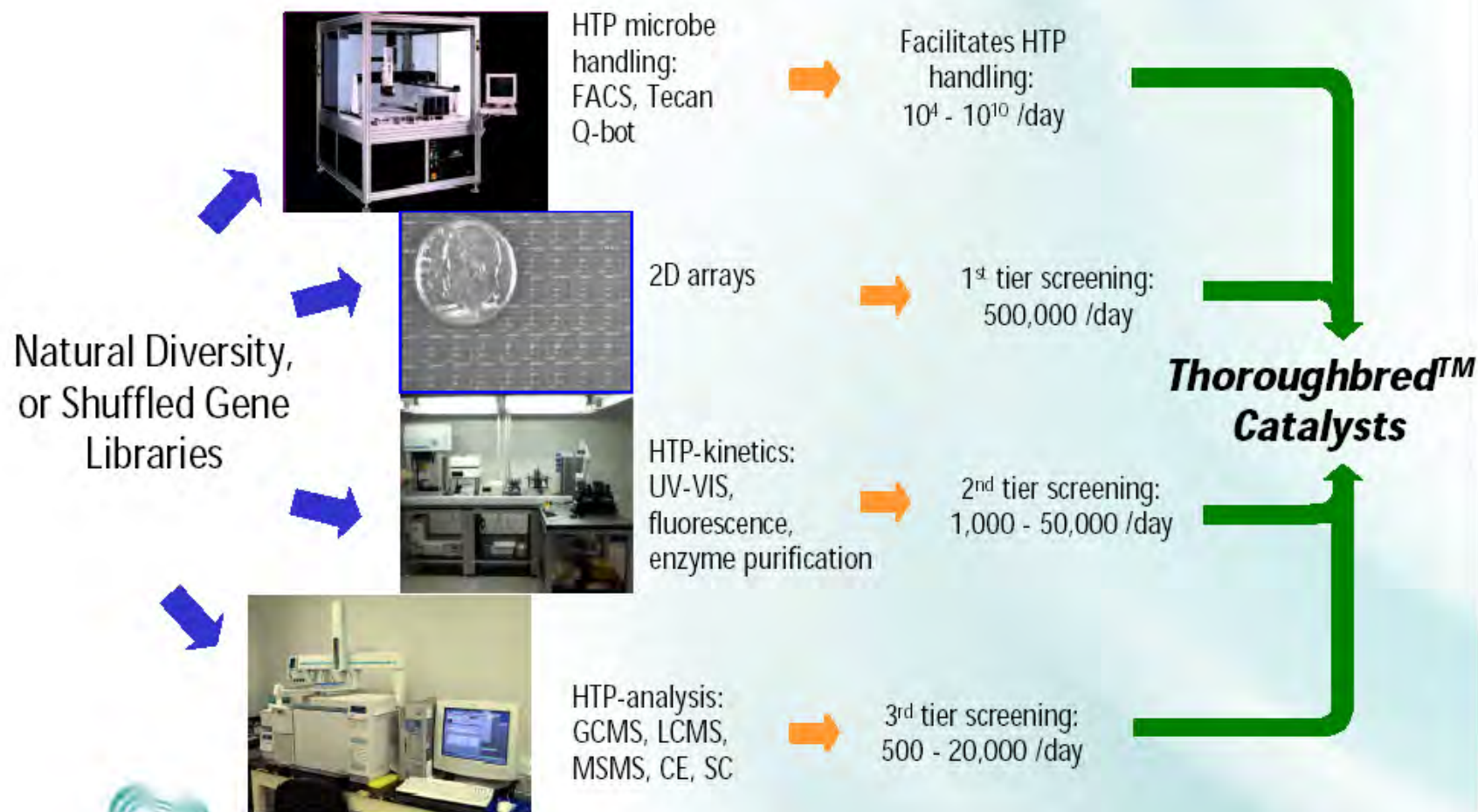
Sequence length = N (number of positions targeted)

	5	10	200
Number of amino acids changed simultaneously			
1			
2			
3			
4			
5	2 476 099	623 976 948	6 278 520 528 393 960
6		9 879 635 010	3 876 986 426 283 270 000
7		107 264 608 860	2 041 510 281 040 010 000 000

This table lists the number of variants that could be made if every possible amino acid substitution were accessible (for example, by codon-synthesis methods). If point mutations are introduced randomly at the DNA level, the accessible sequence diversity is limited. On average, only 5.7 different amino acids are accessible by single-base-pair changes in a codon. Furthermore, the number of clones that must be screened to see a given number of unique amino-acid-level variants must increase to account for wild-type variants arising from the degeneracy of the genetic code. To have 95% confidence that a given number of amino-acid-level variants has been sampled in a screen or selection, the number of unique clones must be multiplied by a factor of approximately ten.

The feasible upper limit for screening with a high-throughput assay is indicated by the darker gray area. The upper limit of feasibility for selection in microbial hosts is indicated by lighter gray. Neither screening nor selection allow exhaustive searches of libraries containing multiple mutations distributed over long sequences.

Catalyst Screening Technology



CODEXIS™

BROADEN YOUR IMAGINATION

Мутагенез с помощью мутирующего штамма *E.coli*

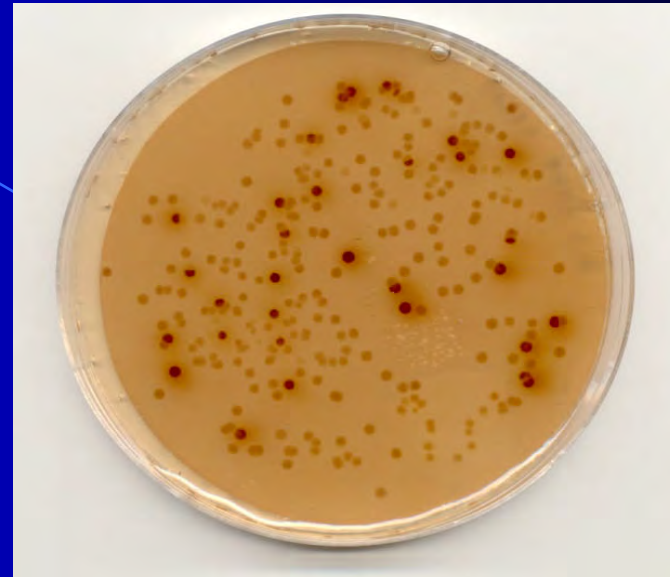
- Метод основан на размножении клонированного в плазмиду гена в специальном штамме *E.coli* XL1-Red (Stratagene), мутантного по трем генам, ответственным за первичную репарацию ДНК:
 - *mutS* (удаление несовпадающих пар),
 - *mutD* (отвечает за 3'-5'-экзонуклеазную активность в ДНК-полимеразе III) и
 - *mutT* (отвечает за гидролиз 8-оксодGTP).
- Частота мутаций в 5000 выше, чем в обычных штаммах *E.coli*.
- 1 мутация на 2000bp после 30 циклов роста.¹

¹ Greener et.al (1997), *Molecular Biotechnology*, 7, 189-195

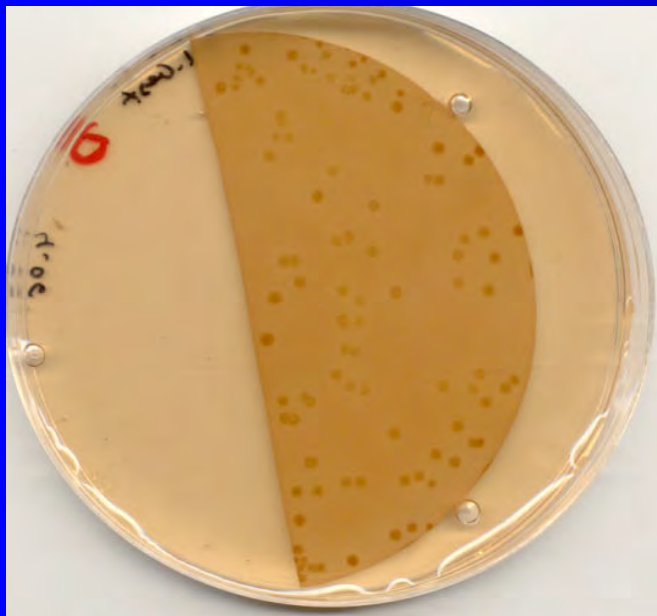
Получение L-специфичной аминоксидазы (N. Turner, 2003, Ang.Chem.)



Master plate



First dilution of active clone

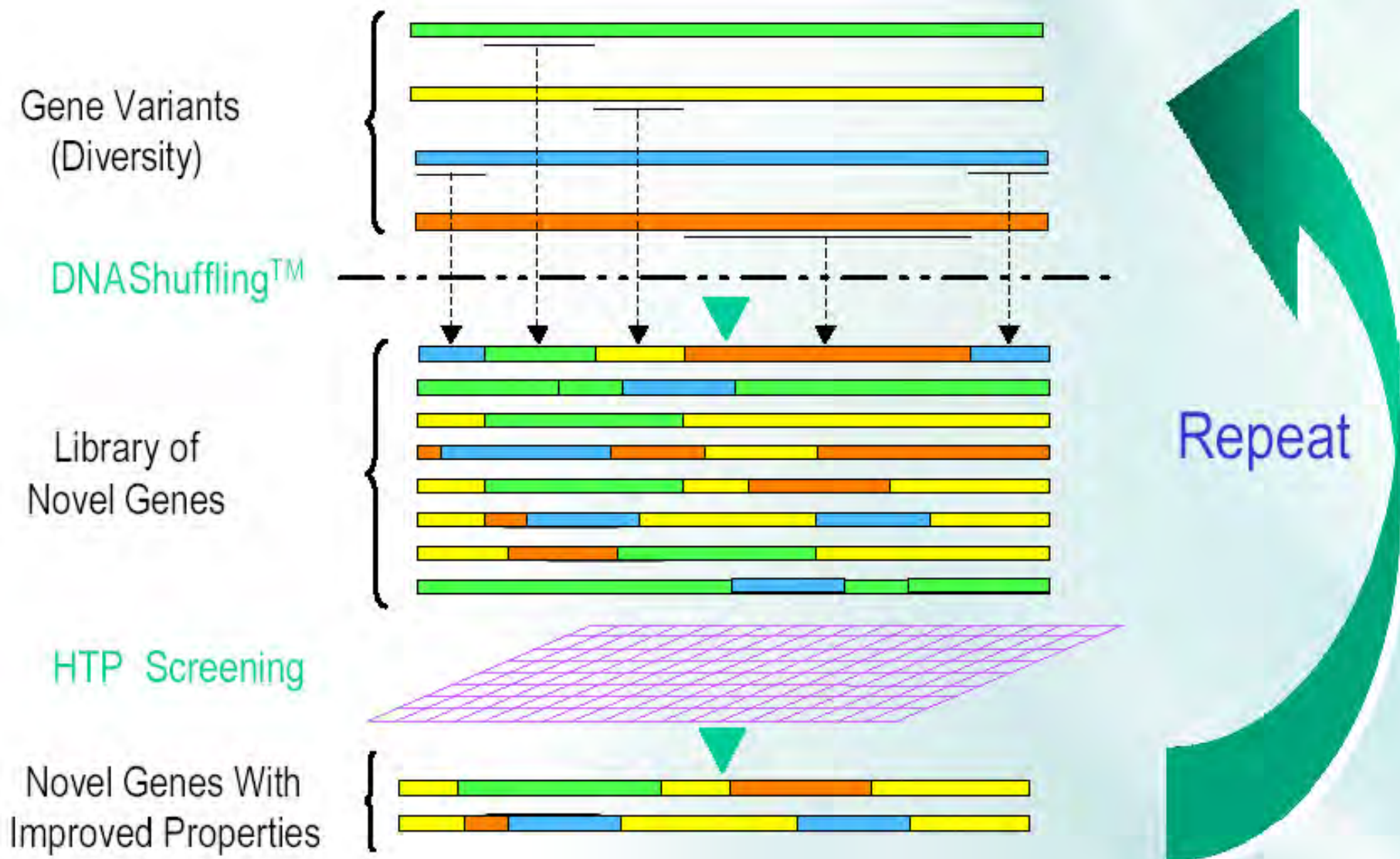


Pure clone assayed against D-enantiomer



Pure clone assayed against L-enantiomer

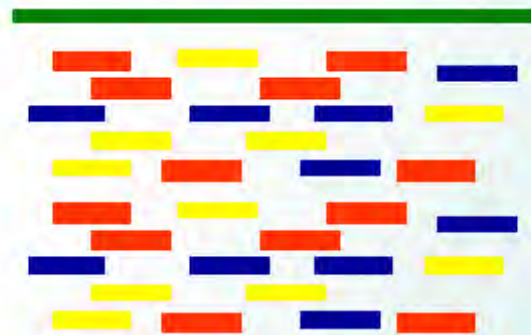
“Gene Shuffling” (Генная мозаика)



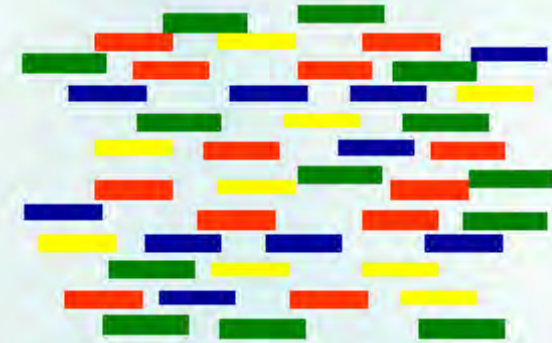
Gene Shuffling



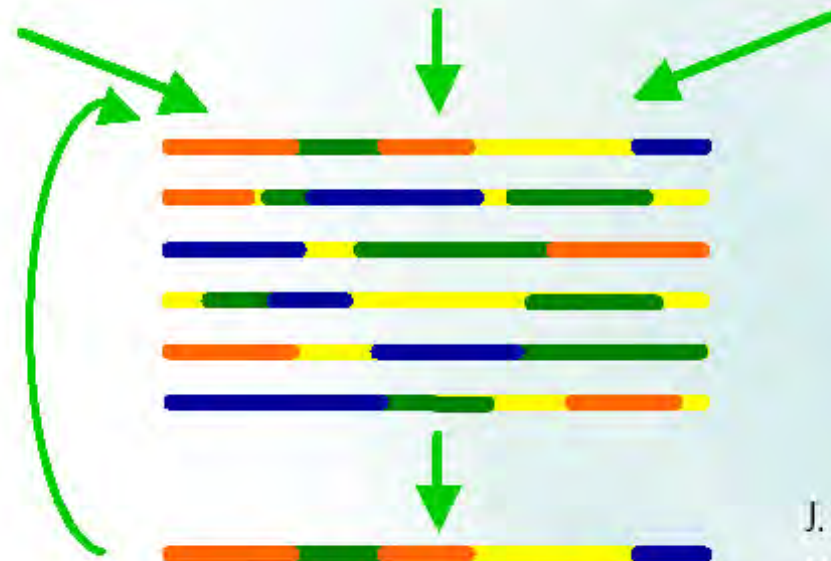
Semi-Synthetic Shuffling



Synthetic Shuffling



(optional)



J. Ness et al.,
Nat Biotechnol., 2002, 20 (12):1251-5

Protein Science (1998), 7:698–705. Cambridge University Press. Printed in the USA.
Copyright © 1998 The Protein Society

Serial increase in the thermal stability of
3-isopropylmalate dehydrogenase from
Bacillus subtilis by experimental evolution

SATOSHI AKANUMA,^{1,2} AKIHIKO YAMAGISHI,¹ NOBUO TANAKA,² AND TAIRO OSHIMA¹

¹Department of Molecular Biology, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, Horinouchi, Hachioji 192-03, Japan

²Department of Life Science, Tokyo Institute of Technology, Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 226, Japan

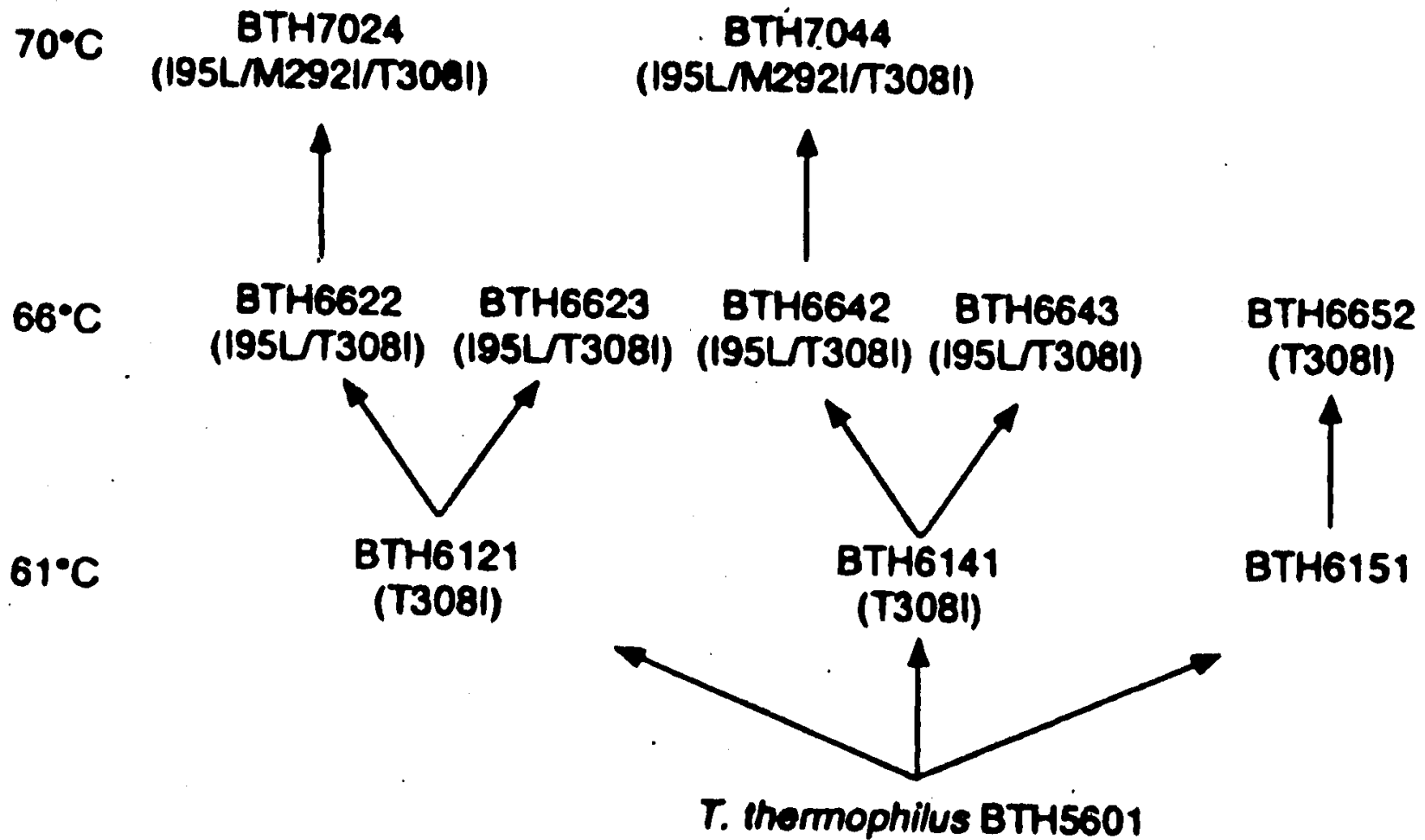
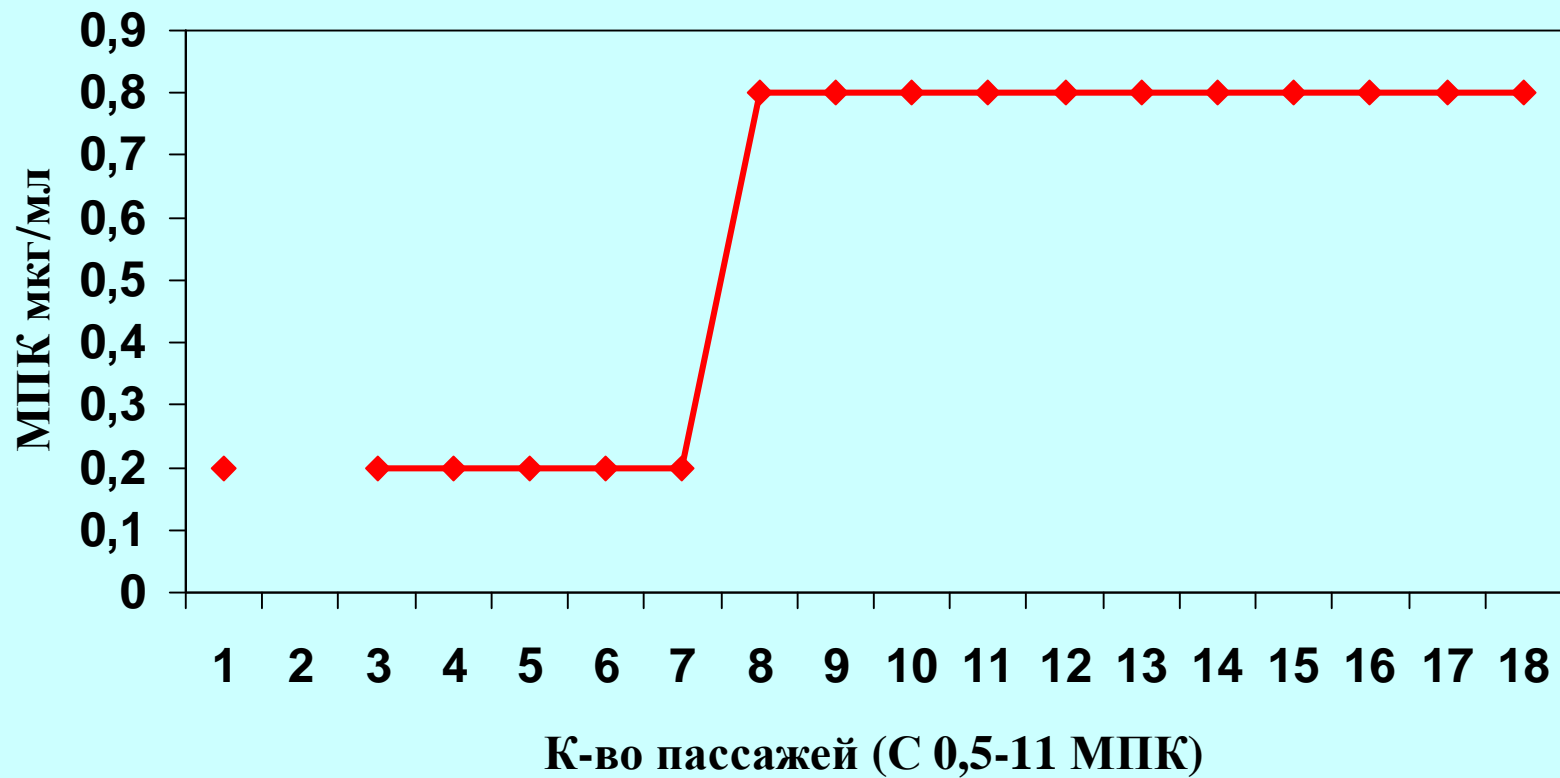


Fig. 5. Evolution pathway of *T. thermophilus* mutant strain, which carried *B. subtilis leuB* gene. Temperatures at which mutant strains were selected are shown.

Формирование устойчивости *B. antracis* к офлоксацину *in vitro*

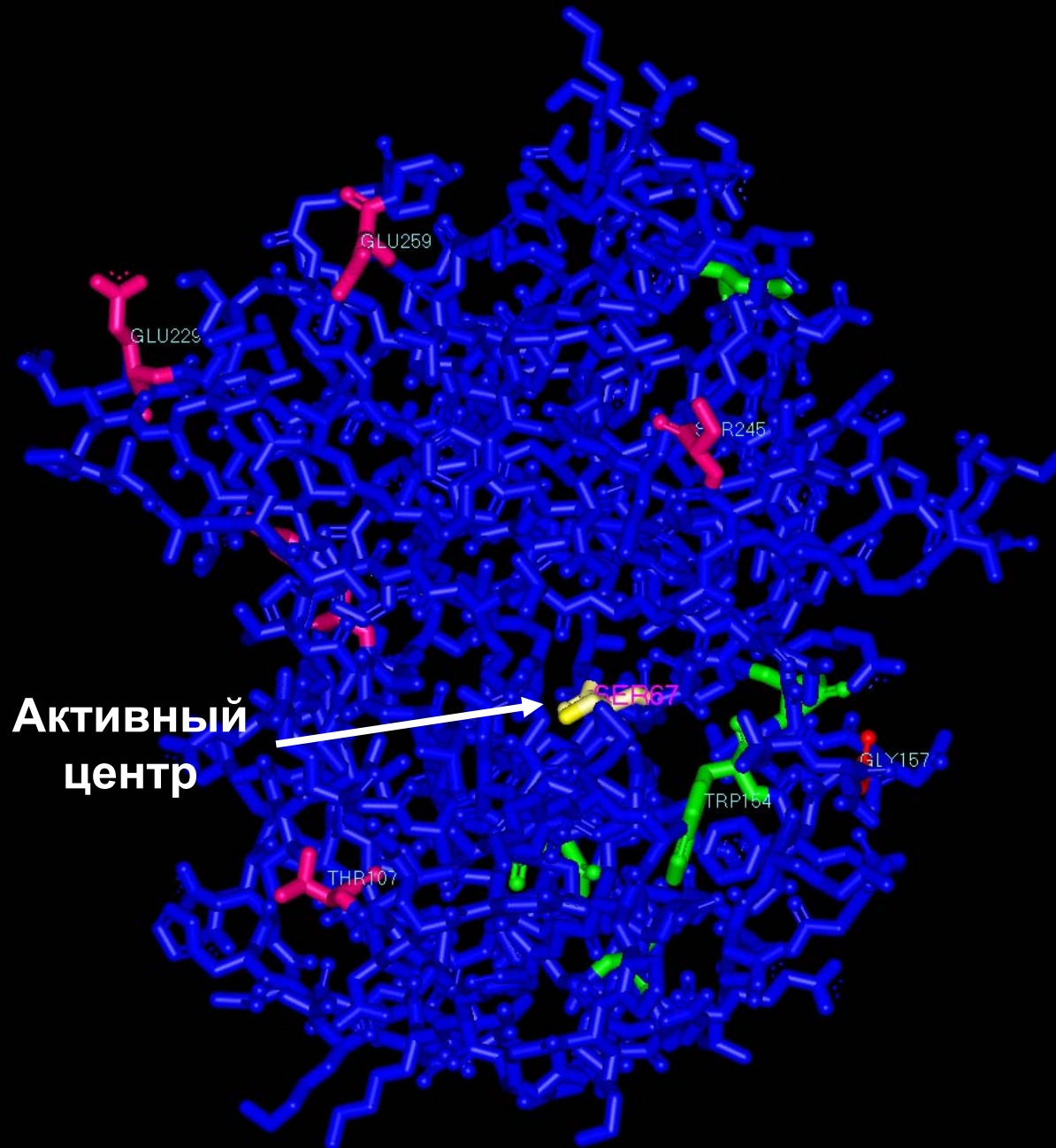


Choe et al AAC 2000;44:1766

Мутации в
молекуле
бета-лактамазы
ОХА,
обеспечивающие
улучшение
гидролиза
антибиотиков

Красные –
сильный эффект

Зеленые –
умеренный
эффект

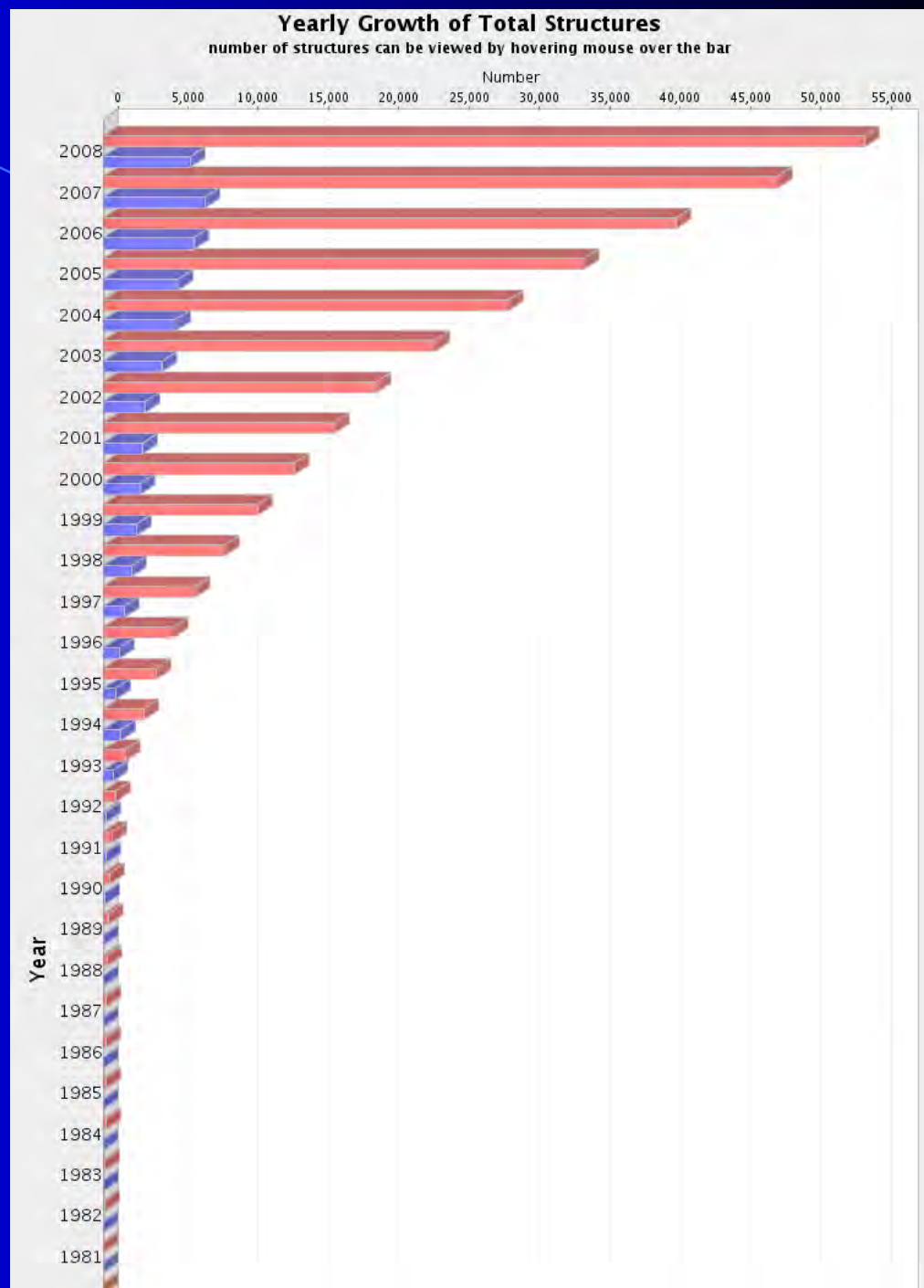


“RATIONAL DESIGN”

- Метод основан на выборе мутаций после анализа четвертичной структуры белка
- Используются высокоэффективные методы сайт-направленного мутагенеза
- Метод позволяет **одновременно** получать мутанты с разными аминокислотами в одном положении (насыщающий мутагенез)
- Для анализа требуется 5-25 клонов
- Позволяет вводить мутации, недостижимые с помощью других методов (введение S-S связей, одновременное введение нескольких мутаций в определенных положениях)
- **Требует наличия экспериментальных или расчетных данных по структуре фермента**

Рост количества структур в банке РДВ

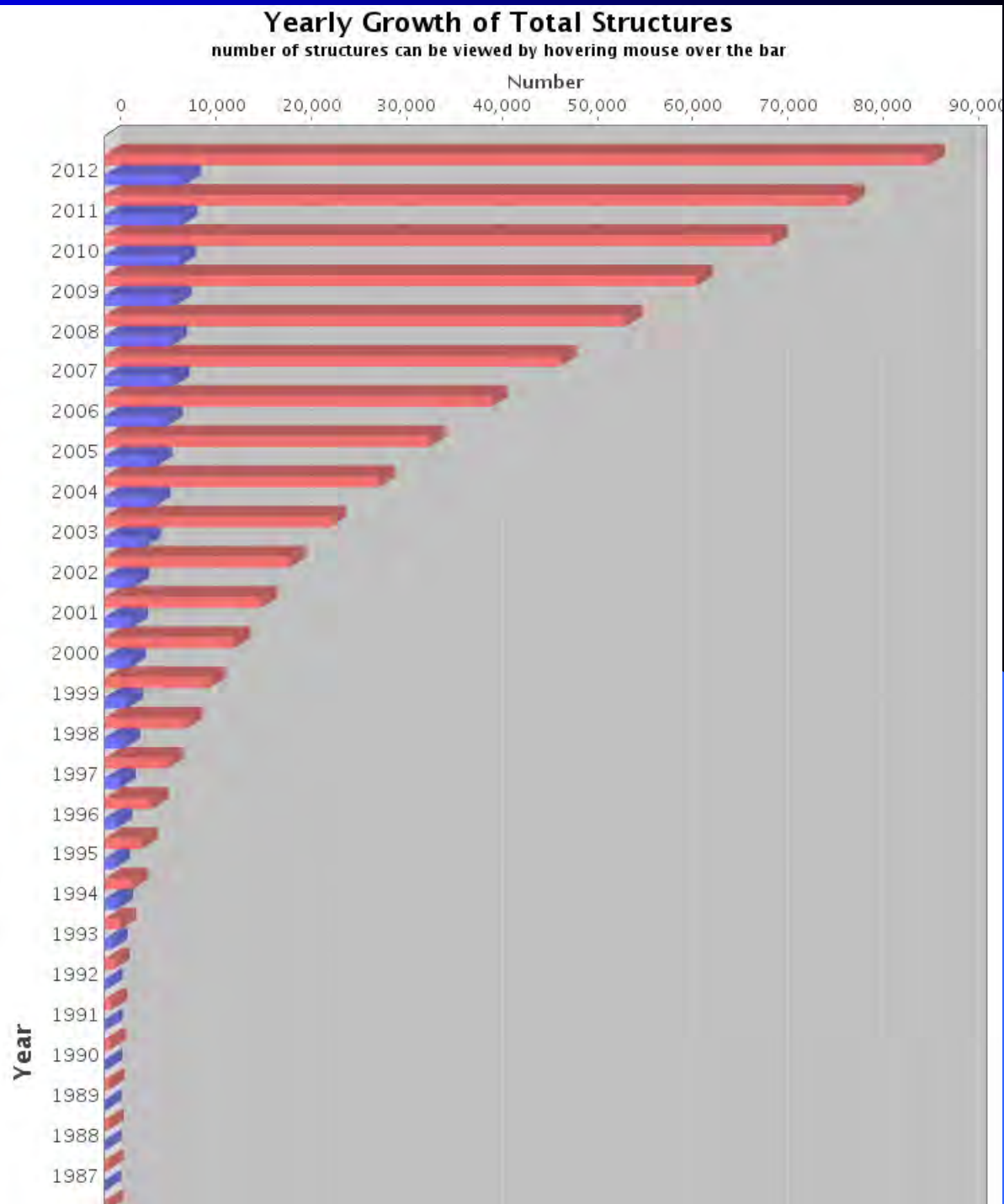
2008



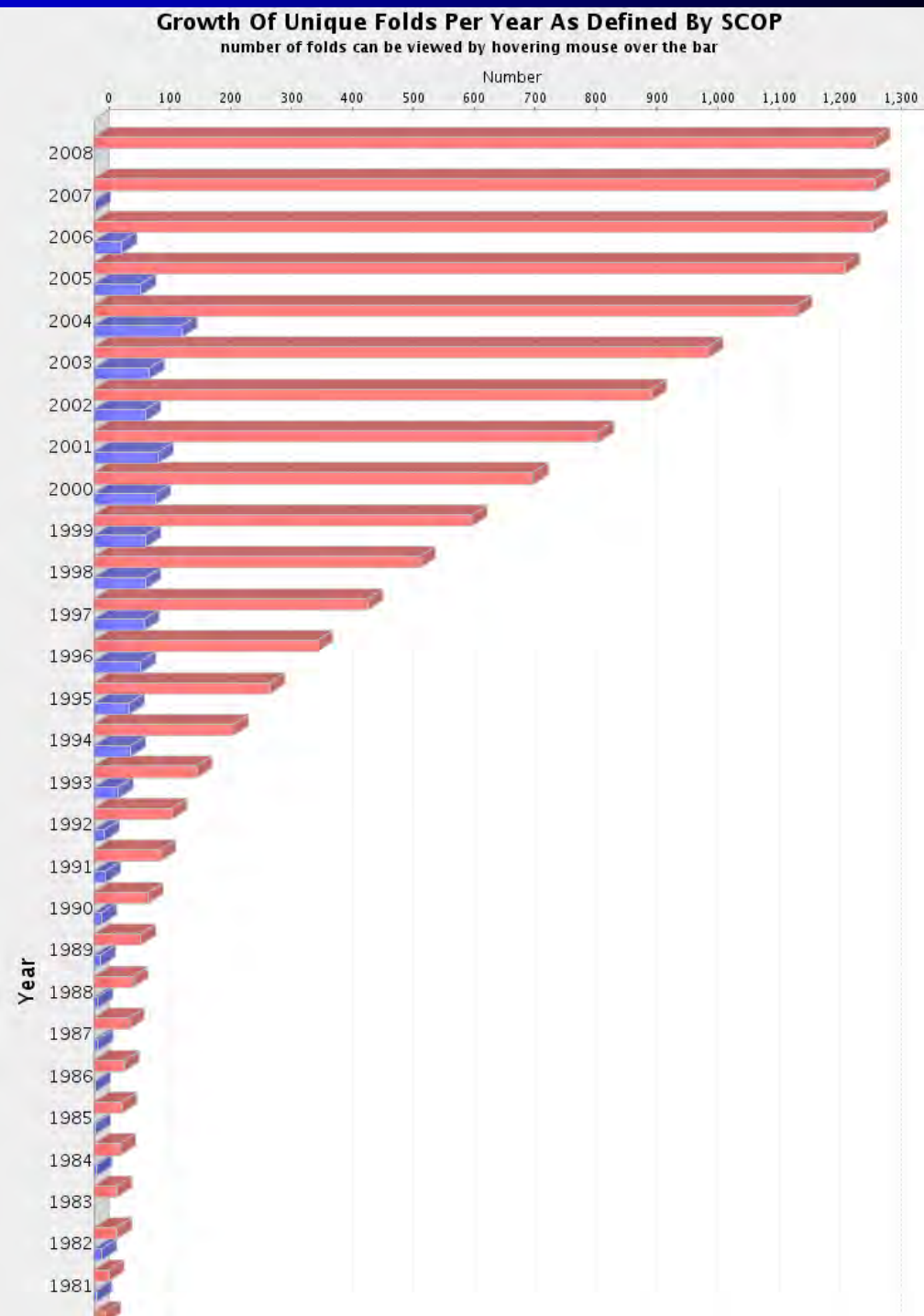
Рост количества
структур в банке
PDB

2012

2016 –
- 124286
структур



Рост
количества
УНИКАЛЬНЫХ
структур
белков
2008

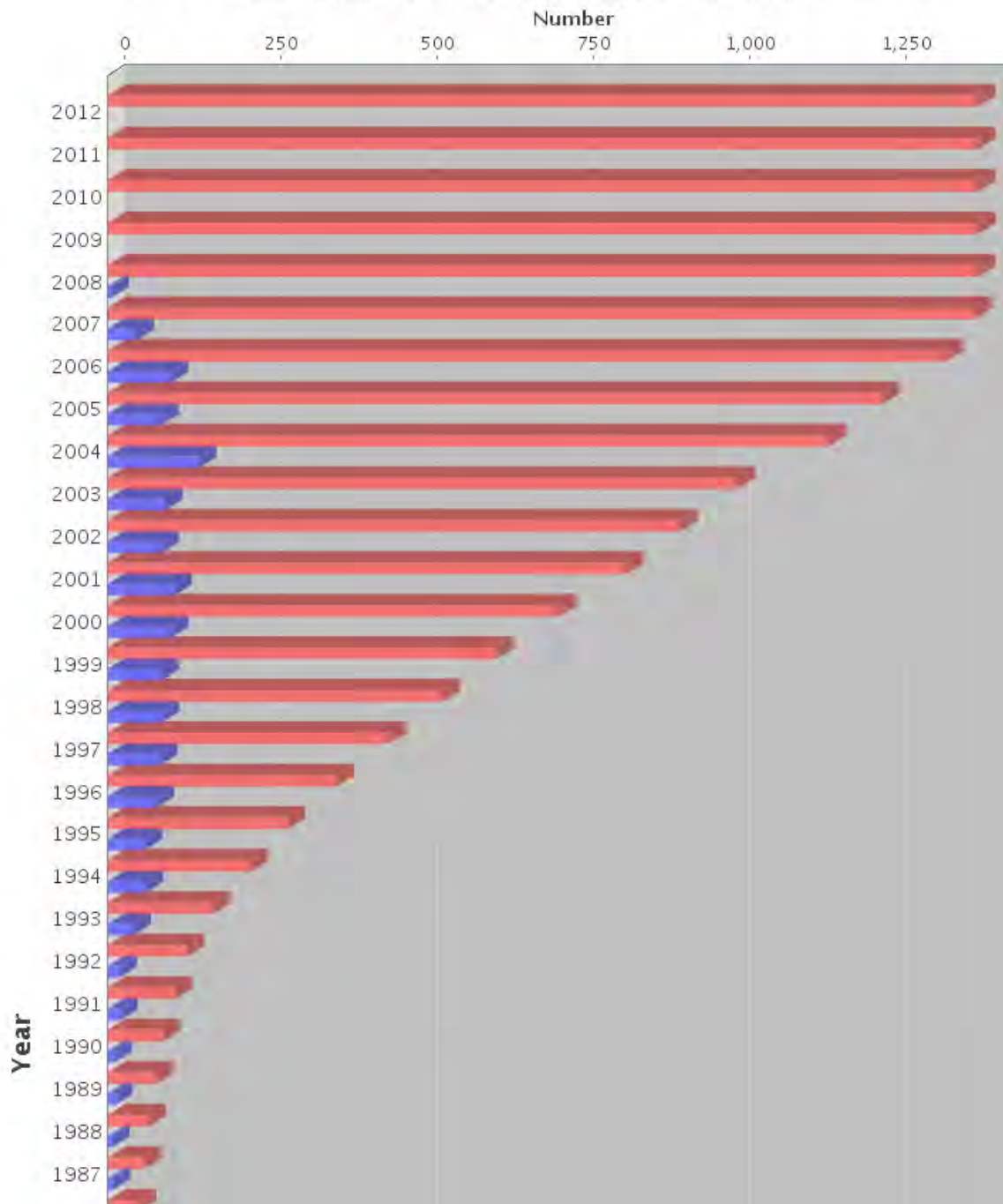


Рост
количества
УНИКАЛЬНЫХ
структур
белков

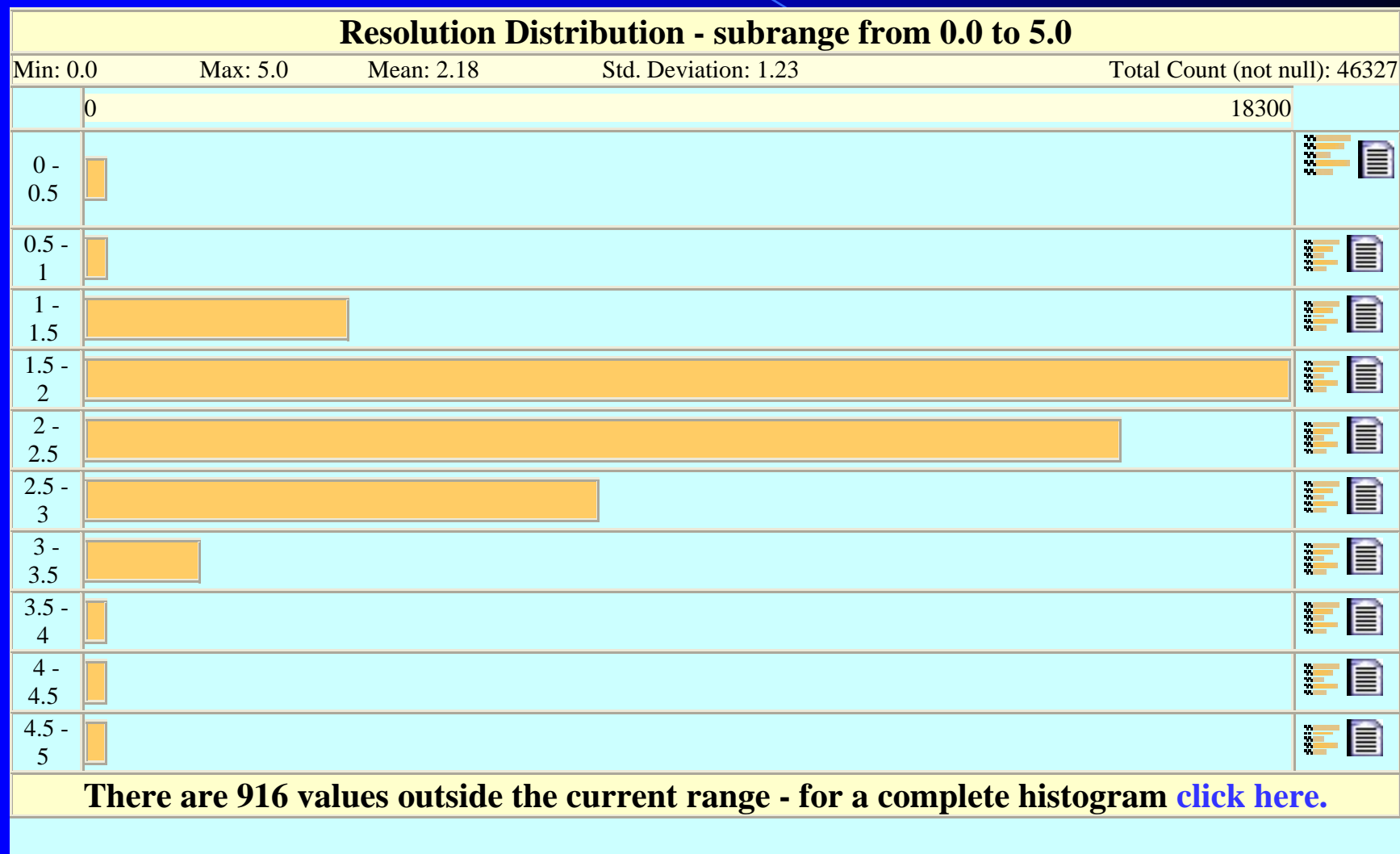
2012

Growth Of Unique Folds Per Year As Defined By SCOP (v1.75)

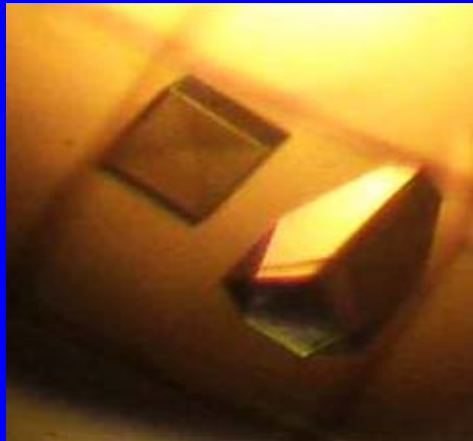
number of folds can be viewed by hovering mouse over the bar



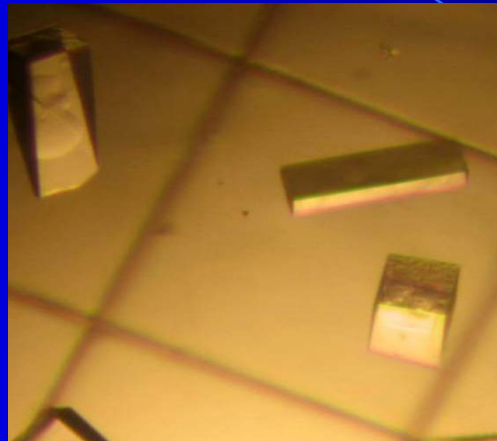
Более 50% структур имеют разрешение $\leq 2,0\text{\AA}$



Crystals of different complexes of formate dehydrogenases from *A.thaliana* and soya



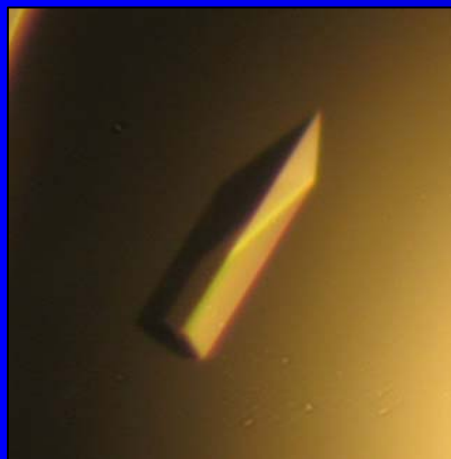
AraFDH + NAD⁺



apo-AraFDH

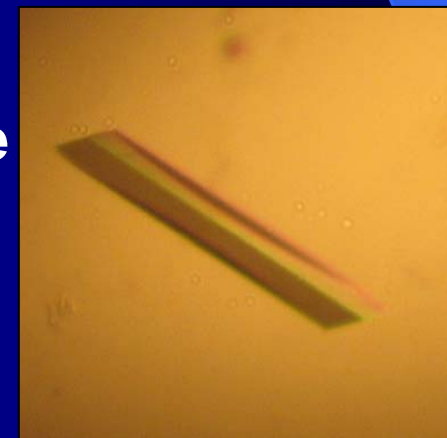


AraFDH + NAD⁺⁺ azide

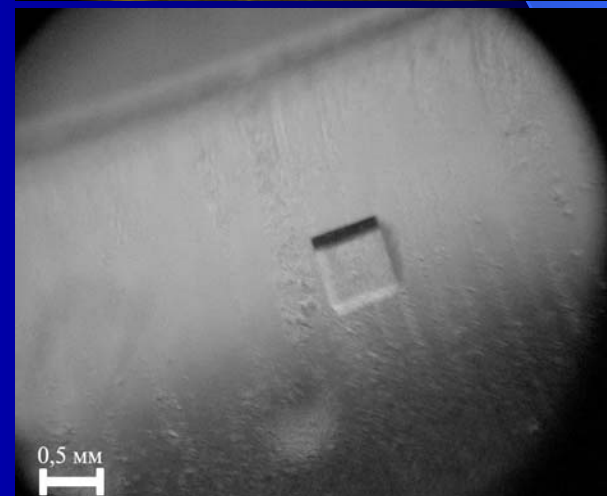
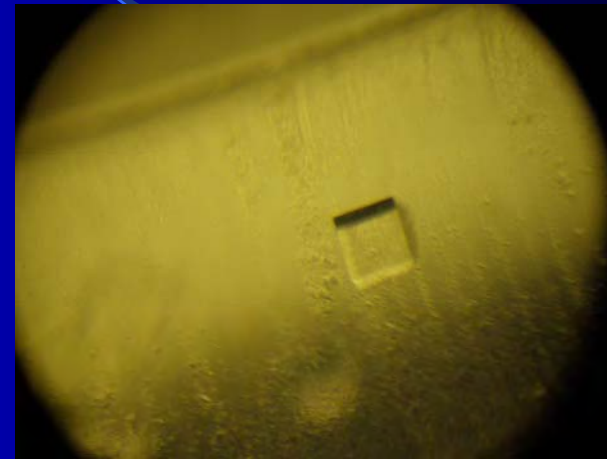
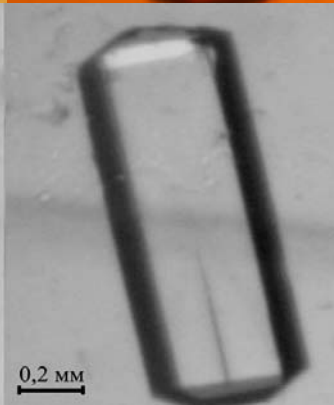
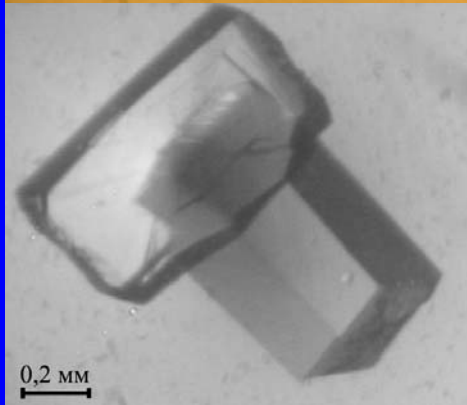
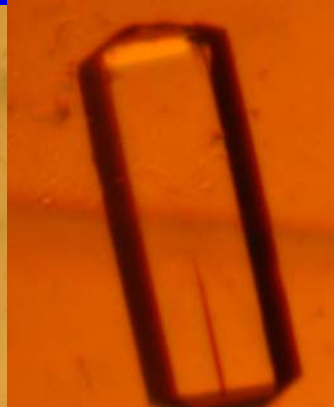
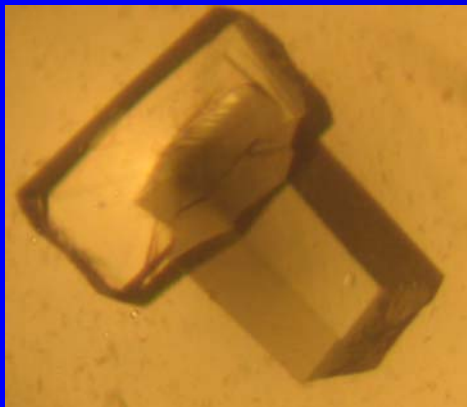
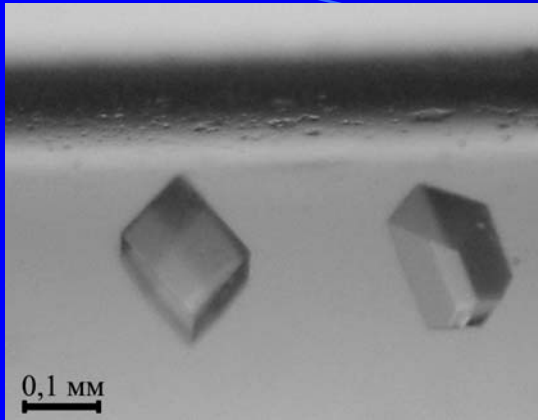


SoyFDH +
NAD⁺

SoyFDH +
NAD⁺⁺ azide



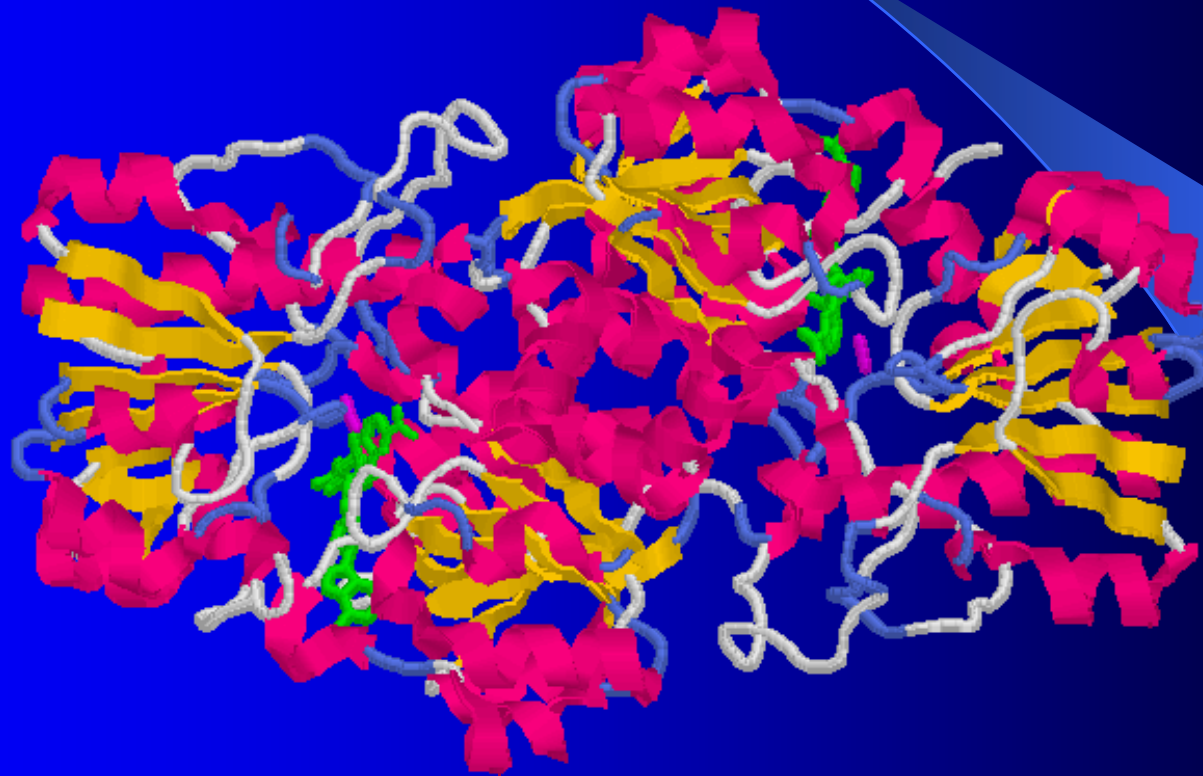
Crystal of AraFDH obtained in space



In collaboration with Prf. I. Kuranova, Prof. V. Popov and Dr. K. Polyakov



Конформационные изменения в молекуле формиатдегидрогеназы



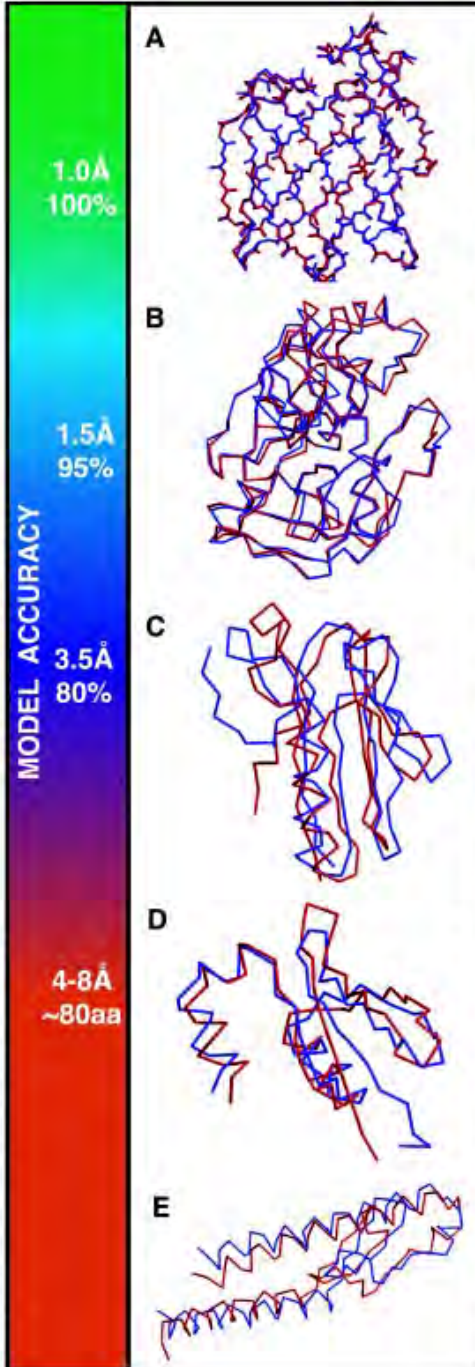
NMR, x-ray

Comparative modeling

Threading

de novo prediction

100
50
30
MODEL ACCURACY
1.0Å
100%
1.5Å
95%
3.5Å
80%
4-8Å
~80aa
Insignificant sequence similarity



APPLICATIONS

Studying catalytic mechanism

Designing and improving ligands

Docking of macromolecules, prediction of protein partners

Virtual screening and docking of small ligands

Defining antibody epitopes

Molecular replacement in X-ray crystallography

Designing chimeras, stable, crystallizable variants

Supporting site-directed mutagenesis

Refining NMR structures

Fitting into low-resolution electron density

Structure from sparse experimental restraints

Functional relationships from structural similarity

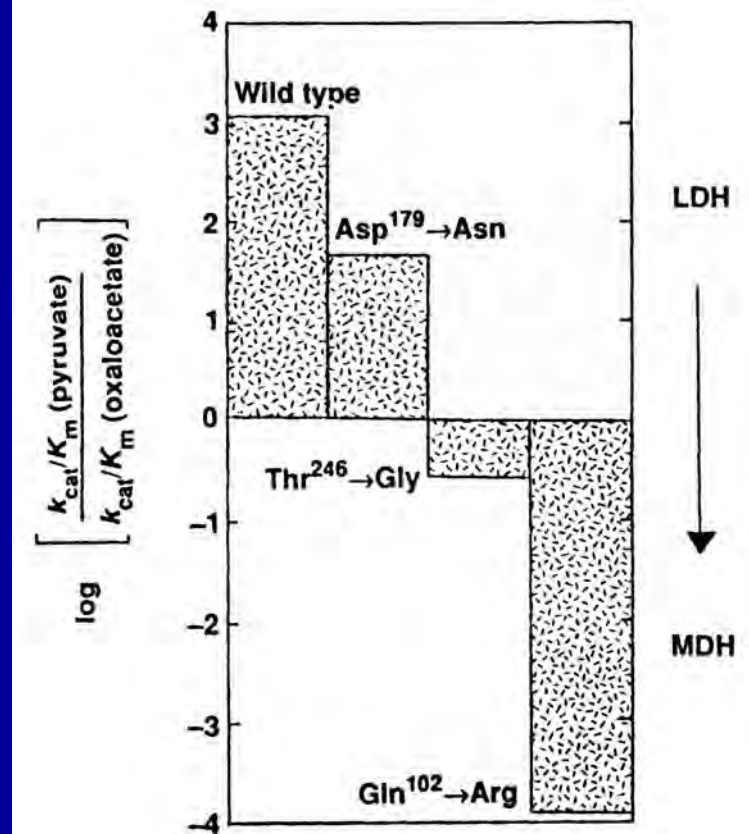
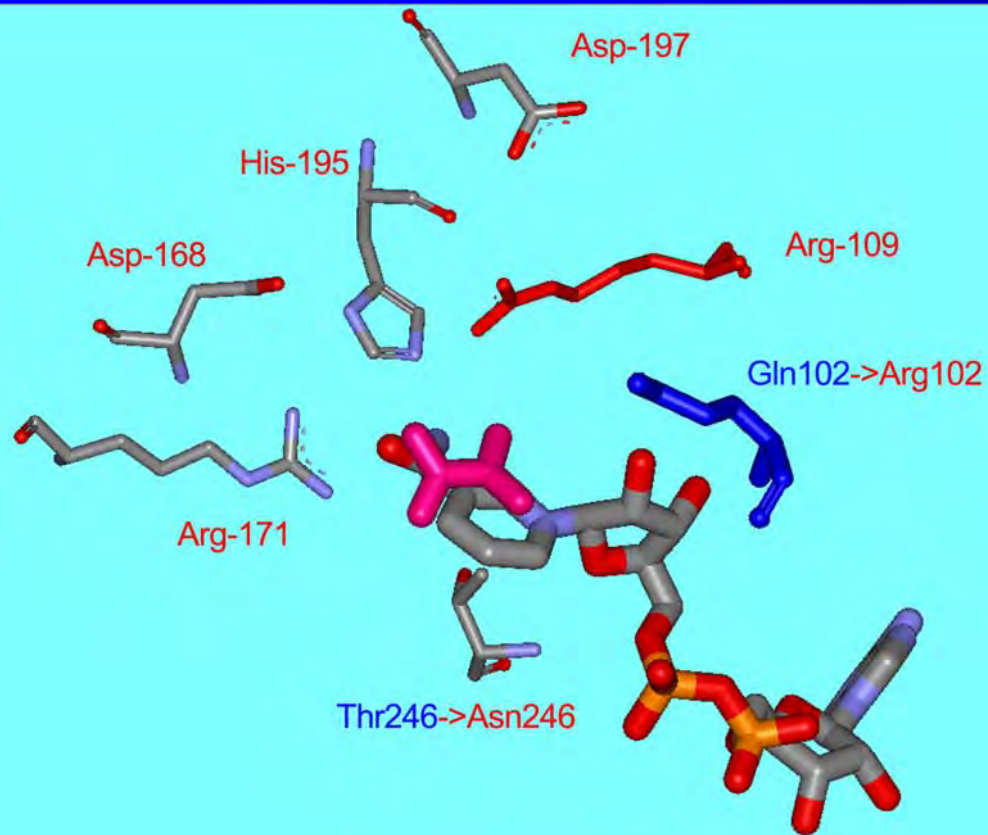
Identifying patches of conserved surface residues

Finding functional sites by 3D motif searching

Protein Structure Prediction and Structural Genomics

D. Baker and A. Sali,
Science, 2001, 294, 93

Получение малатдегидрогеназы из лактатдегидрогеназы



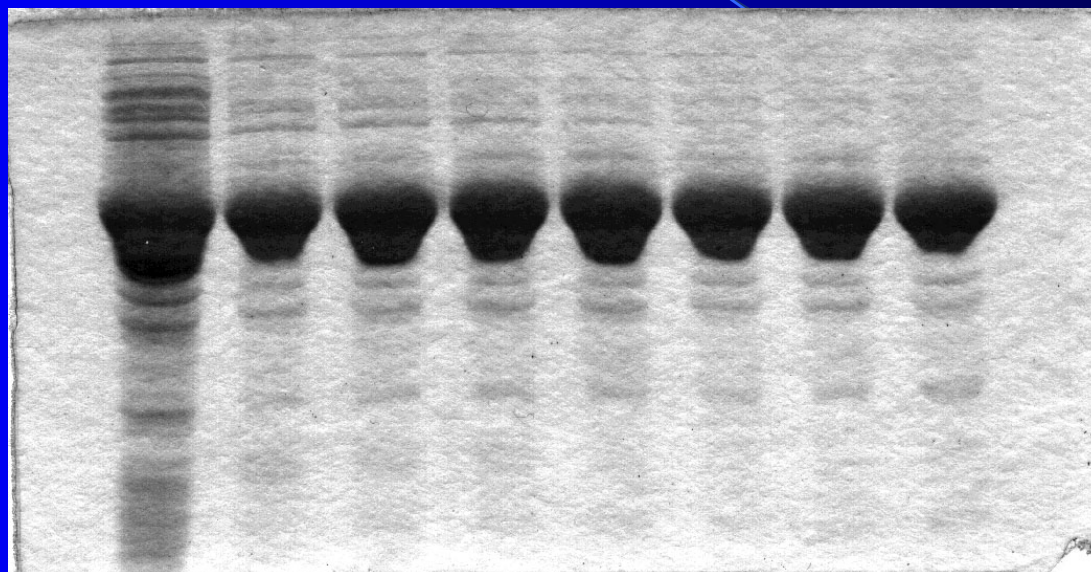
Holbrook J.J. et al, Science 1988

Rational design vs directed evolution

- ***Pseudomonas* sp.101 FDH**
 - 16 мутаций предложено и выполнено
 - 13 мутаций оказывали положит. эффект
 - 8 мутаций объединили
 - 100-кратное увеличение термостабильности и
 - 2-кратное улучшение K_M для NAD⁺
- ***Candida boidinii* FDH**
 - 400 000 клонов – 1-ый скрининг
 - 1500 – второй скрининг
 - 5 мутаций с положительным эффектом
 - 5 мутаций объединили - 50-кратное увеличение термостабильности без изменения каталитических свойств



Purification of recombinant *Pseudomonas* sp. 101 FDH with improved thermal stability by heat treatment

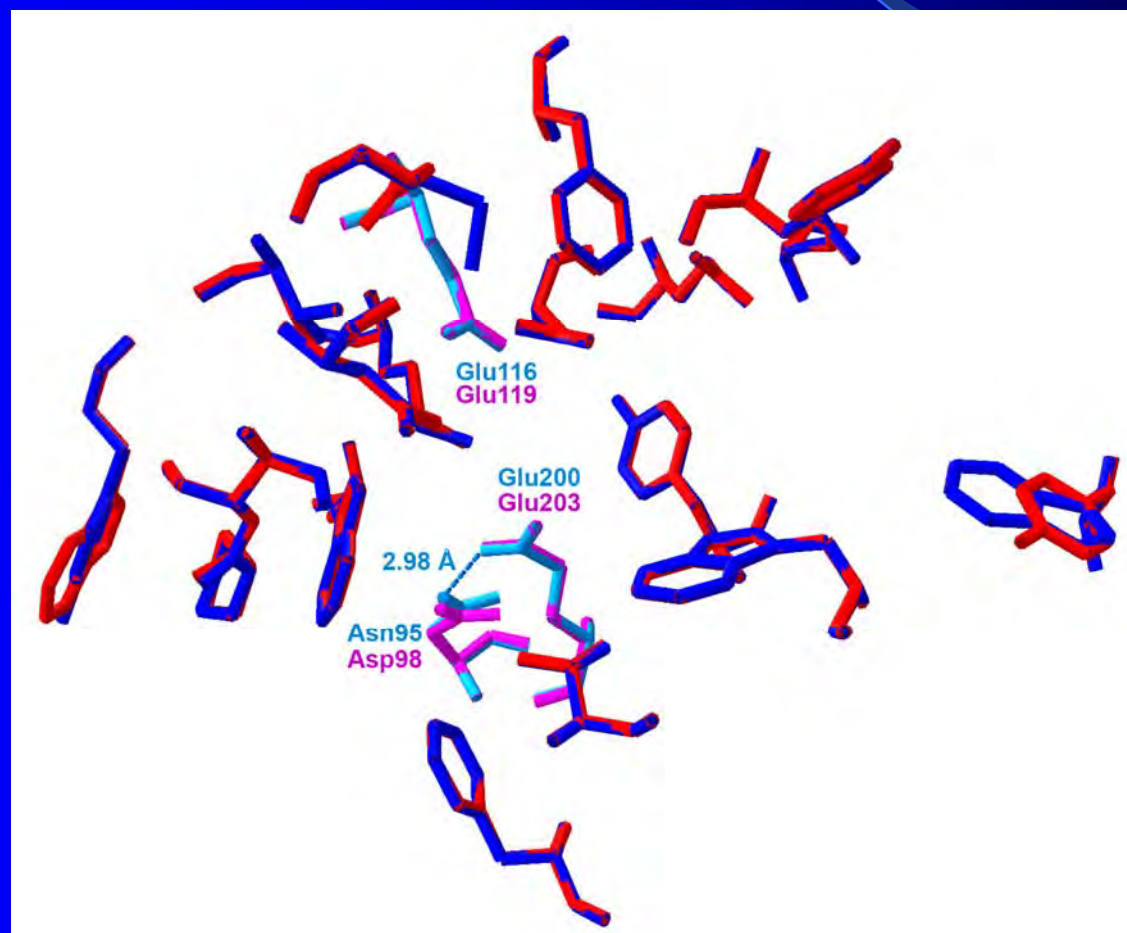


Time,
min 0 10 20 30 40 60 90 120

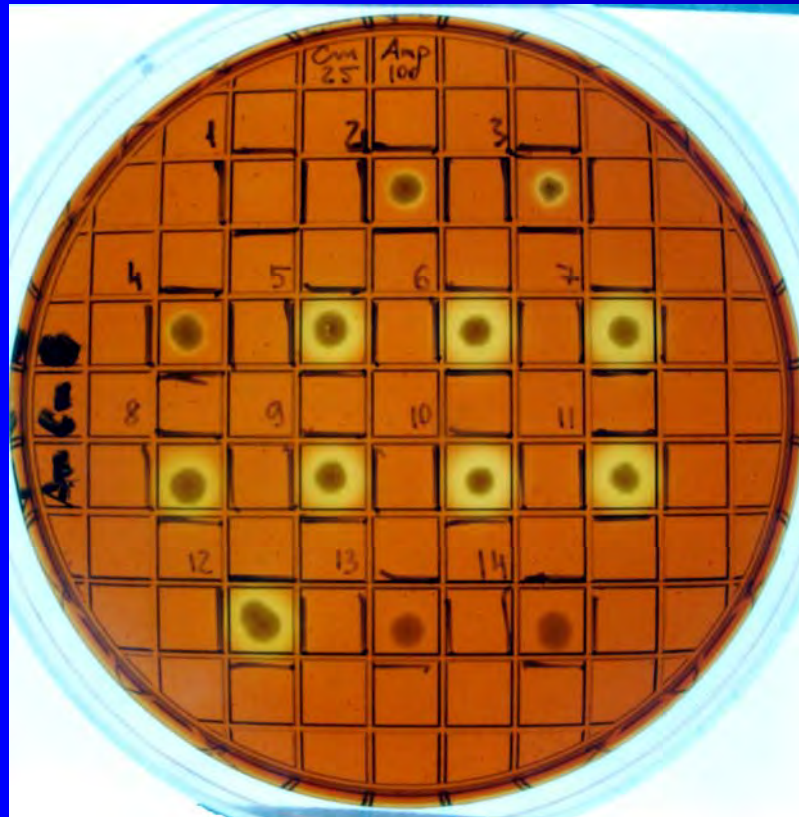
Heat treatment of disrupted cell suspension at 60 °C



Изменение рН-оптимума активности эндо- β -глюконазы III



Окраска по активности при pH 5,5

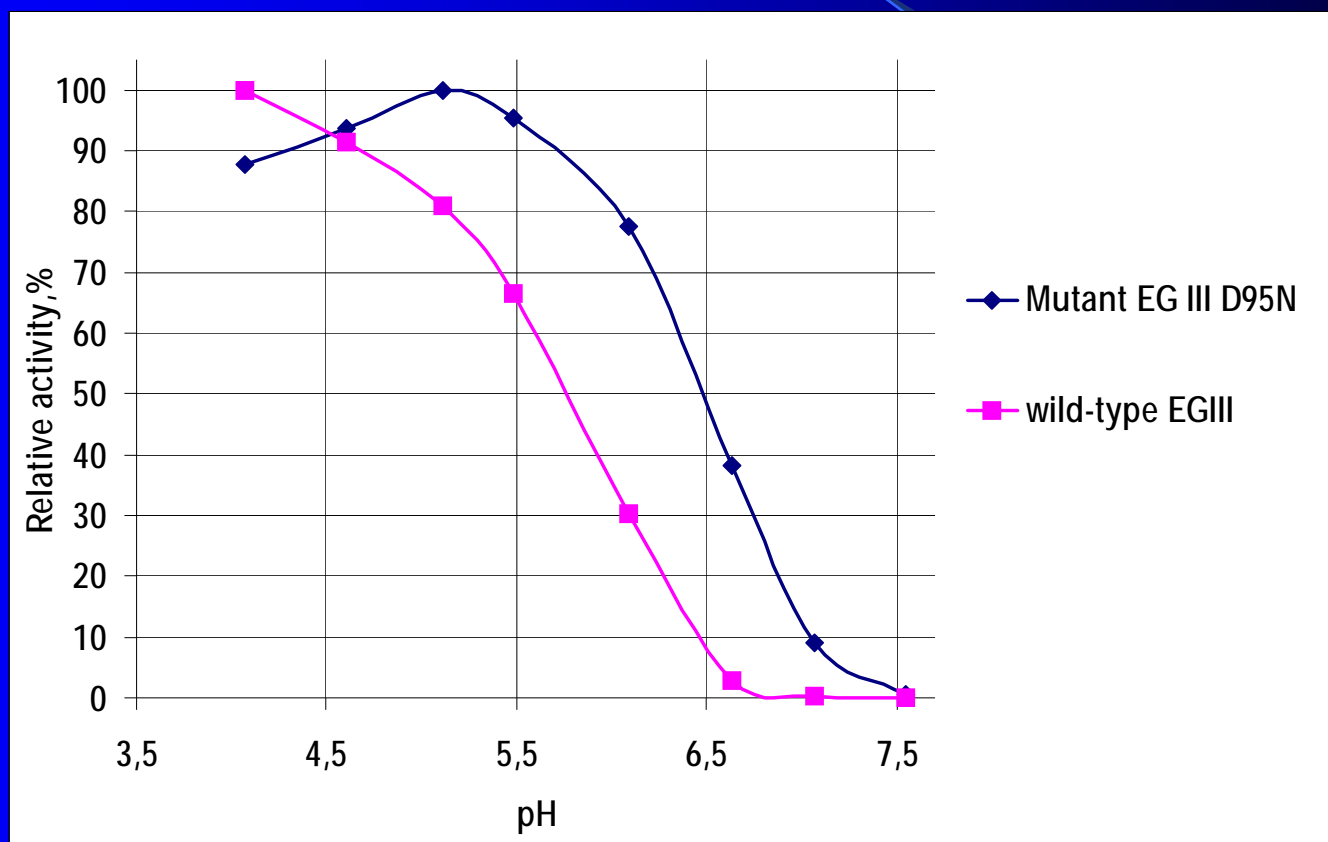


2-4 – EBGIII дикого типа

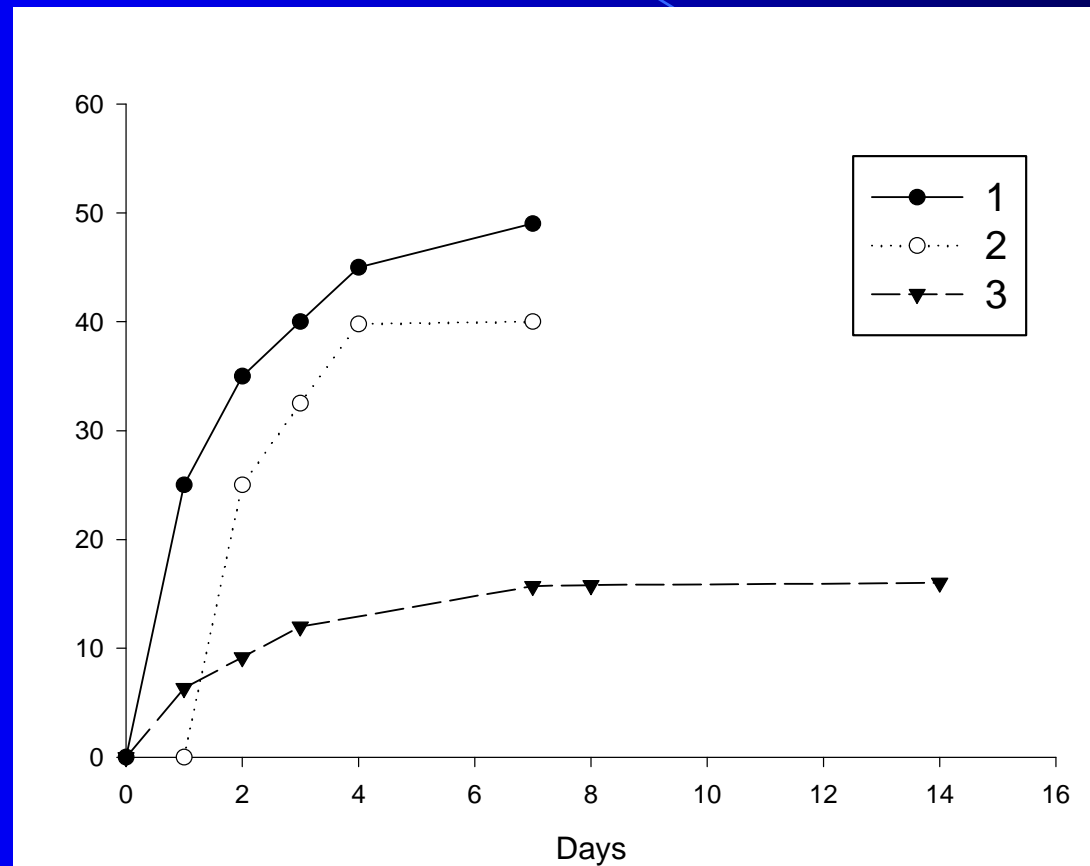
5-12 – мутант EBGIII
Asp95Asn

13-14 – контроль

Определение рН оптимума активности исходной и мутантной EBGIII

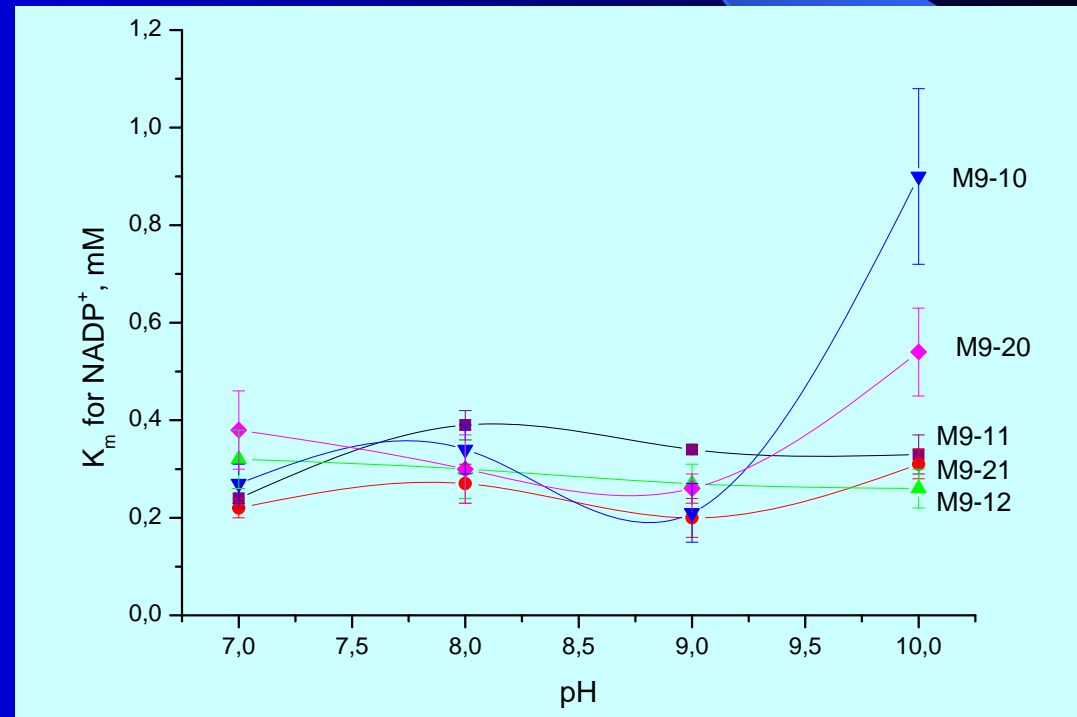
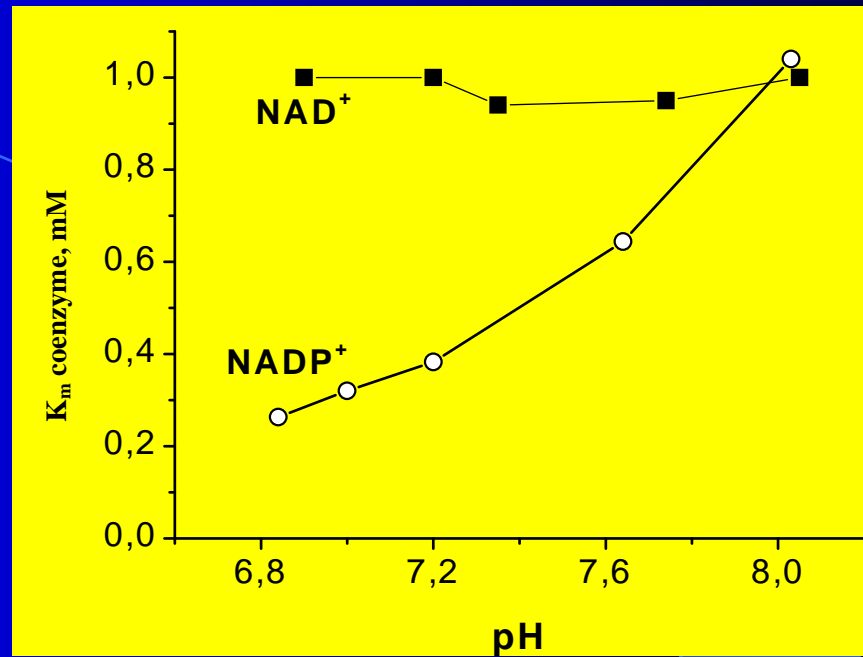


НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ПЕРОКСИДАЗЫ ТАБАКА



Выход активной пероксидазы табака при рефолдинге для фермента дикого типа (кривая 3) и ее мутанта Glu141Phe (кривая 1)

**pH-Dependence
of K_m for NADP^+
for the first and the
third generations of
 NADP^+ -specific
mutants of bacterial
formate
dehydrogenase**



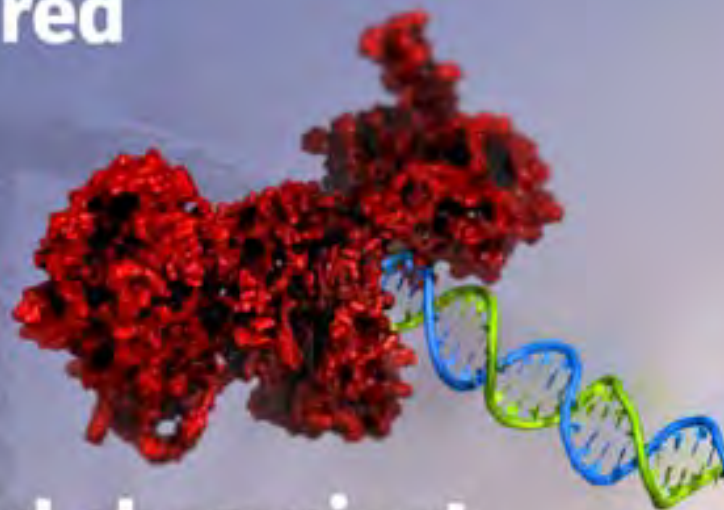
Диагностика SARS COV-2 с помощью изотермической ПЦР



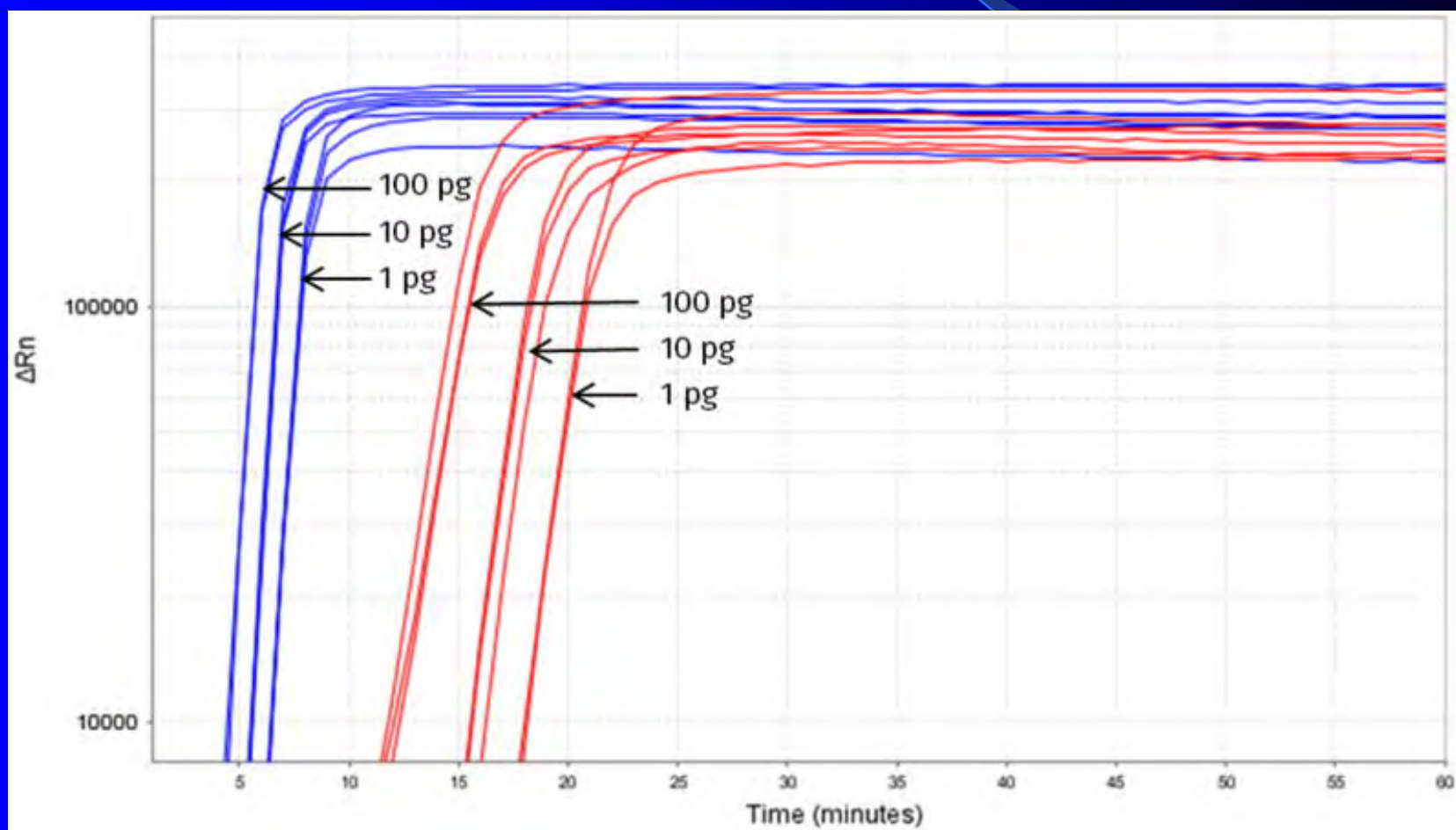
The racing car among Bst Polymerases

From zero to hundred
in no time.

Discover the
amplification speed champion!



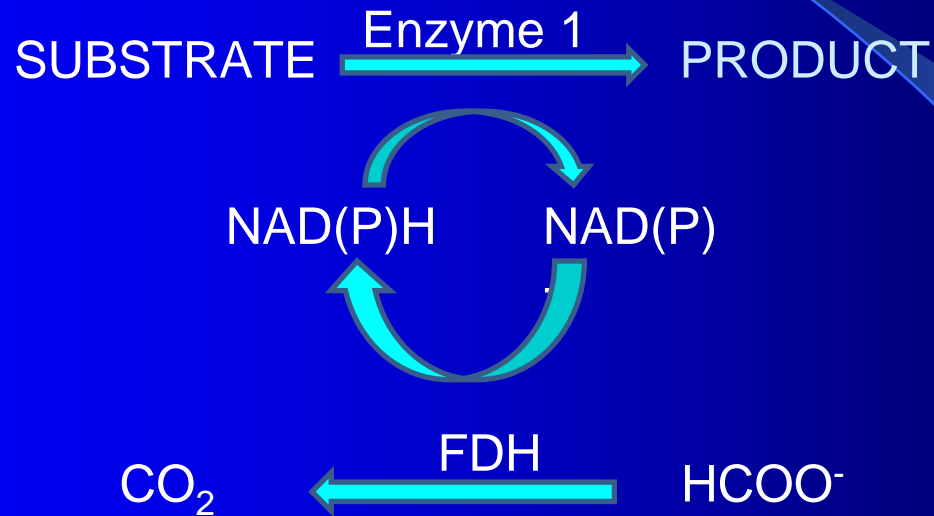
Сравнение эффективности мутантной Saphir Bst2.0 Turbo с ферментом дикого типа



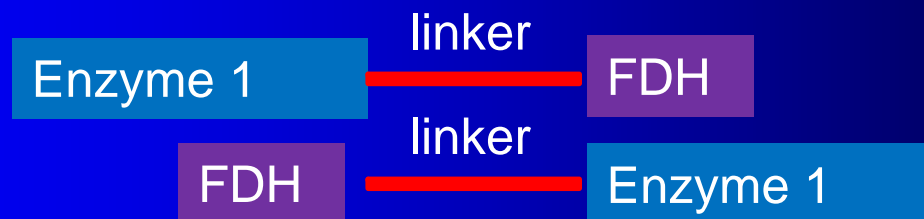
ГИБРИДНЫЕ «СЛИТЫЕ» ФЕРМЕНТЫ (FUSION ENZYMES)



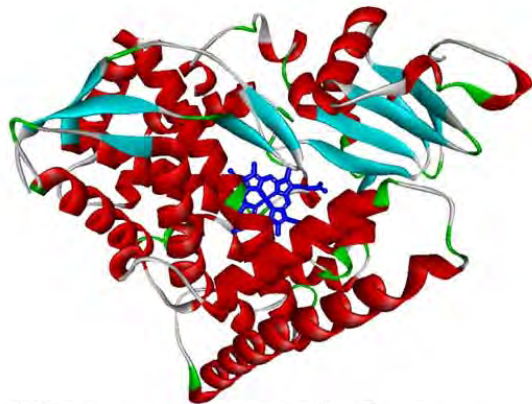
Scheme of catalysis with NAD(P)H regeneration



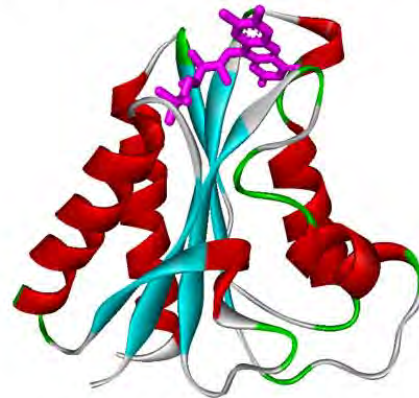
Possible fusion enzymes



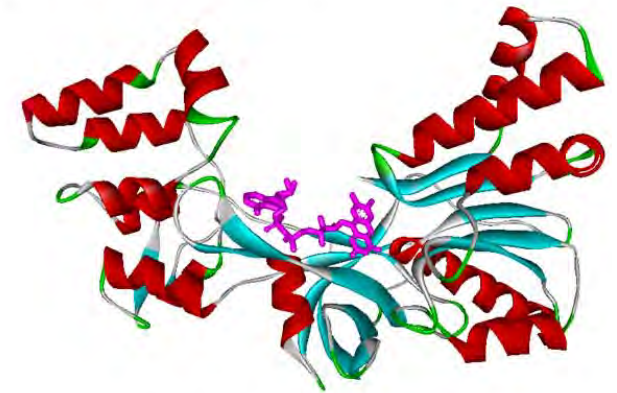
Cytochrome P450 monooxygenase from *Bacillus megaterium* (P450 BM3)



Heme-containing domain



FMN-containing domain



FAD-containing domain

Catalytic domain

Reductase domain



Hybrid enzymes based on PseFDH and BM3 P450

Total length of polypeptide chain is more than 1 600 amino acids

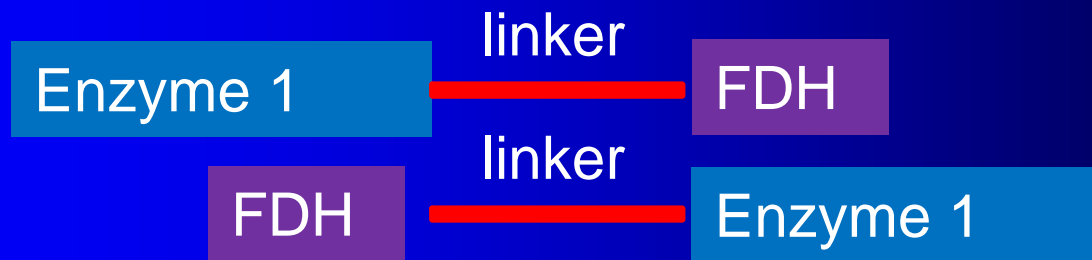
- 400 aa PseFDH
- 1200 aa BM3 P450

Dimer of two hybrid subunits,
 $2 \times 1\,600 = 3\,200$ aa (at least)



PROBLEMS TO SOLVE

1. Estimation of the best order of enzymes in hybrid (could be predicted by structure modeling)



2. Polylinker

3. Position of His-tag (N- o C- terminii) for purification

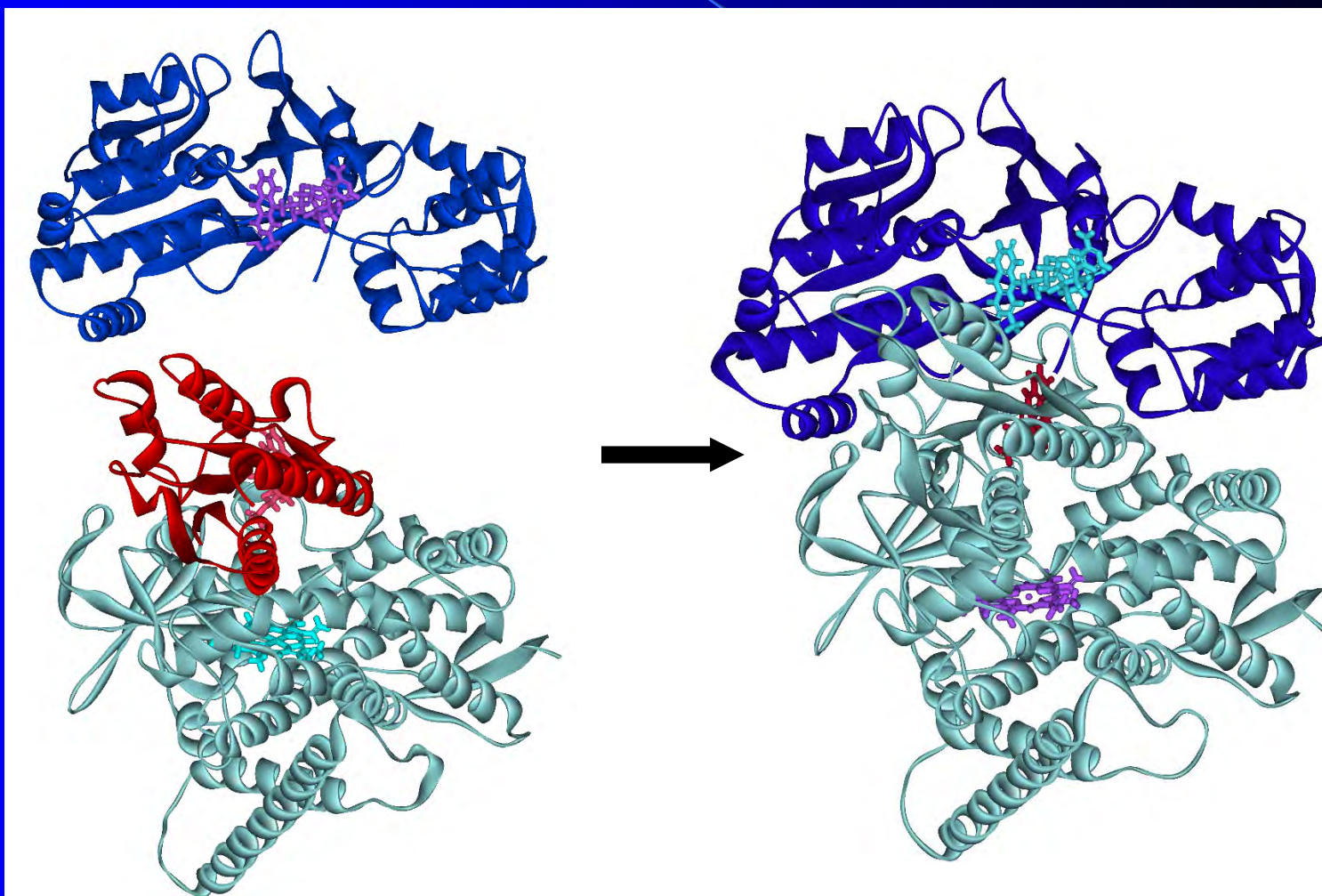


Modeling full structure P450 BM3

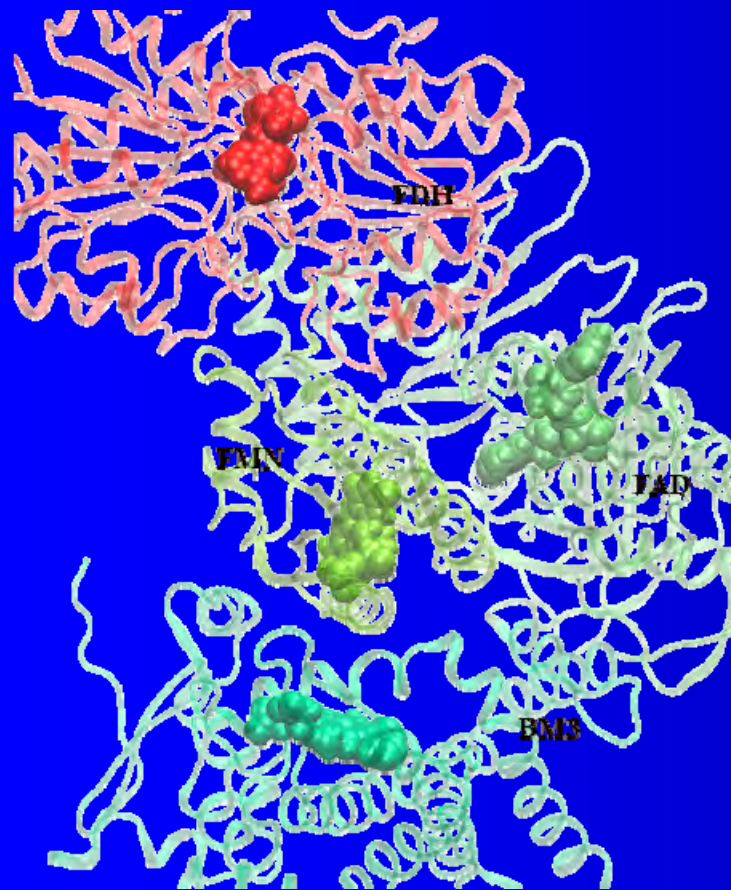
FAD-содержащий домен
PDB: 4DQK

FMN-содержащий домен

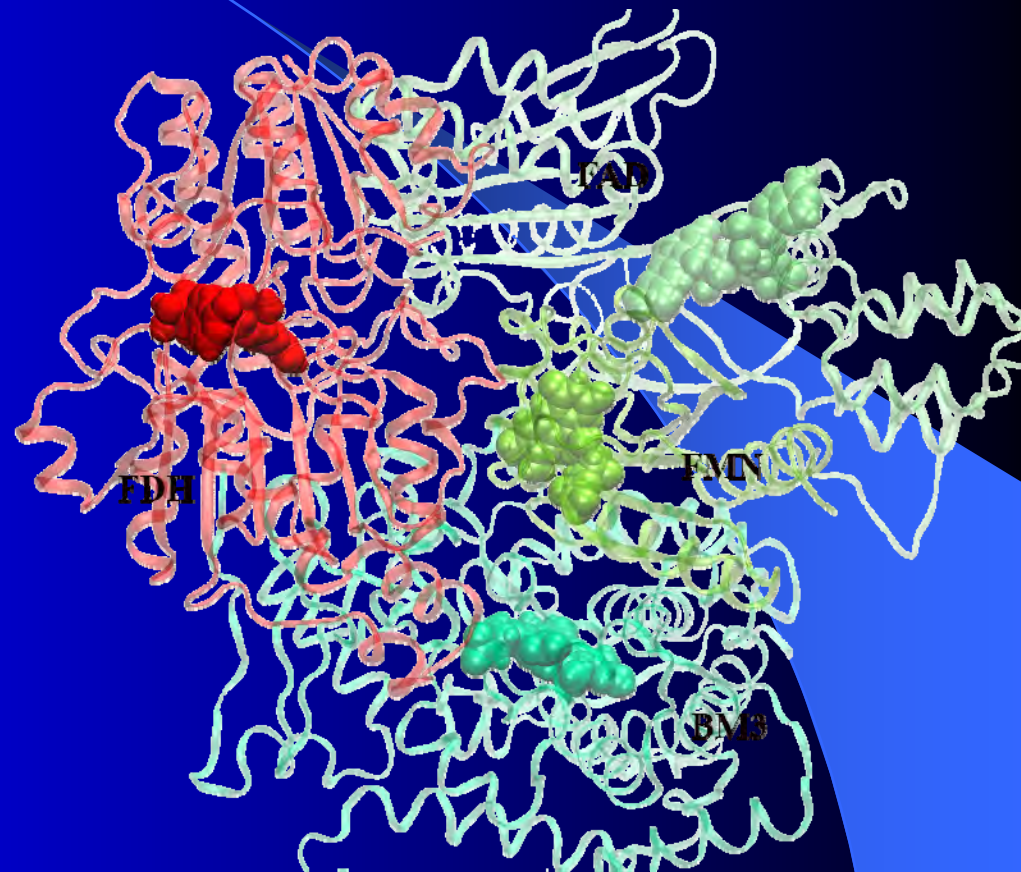
Гем-содержащий домен
PDB: 1BVY



Modeling of active sites orientation in hybrids BM3-FDH and FDH-BM3



BM3-FDH



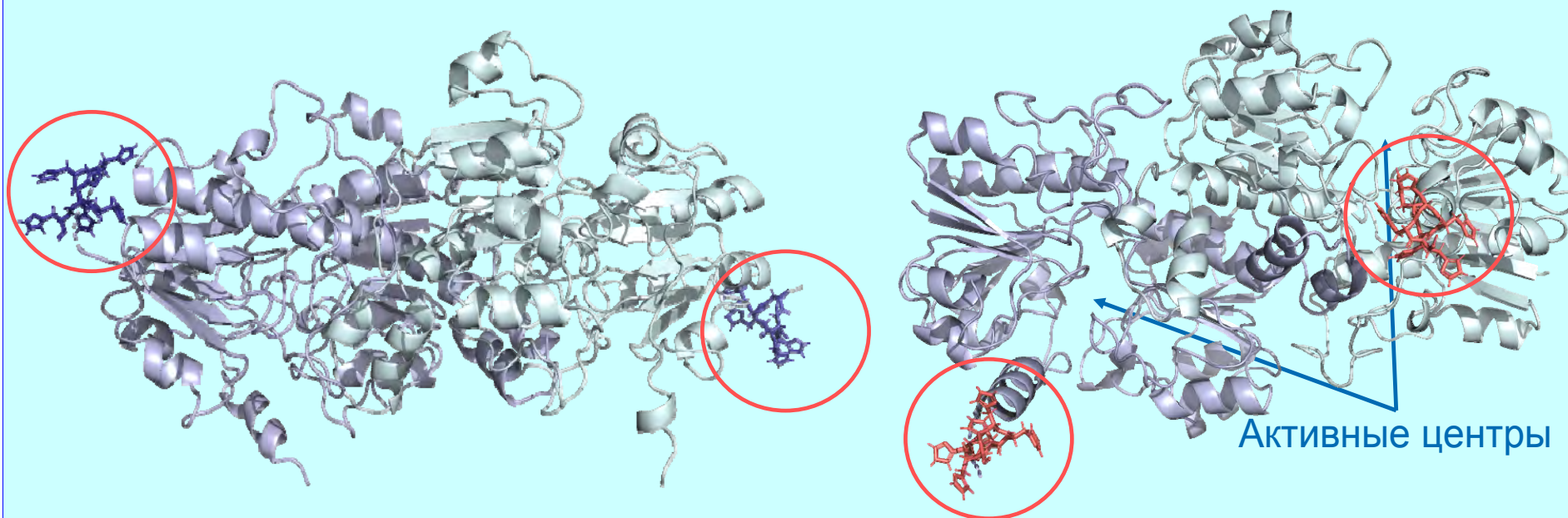
FDH-BM3



In collaboration with Prof. M. Khrenova



Position of His-tag in FDH



His₆-PseFDH

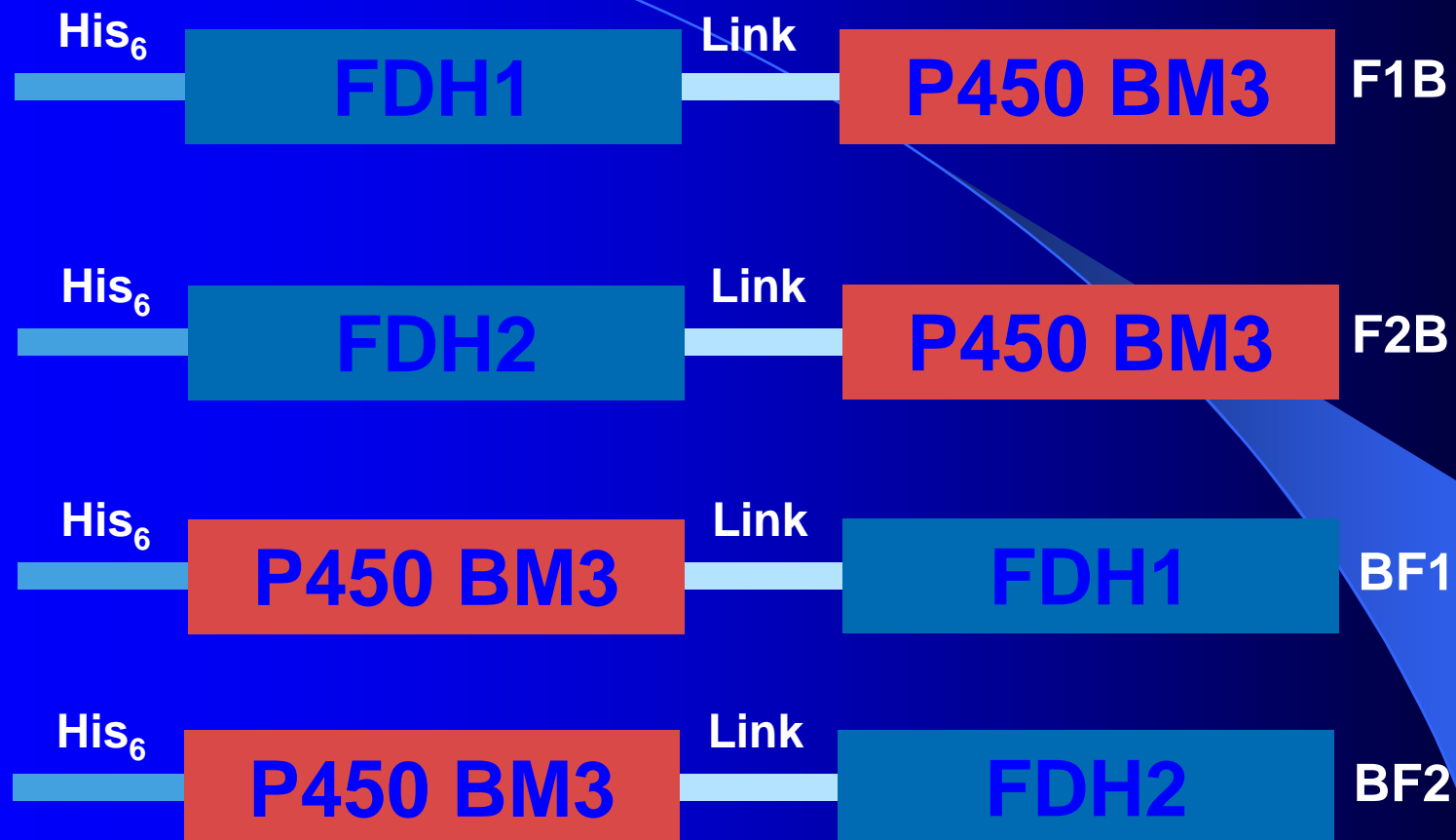
PseFDH-His₆

FDH	k_{cat} , C ⁻¹	$K_M^{NAD^+}$, MKM	$K_M^{HCOO^-}$, MM
OpaFDH	4,5	12,7	2
OpaFDH-His ₆	2,3	83	0,8



Hybrid molecules prepared with FDH and BM3 P450

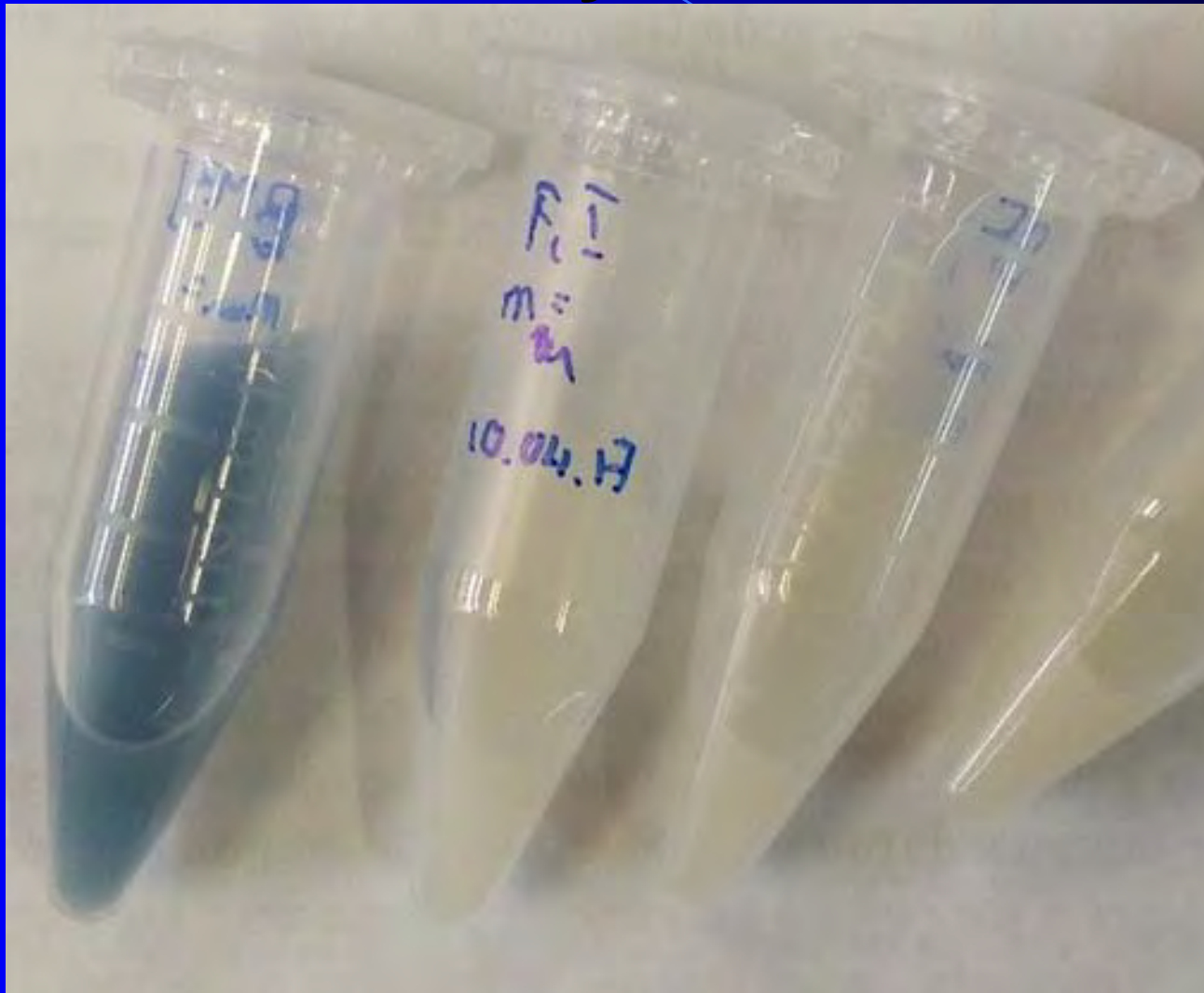




- FDH1 - PseFDH SM4 D221Q
- FDH2 - PseFDH D221Q
- Link - linker SGGGGS



Expression of free enzymes and hybrids



P450 BM3^(4m)

A74G/F87V/L188G/R471C

FDH-1 (1m)

NADP⁺ D222Q

F1B

FDH-1

ASGGGGS

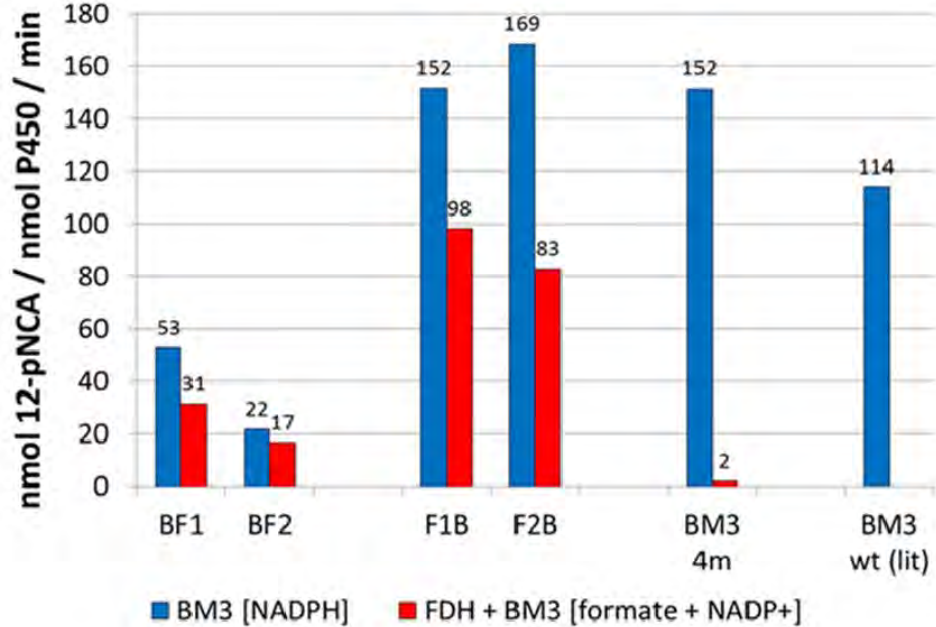
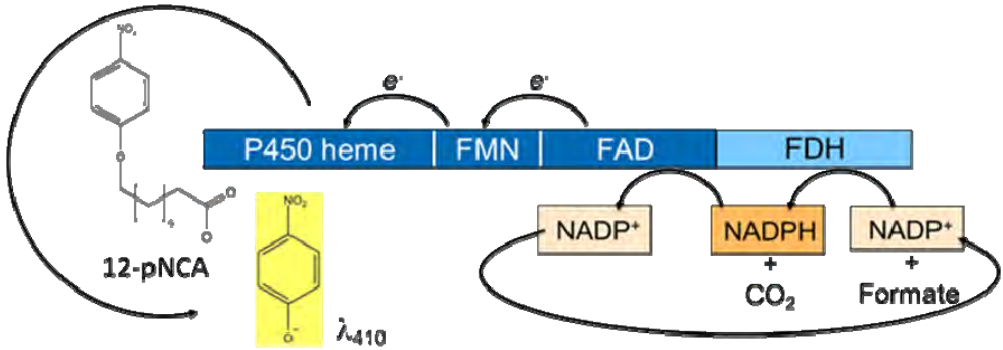
P450 BM3

BF1

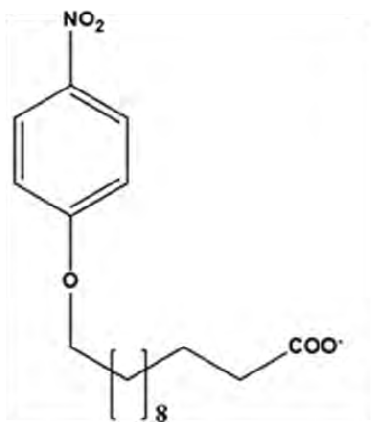
P450 BM3

ASGGGGS

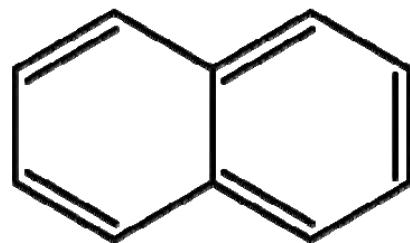
FDH-1



Tested substrates of P450 BM3



12-pNCA



Naphtalene

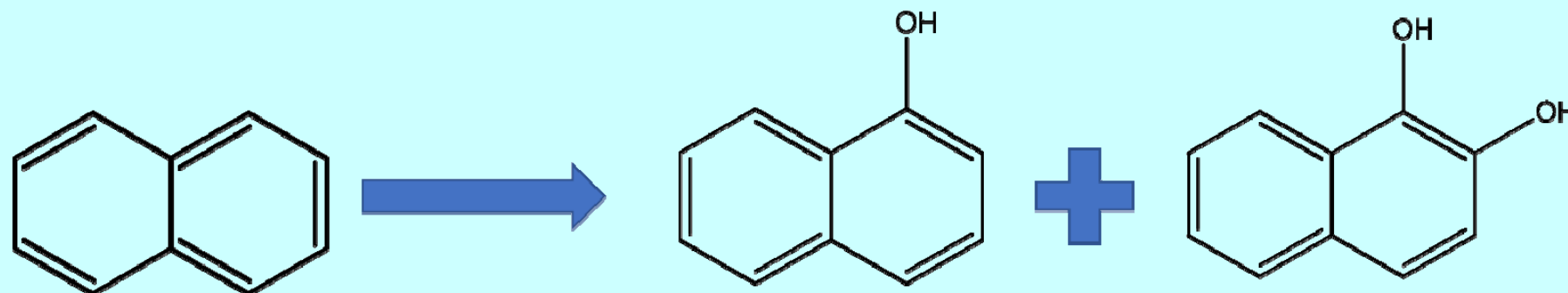


Octane

Decane



Hydroxylation of naphthalene by BM3 P450



Enzyme	A, U/ml	$A_{\text{fusion}}/A_{\text{BM3}}$	Full conversion time NADPH, min
BM3	$0,15 \pm 0,01$	1	70 ± 5
F1-BM3	$0,54 \pm 0,05$	3,5	13 ± 2
F2-BM3	$0,88 \pm 0,04$	5,7	8 ± 1

0,05M NaPB pH 7,5, 0,3 mM naphthalene, 0,15 mM NADPH



Test conversion

Activity with octane (0,05M NaPB pH 7,5, 0,3 mM octane, 0,15 mM NADPH). Time – 15 min

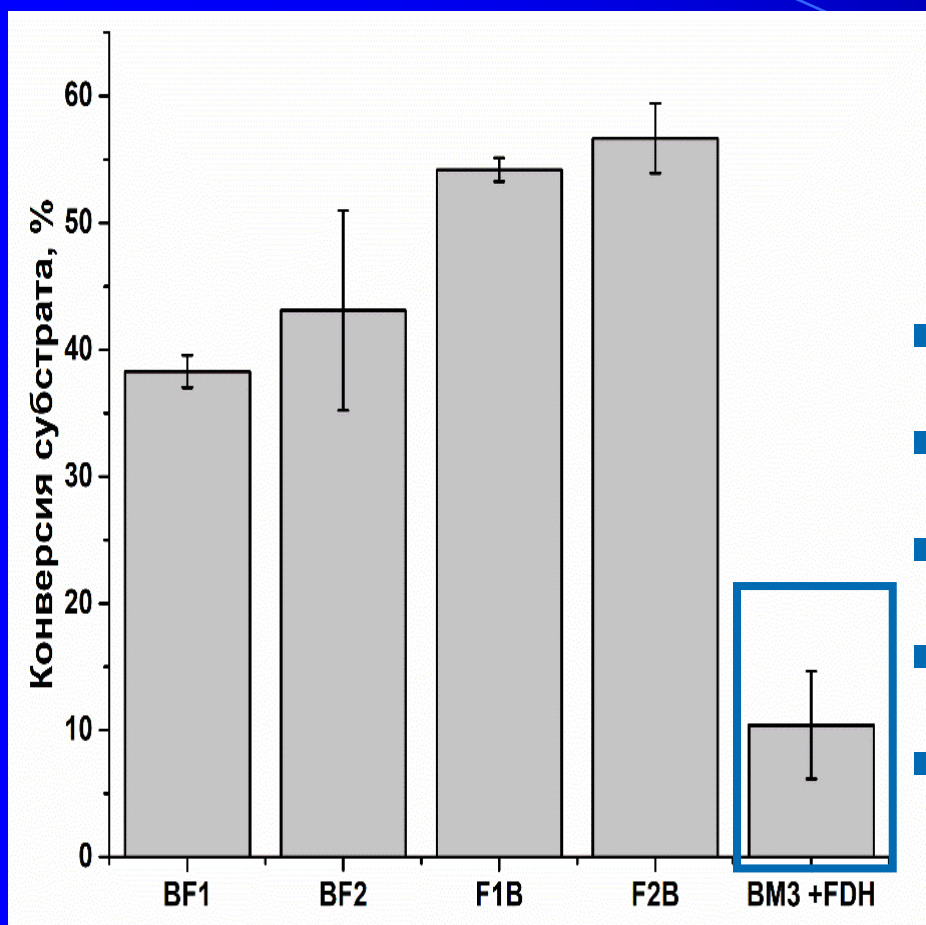
Enzyme	A, U/ml	$A_{\text{fusion}}/A_{\text{BM3}}$	Conversion, %
BM3	$0,39 \pm 0,02$	1	$3,0 \pm 0,5$
F1-BM3	$0,87 \pm 0,02$	2,2	34 ± 2
F2-BM3	$1,03 \pm 0,03$	2,6	49 ± 2

Activity with decane (0,05M NaPB pH 7,5, 0,3 mM decane, 0,15 mM NADPH) Time - 15 min

Enzyme	A, U/ml	$A_{\text{fusion}}/A_{\text{BM3}}$	Conversion, %
BM3	$0,23 \pm 0,02$	1,0	$2,0 \pm 0,2$
F1-BM3	$0,40 \pm 0,04$	1,8	$4,0 \pm 0,5$
F2-BM3	$0,46 \pm 0,02$	2,0	$5,0 \pm 0,5$



Conversion of Myristic Acid with NADPH regeneration



- 2 mM NADP⁺ 1,5 M HCOONa
- 10 minutes
- Room temperature
- 200 μ M substrate
- 50 nM enzyme

- All hybrid biocatalysts showed a 4-6 fold higher activity compared to mixture of individual enzymes
- Activity of system FDH-BM3 was higher than of BM3-FDH

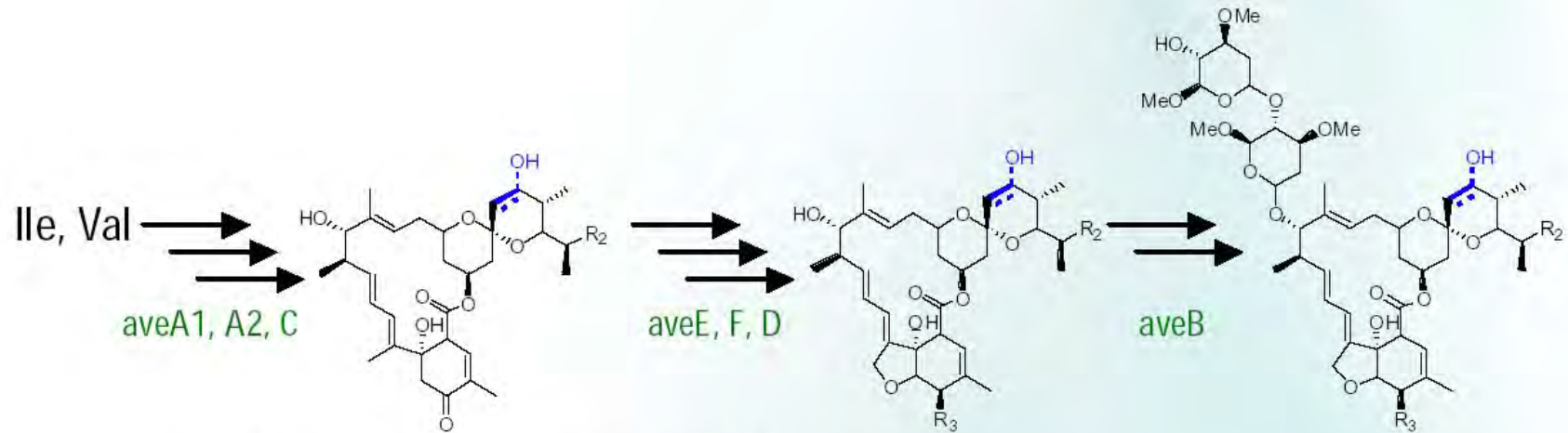
Клетки – создание «идеального биокатализатора»

- Более низкая себестоимость по сравнению с ферментами
- «Воспроизводимый» биокатализатор
- Отсутствует проблема регенерации кофакторов
- Дешевое исходное сырье

Клетки – создание «идеального биокатализатора»

- Культивирование при селективном давлении
- Белковая инженерия ферментов, участвующих в биосинтезе
- Genome fusion
- Metabolic engineering

Biochemical Pathway to Avermectins



Product 1 vs. 2
Nature of R_2 (a/b)

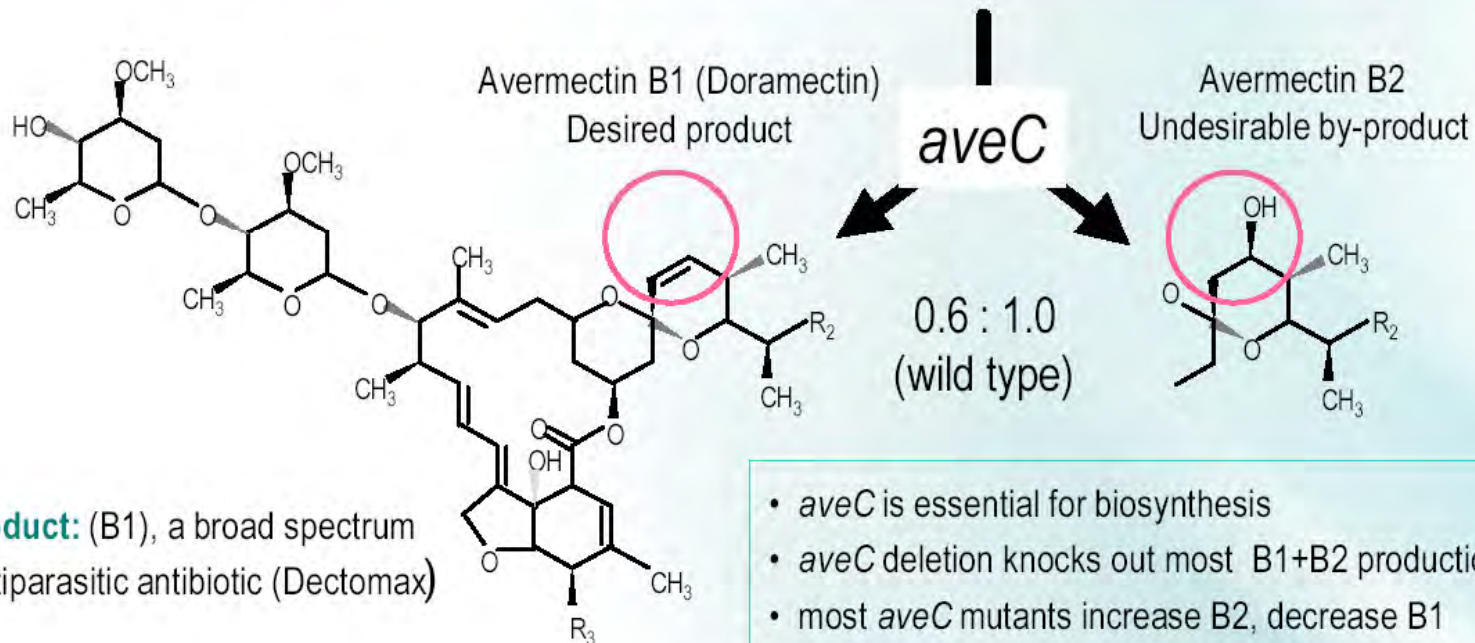
Nature of R_3 (A/B)

Avermectin B1 is the desired product
for commercial applications.

Doramectin Fermentation:

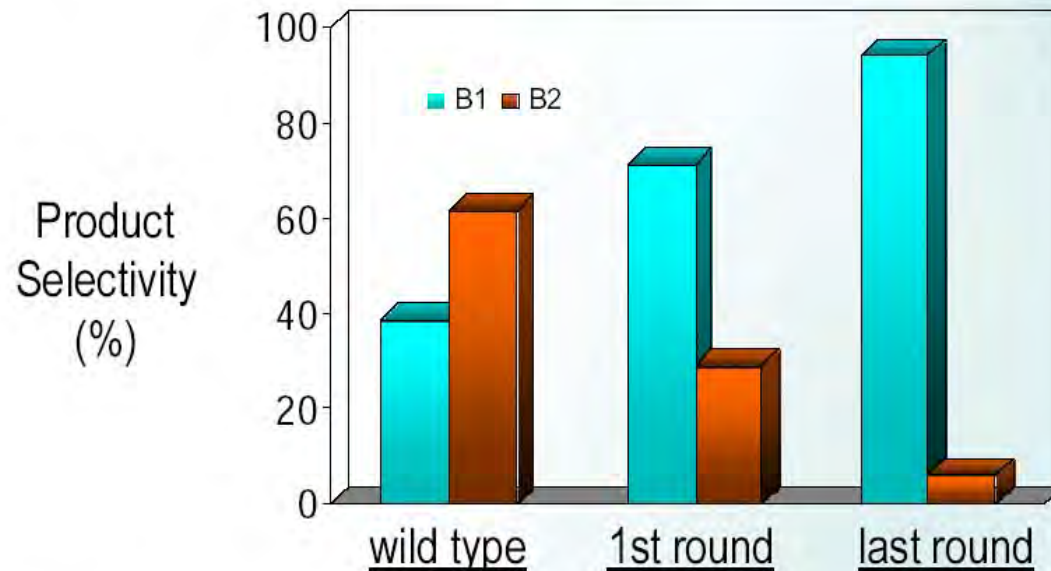


Mixture of Avermectins produced
by *Streptomyces avermitilis*



- *aveC* is essential for biosynthesis
- *aveC* deletion knocks out most B1+B2 production
- most *aveC* mutants increase B2, decrease B1
- function of *aveC* is UNKNOWN

Improved Doramectin Fermentation by Shuffling of a Biosynthetic Pathway Gene



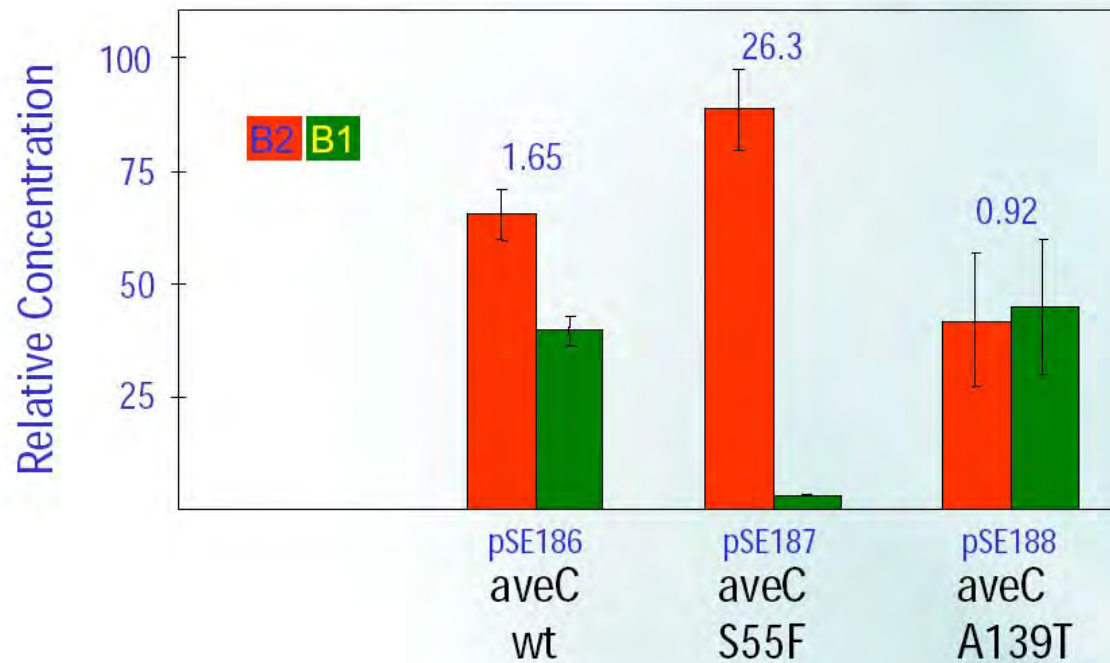
B1 : B2 Ratio: 0.6 : 1 2.5 : 1 >15 : 1

Commercial Status: *Original Process* *Commercialized* *In Development*

Rel. Yield vs. WT: 1 1.4 TBD

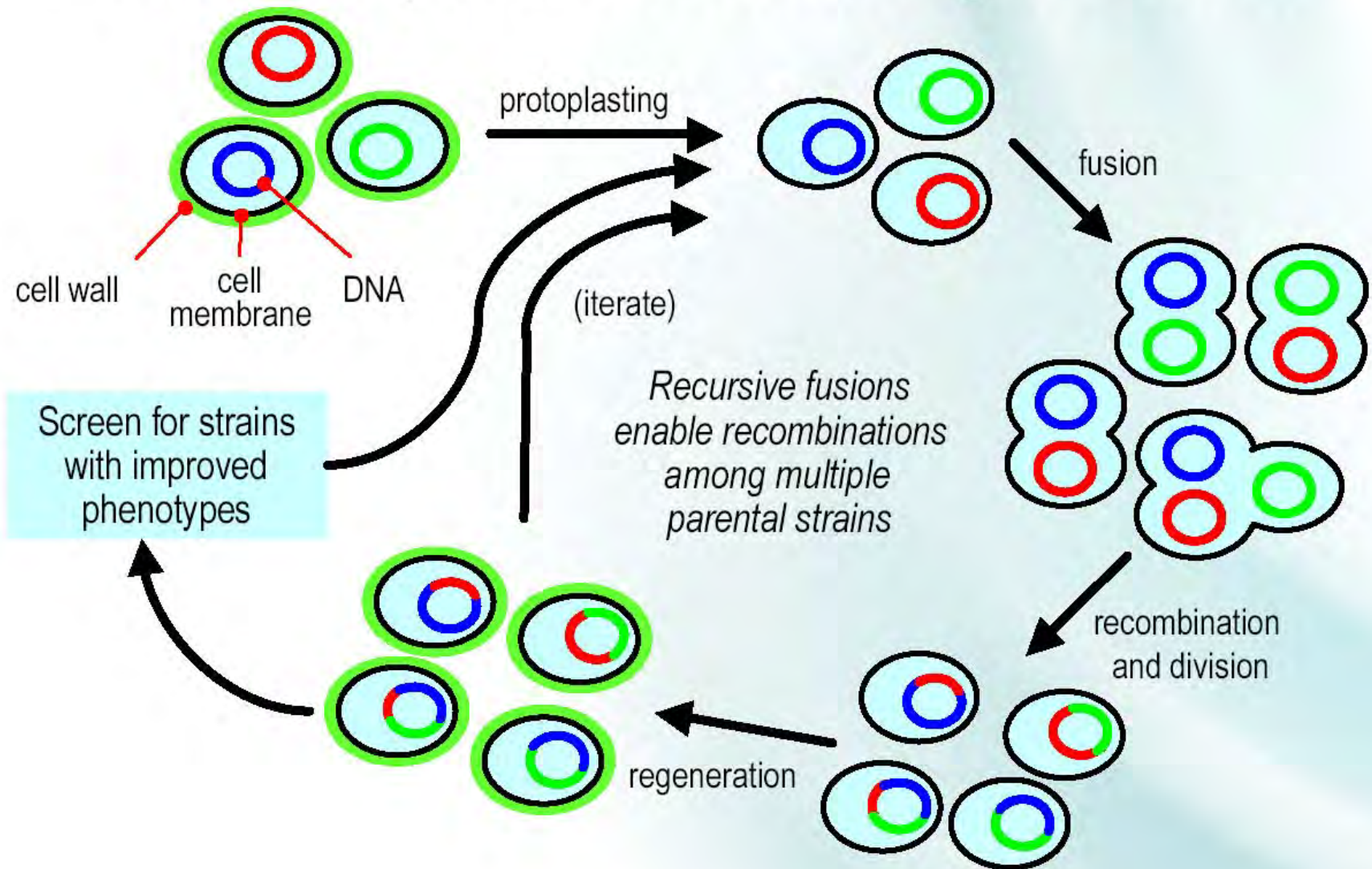
...leads to greatly simplified product isolation

Mutations in aveC can influence B1:B2 ratio

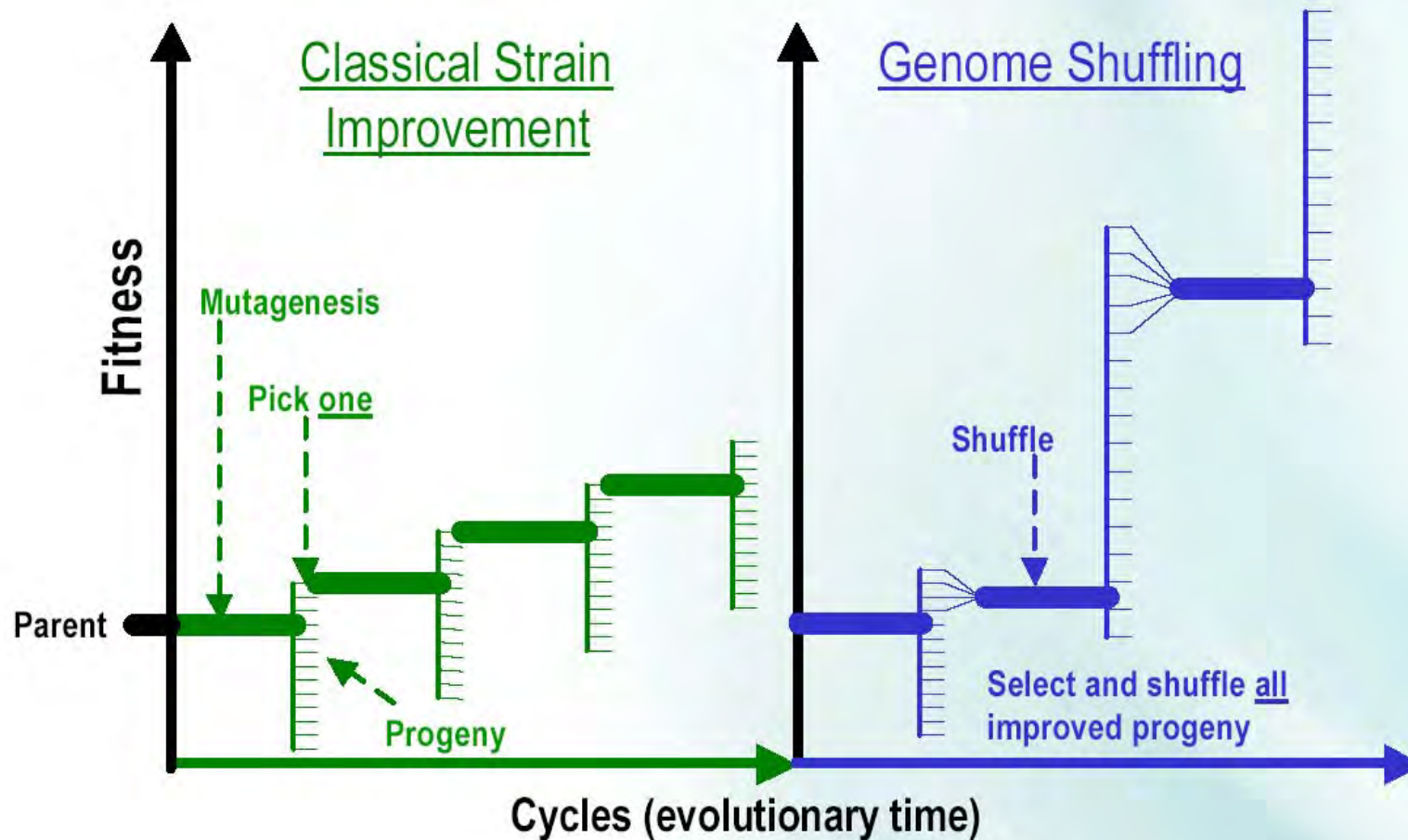


Stutzman-Engwall et al.,
Biotechnol. Bioeng. (2003) 82:359

Efficient Protoplast Fusion for Shuffling of Genomes






The Rationale behind Genome Shuffling



Rapid Improvement of Tylosin Titer by Genome Shuffling



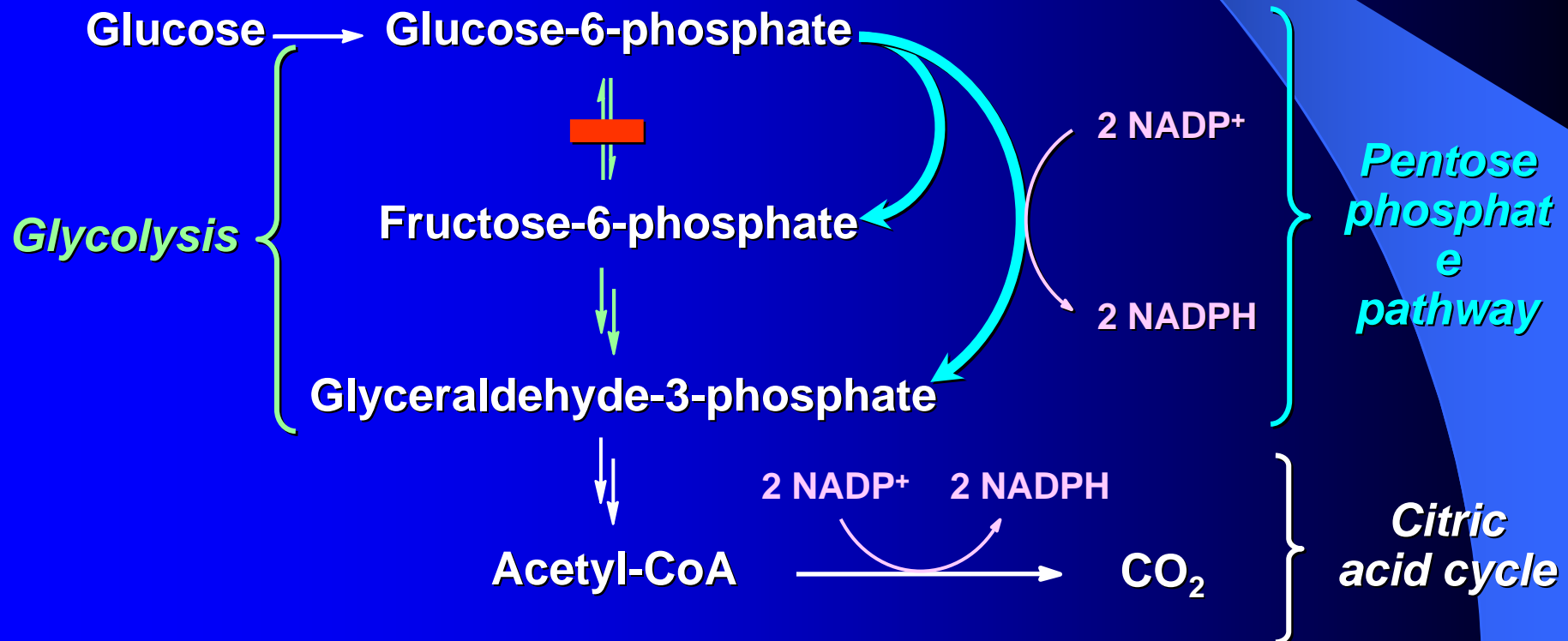
	Prod'n Strain	Original Strain	Classic Mutagenesis	1 st Round Genome Shuffle	2 nd Round Genome Shuffle
Rel. g/L	6.2 ± 2.4	1 ± 0.2			8.1 ± 1.2
Dev. Time	> 20 years		————— 1 year —————▶		
# screened	~10 ⁶		22,000	1,000	1,000
Colony Morphology					

Metabolic engineering

- Изменение существующих метаболитических путей
- Создание новых

Increasing NADPH Yield

- Under aerobic conditions, isocitrate dehydrogenase supplies 2.0 equivalents of NADPH per glucose molecule.
- Additional NADPH (2.0 equivalents per glucose molecule) might be obtained by increasing flux through the pentose phosphate pathway.



Обеспечение дополнительной энергии клеток с помощью формиатдегидрогеназы

- Формиат-ион – ингибитор роста клеток – может использоваться как селективный маркер для сохранения только клеток с плазмидами
- Формиат-ион – дешевый субстрат
- Формиат-ион – легко проникает в клетку с помощью пассивного транспорта
- Одна молекула формиата обеспечивает получение одной молекулы NAD(P)H – 3 молекулы АТФ
- Продукт окисления формиата – CO_2 – не загрязняет целевой продукт и легко удаляется из среды

Выход биомассы клеток *E.coli* при культивировании на формиате

Штамм <i>E.coli</i>	Формиат, 4 x 0,03 M (2 г/л)	Выход биомассы, г/л
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	-	30
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	+	<0,5
<i>E.coli</i> BL21(DE3)/pFDH8	-	38
<i>E.coli</i> BL21(DE3)/pFDH8	+	55

**СПАСИБО
ЗА
ВНИМАНИЕ!!!**