

# 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 !!!

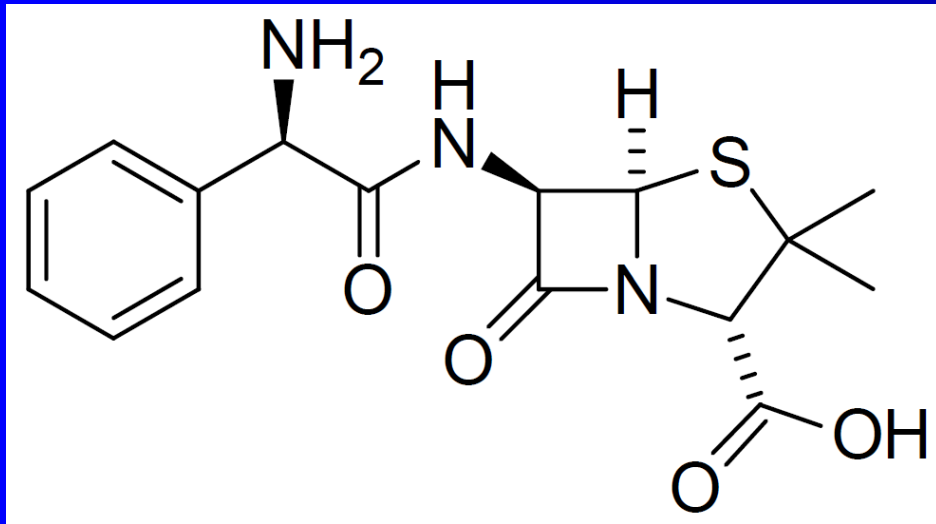


# **ФЕРМЕНТЫ. НЕДОСТАТКИ**

- 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**

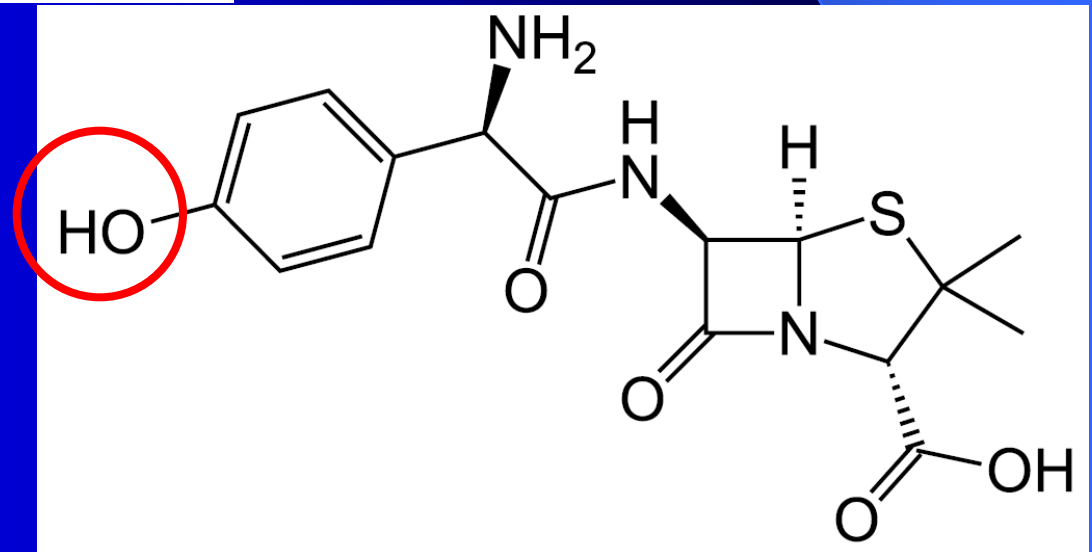
# Субстратная специфичность ферментов.

## Пенициллинацилаза *E.coli*



ампициллин

амоксициллин



**Что делать???!!!!**

**Что делать????!!!**

**Создавать новые  
биокатализаторы с  
нужными свойствами**

# The Ideal Biocatalyst - a new paradigm

Conventional design

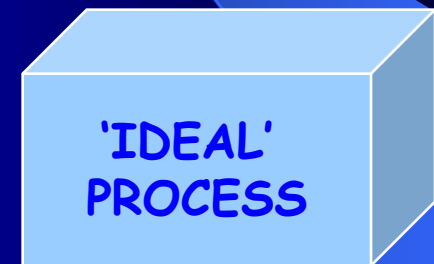
NON-IDEAL CATALYST



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	<b>10.0</b>	6.3
Относительная термостабильность	<b>200</b>	1
Предпочтение NAD <sup>+</sup> /NADP <sup>+</sup>	<b>2 300</b>	300 000
Устойчивость к органическим растворителям	<b>очень высокая</b>	<b>низкая</b>
Устойчивость к протеазам	<b>очень высокая</b>	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

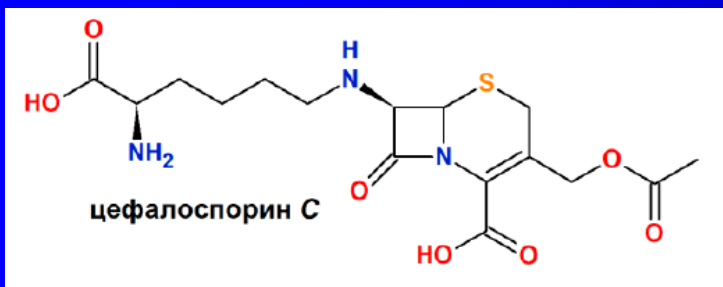
- **Genome screening**

- поиск на основе известных последовательностей в геноме отдельно выделенных организмов

- **Metagenome screening**

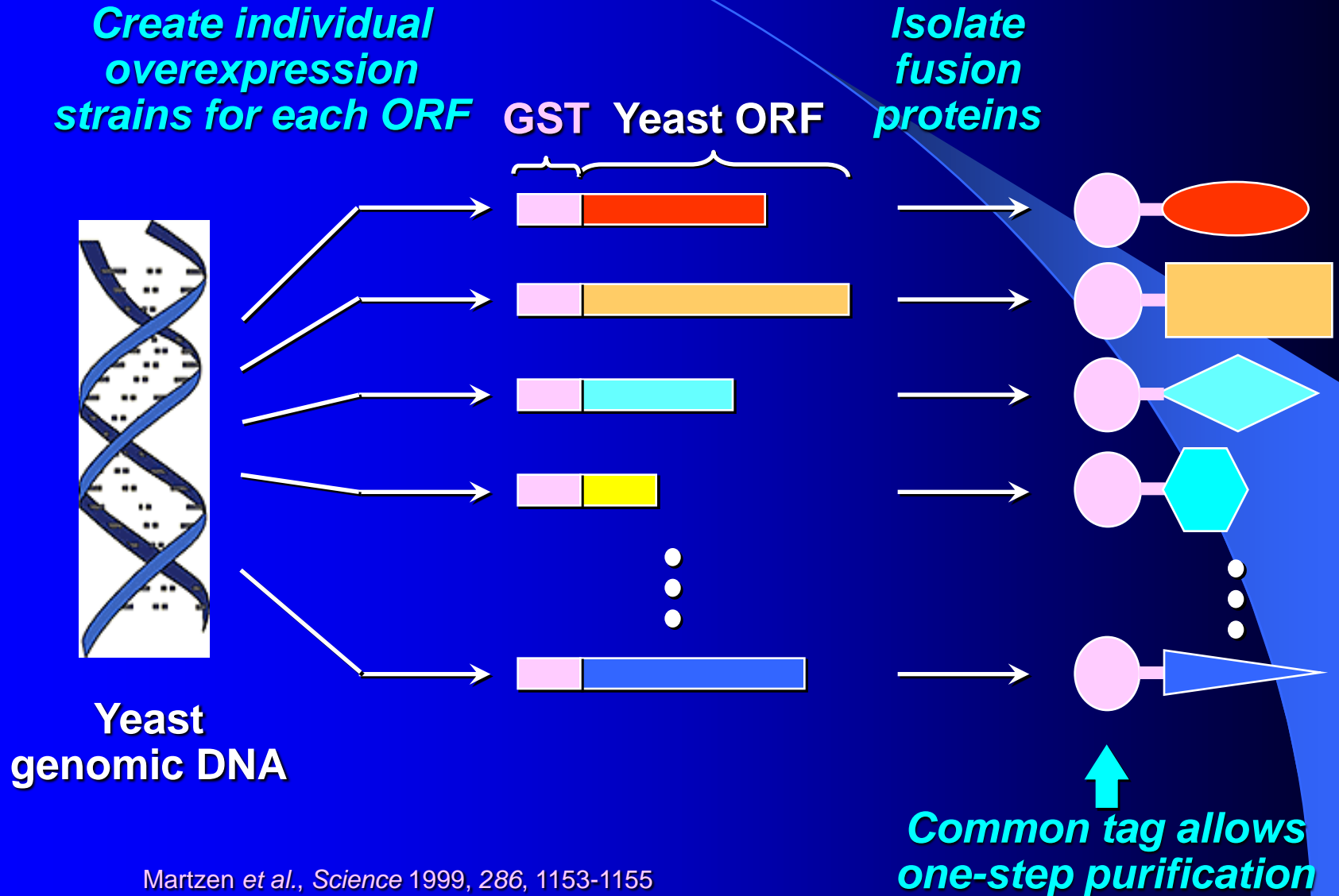
- решается проблема некультивируемых микроорганизмов

# Анализ последовательностей в банках данных



<i>T. variabilis</i>	INQRSHVLKRDLPK-LEGAMS-AICQRNPWFKN TVDSFEI
<i>N. crassa</i>	QKAVLYRRAQDEAAGFAGPLSDGLFVRNPWYKDLVP--DY
<i>F. solani</i>	QKSRIQRRNVDTEKAQRSGFDPALFSKEPWFKNMFE--DF
<i>S. pombe</i>	ADLRELWEYEPKHD-----KIRSWNTYVRDF
	$\xrightarrow{\beta 6B}$ $\xleftarrow{\alpha 4}$
<i>R. gracilis</i>	KGTRRFAQNE DGLLGHW-----YKDITP--NY
<i>C. boidinii</i>	KPSTEYWDFY PGDE-----KVNSLKQYLKDFK
<i>D. discoideum</i>	KKVNEIFRRP HPED-----PEWKPYIKSFRR
<i>S. coelicolor</i>	LEGV-LGETGL DEVDG-----WAAARLPGLR
<i>H. sapiens</i> DASPO	VSGWQIFQSTP TEEV-----PFWADVVLGFRK
<i>A. protothormiae</i>	RRGLNVDHLP GADRS-----WTRIVAGTEE
<i>M. musculus</i>	VSGWQIFRSVP AEEV-----PFWADVVLGFRK
<i>D. melanogaster</i>	LSGYIYSRTSP SIVRN-----HFIEKLLPVYRR
	$\xrightarrow{\beta 3B}$ $\xleftarrow{\alpha 5}$ $\xleftarrow{\beta 1B}$
<i>H. sapiens</i>	ISGYNLFHEA IPD-----PSWKDTV LGFRK
<i>D. rerio</i>	QSGYNLCAETA AD-----PSFKDTV LGFRQ
	$\xrightarrow{\beta 2B}$
Pig kidney	VSGYNLFREAV PD-----PYWKDMVLGFRK
<i>O. cuniculus</i>	ISGYNLF RKAVPD-----PSWKDTV LGFRK
<i>C. elegans</i>	VSGHIQSDNLE SLKQQQ-----RAYGDIVYNFRF
<i>R. norvegicus</i>	ISGYNLF RDEV PD-----PFWKSTV LGFRK
<i>M. leprae</i>	APAVTVGDLP GANANG-----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

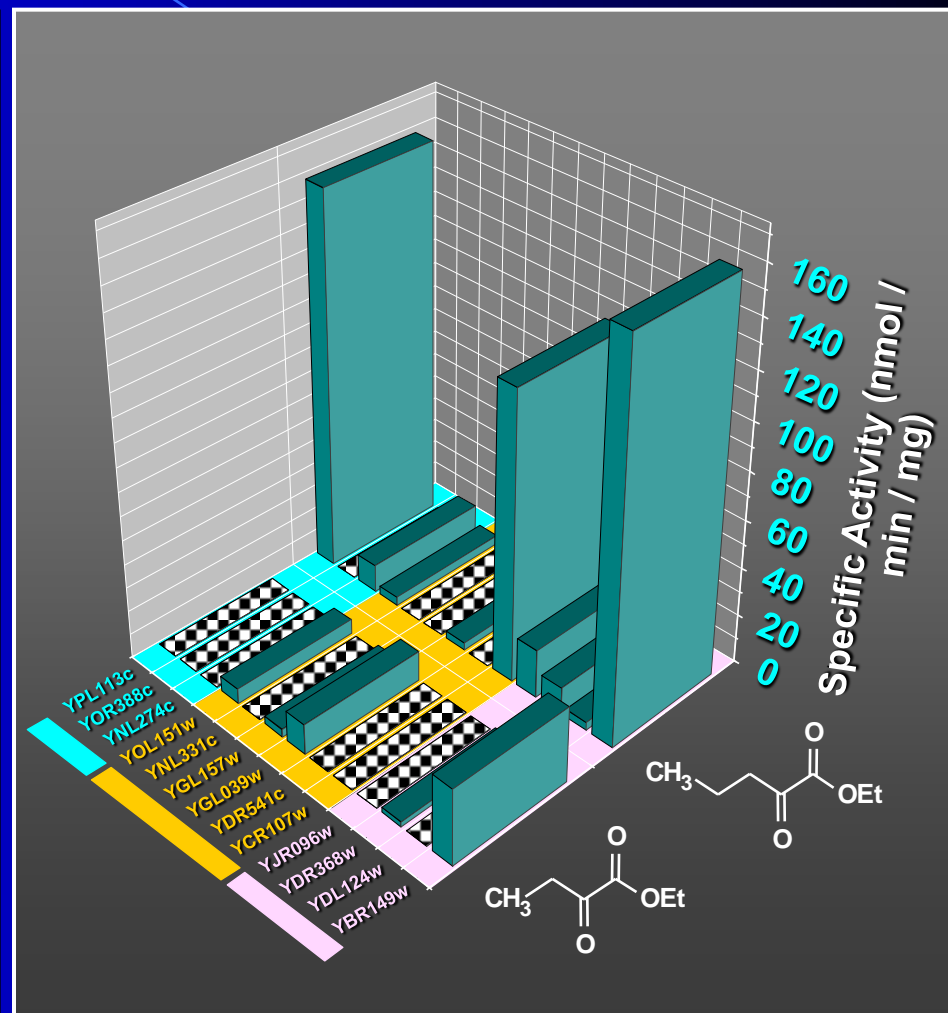
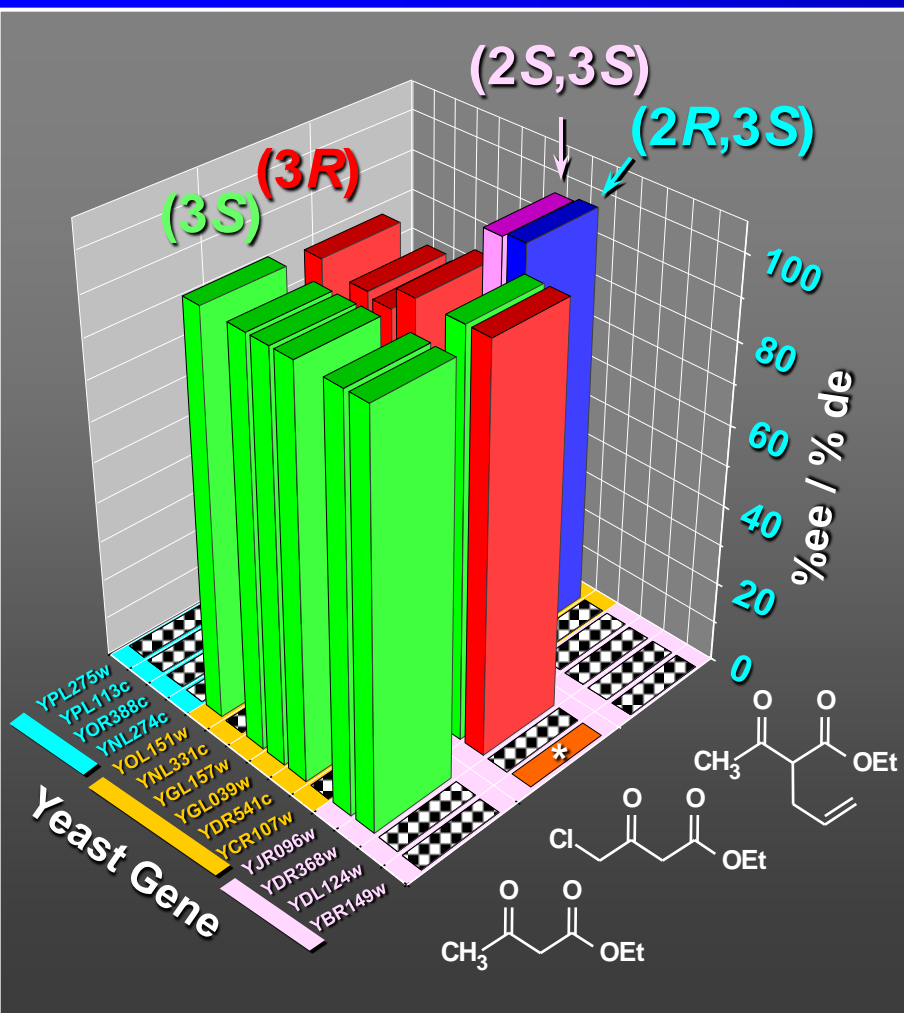
## Medium-Chain Dehydrogenases

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 $\beta$ -лактамных антибиотиков

## Гидролаза эфиров $\alpha$ -D-аимнокислот (АЕН)

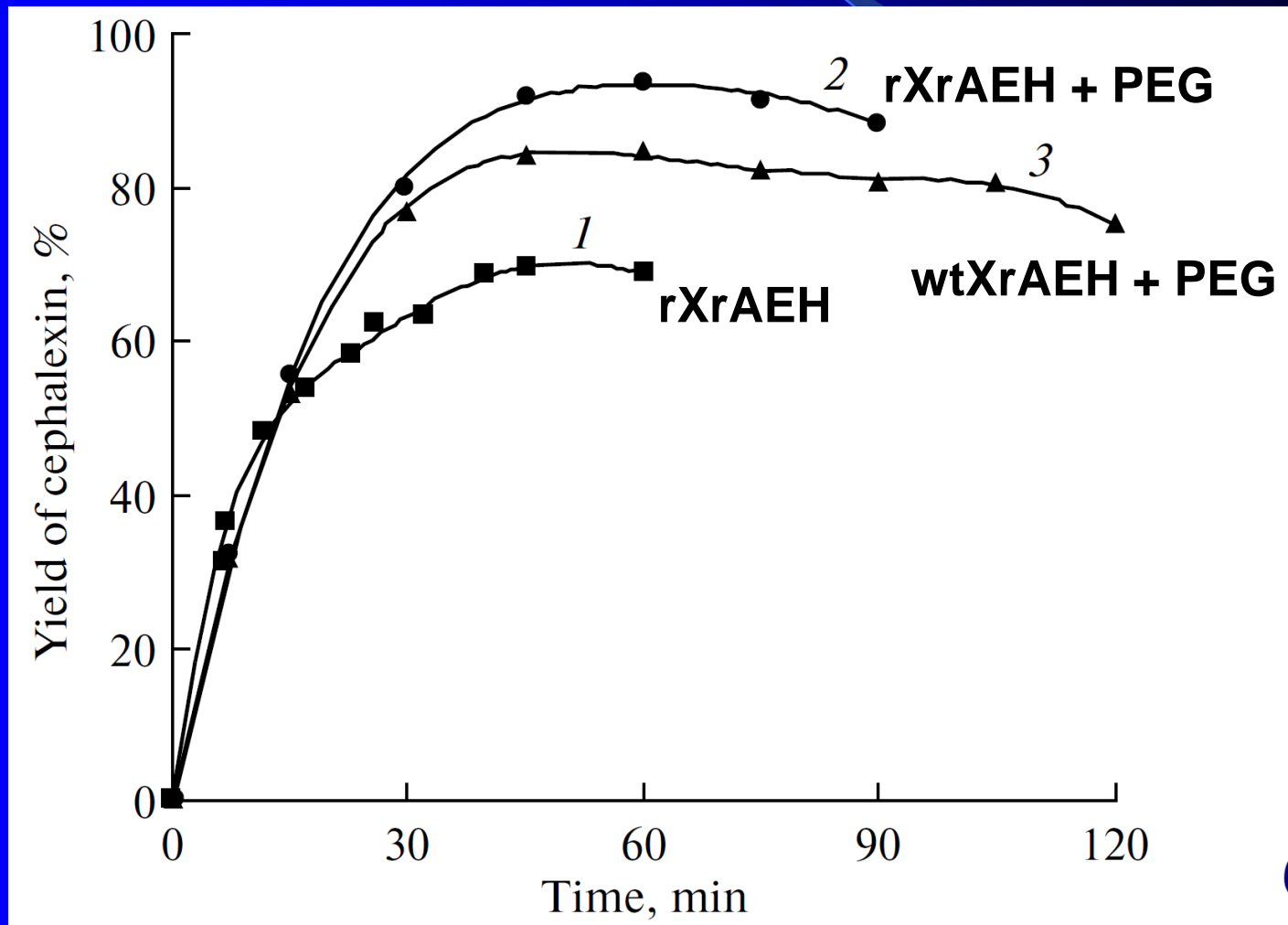
При сотрудничестве с лабораторией проф. С.В. Яроцкого





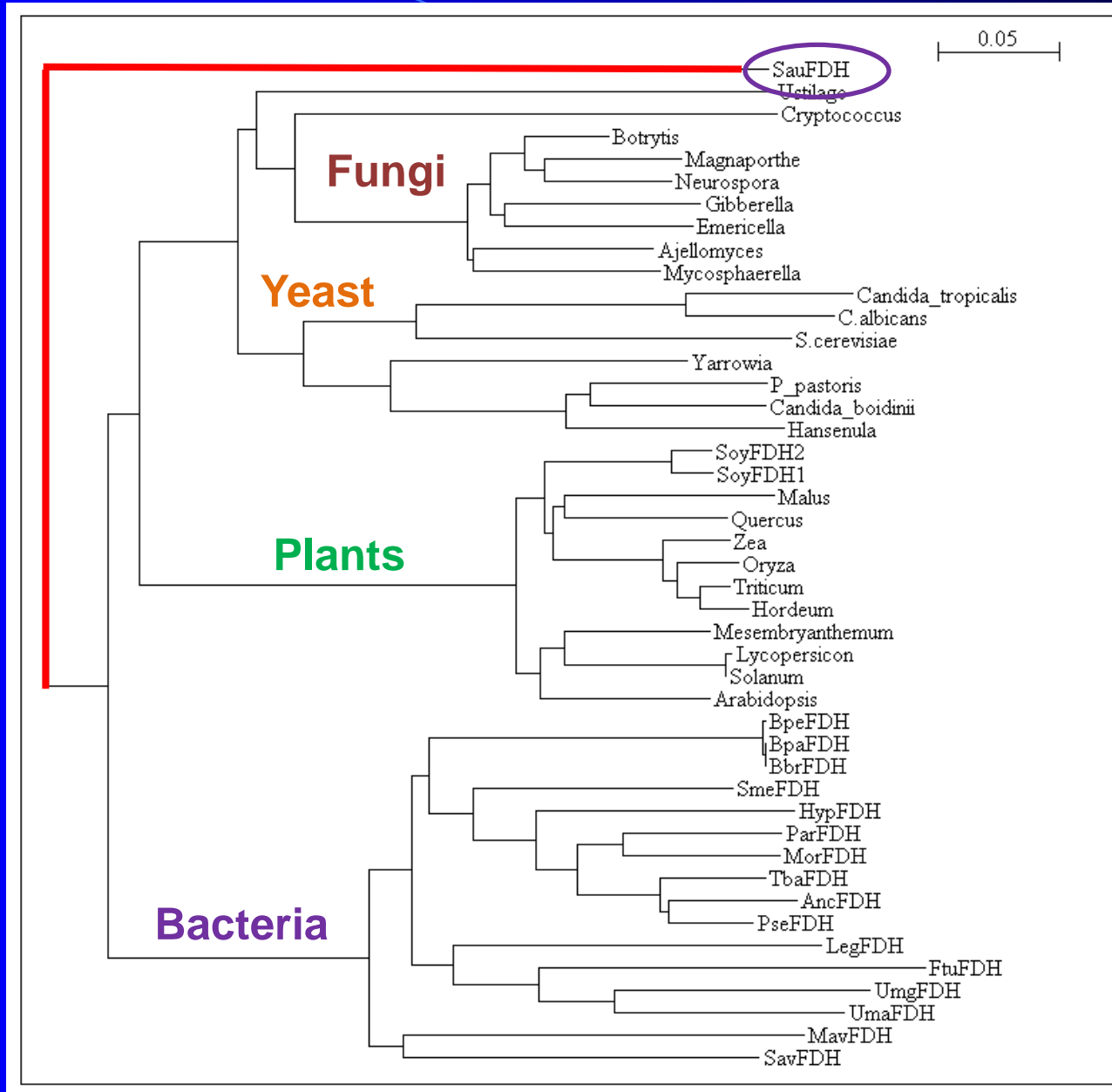


# Comparison of yields in cephalalexin synthesis with wild-type and recombinant XrAEH

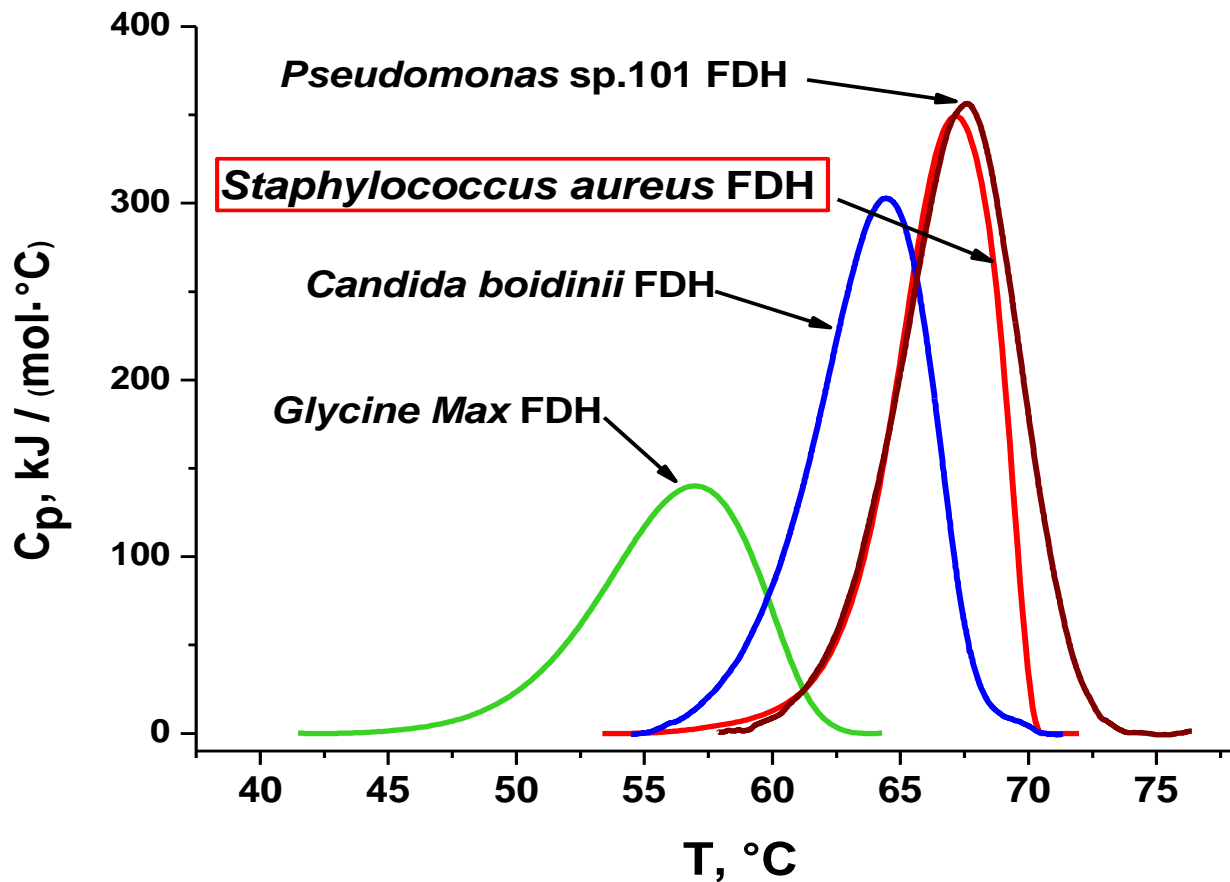




# ФДГ из *Staphylococcus aureus*



# Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) различных формиатдегидрогеназ



Enzyme	$T_{\text{max}}$
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)



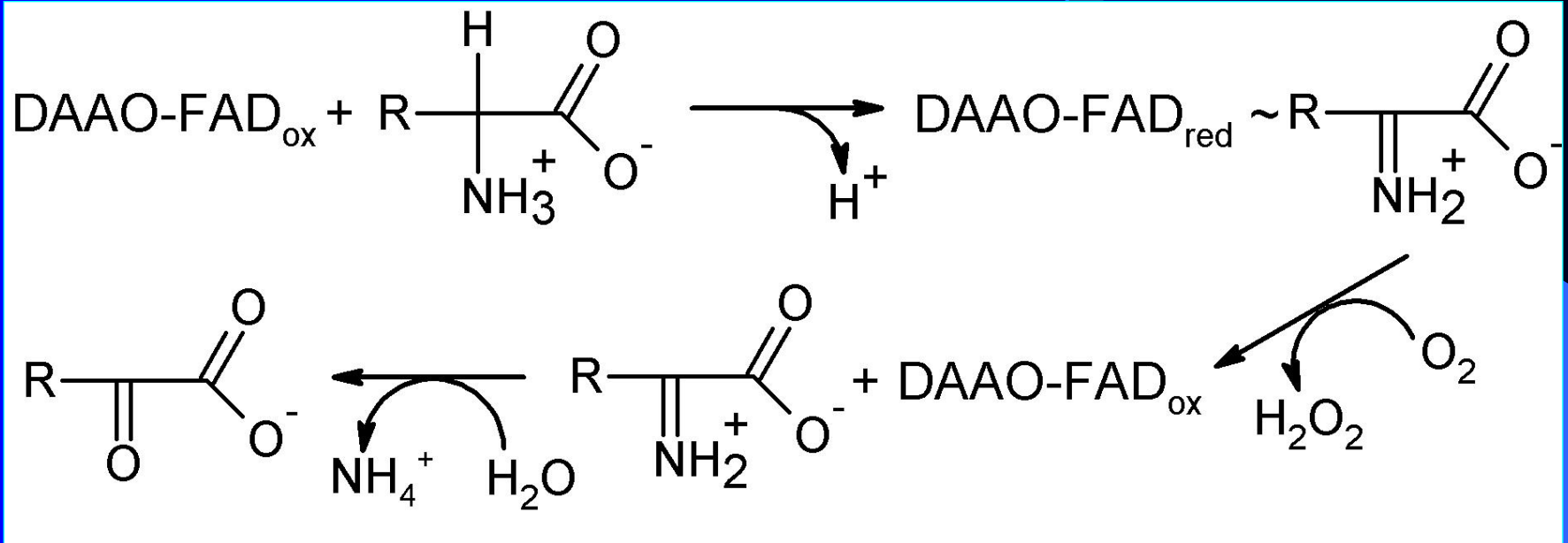
# Kinetic properties of formate dehydrogenases from different sources

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)

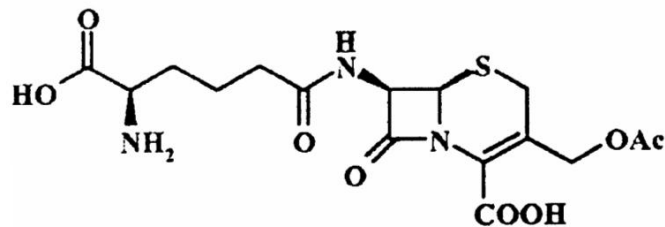
catalyses oxidative deamination of D-amino acids yielding the corresponding  $\alpha$ -keto acids



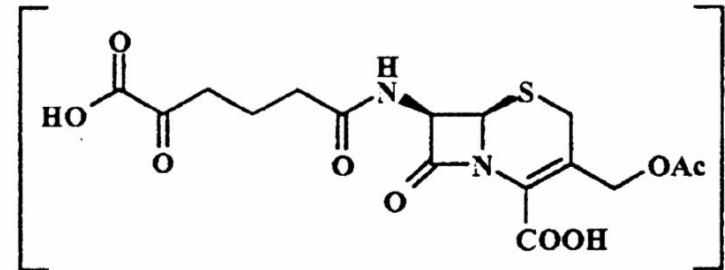
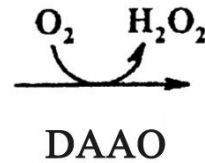
the enzyme consists of two identical subunits  
and contains one FAD molecule per subunit



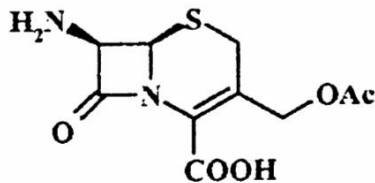
# Preparation of 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) from cephalosporin C



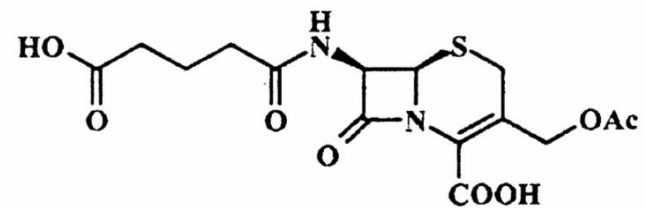
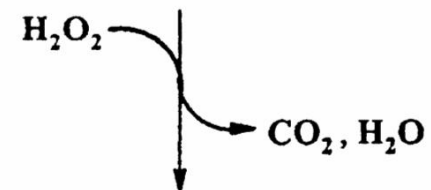
cephalosporin C



$\alpha$ -ketoadipyl-7-ACA



7-ACA



glutaryl-7-ACA



# 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 - - - TFAIVGCGIVGLY TALNLV-ESGVKGS EITIVA EYLPG-DQS-INY TSPWAGGNFSCIS--PDDA QTL
OpaDAAO2 M - - AKIIVIGCGVVGMTTAL E LA-QRGN - - VQIVARHLPG-DVD-VEY TSPFAGANWSSFA-QDGD YEMK
OpaDAAO3 M - - KERIVVIGAGVIGLTTAL ELS-RRGYL - - VSIVAKELPG-DEA-RFY TSPYAGAFFYHLD SLASKGWL A
OpaDAAO4 M - - - KIVVVGAGVIGLTTAL ILKRKLNCD - - VVVVSKEIPG-DAD-PIY TSTKAGA QWSS - - - SPGNKRA
OpaDAAO5 M - - SDTYVVVGAGIVGLY TAYSLVYEAGVSPKHITIAAAHIPG-DQS-INY TSPWAGGNFSCIS--PGDK KSL
OpaDASPO M - - TKSIVVVGAGVVG L TCA YQLA-EEGYD - - VTIVAKHLPSTSIADSQY TSPWAGAHFRP FPAKTPEEYRD
RgDAAO MHSQKR VVVLGSGVIGLSSALILA-RKGY S - - VHILARDLPE-DVSSQTFAS PWAGANWTP FMTLTDGPRQA
TvDAAO M - - AKIVVIGAGVAGLTTALQLL-RKGHE - - VTIVSEFTPG-DLS-IGY TSPWAGANWLT FY - - DGGKLA
CbDAAO M - - GDQIVVVGSGIIGLY TTYCL IYEAGCAPAKITIVA EFLPG-DQS-TLY TSPWAGGNFSCIS--PADDTTL
ChDAAO MPPSDPIIVL GAGVIGLTTAVRL - - EAHLGANVHILADHWPS-DALDAQYASTIAGAHHLSFA-DDGDARQR
    
```

```

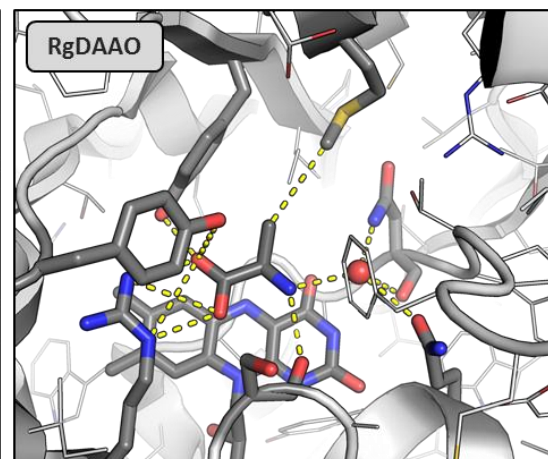
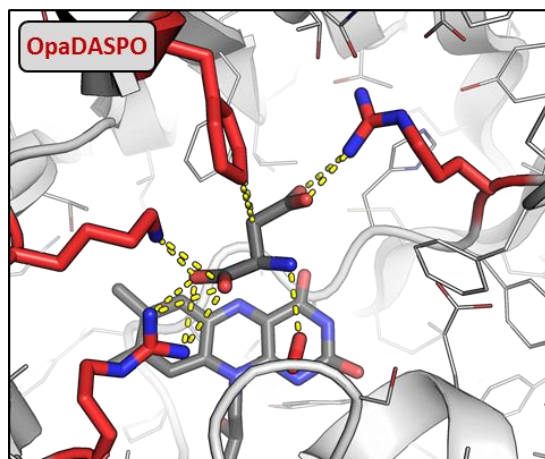
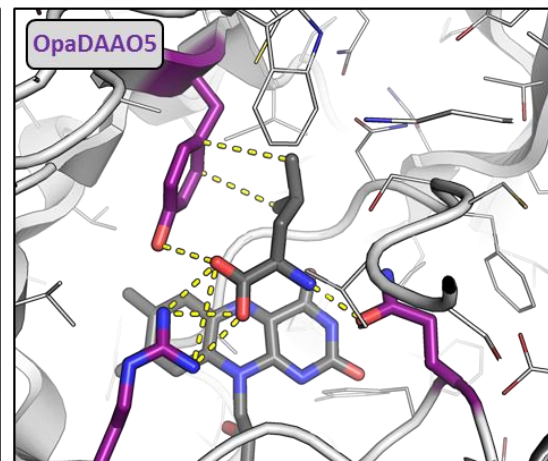
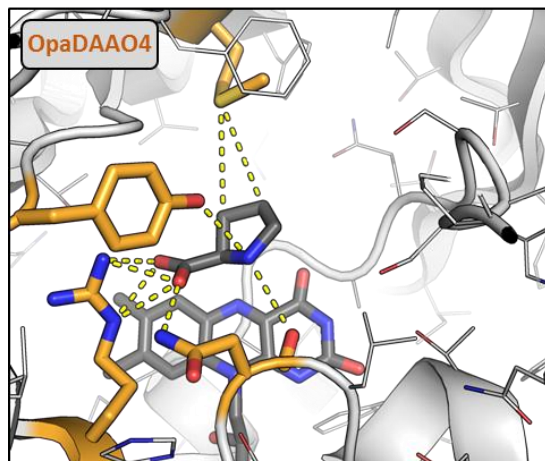
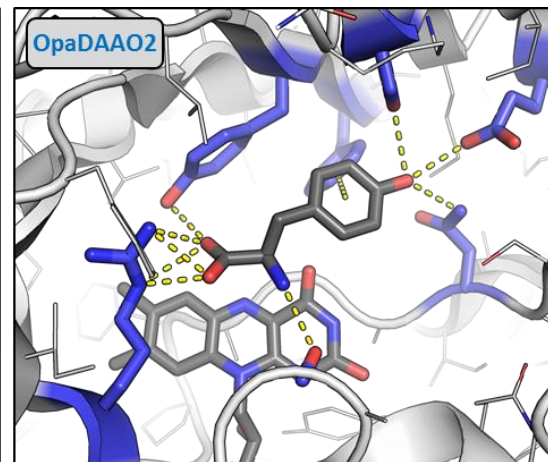
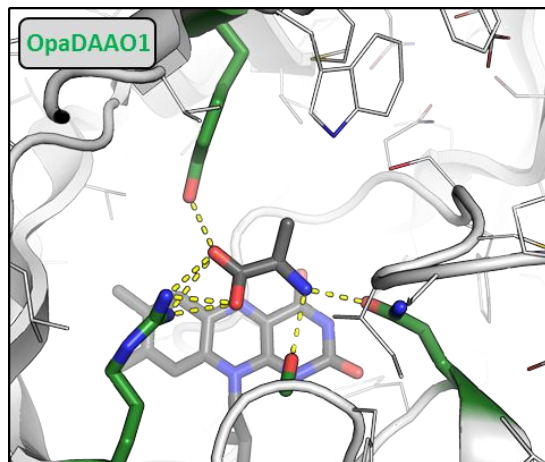
OpaDAAO1 NF-DKTTYTHLAAIQKLLG-PGCGLDRR PSTEFWDYLPDQR - - - - - KIDSLSSYLQDFAI I - - PSSQLPQ
OpaDAAO2 EW-DKLGYYRFMDLAENVP - - GSSVVRRTERILNSK - - - - - RLPWFKDFVQDFRLL - - SKEELPD
OpaDAAO3 QLQDIASYYEFLRVAQ - - EPGSGVAERVAEVYVPRISM METGY - - - - - DGPWFKDVVRNYEVI - - DPREYPA
OpaDAAO4 EF - - - SYRIFDEL SK-VPEAWVTKIPLYKGEIDPKRPA - - - - - TEPDLKSFVDNYEWI GEDQQKFPG
OpaDAAO5 SY-DRYTYTHLAEIQKLLGGPSCGLDMR PATDYFHKYP PAK - - - - - KMESLKEYVKDFRIL - - DKSALPK
OpaDASPO SKLTRSTFQVFKKLATTTFP ESSIRFMPGTD FIERDDPLYEN - - - - - VSAGYAEG IENFKVL - - PKSALPN
RgDAAO KW-EESTFKK WVELVPTGHAMWLKGTRRFAQNE DGL - - - - - LGHWYKDITPNYRPL - - PSSECP P
TvDAAO DY-DAVSYPILRELARSSPEAGIRLISQRSHVLKRDLPKLEVAMSAICQRNPWFKNTVDSFEI IEDRSRIVHD
CbDAAO AY-DKFTYLNLFKIHKKLGGPECGLDNKPSTEYWDFYPGDE - - - - - KVNSLKQYLKDFKVI - - PKSELPE
ChDAAO RW-DMRTFDVLYDEWKAVGE - RTGLMALTQTEMWEGAT - - - - - SHLAVYEGNPDFRVL - - DPRTAPC
    
```

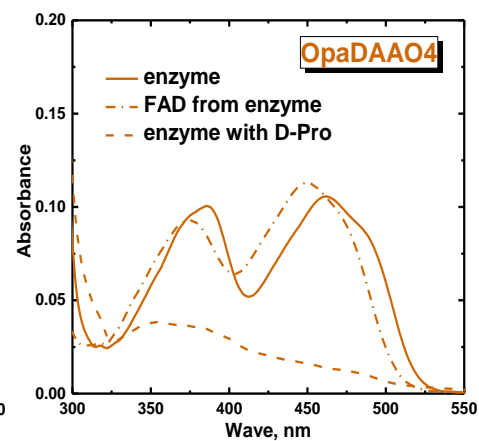
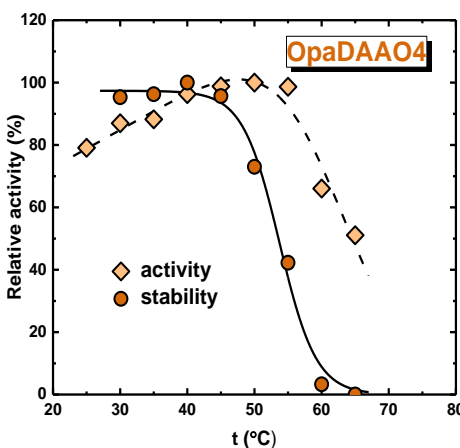
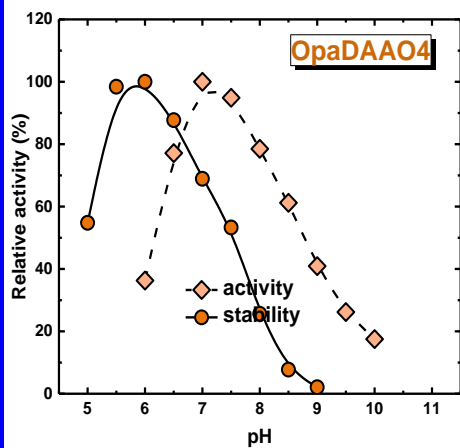
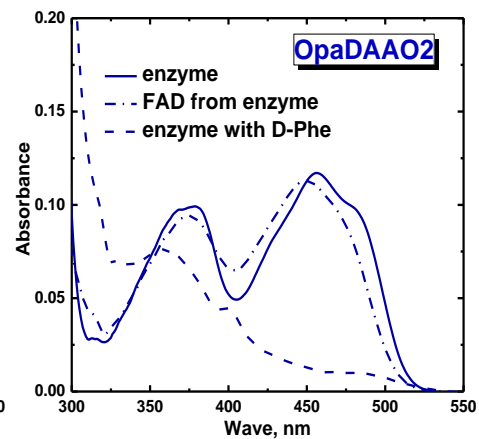
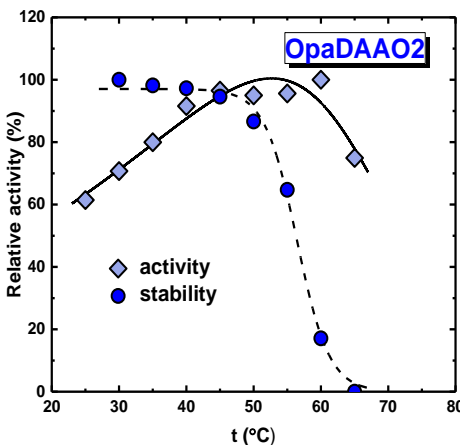
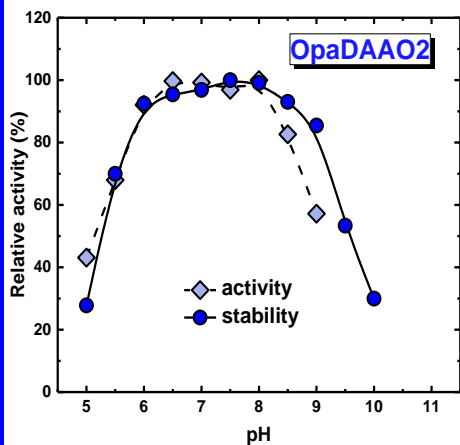
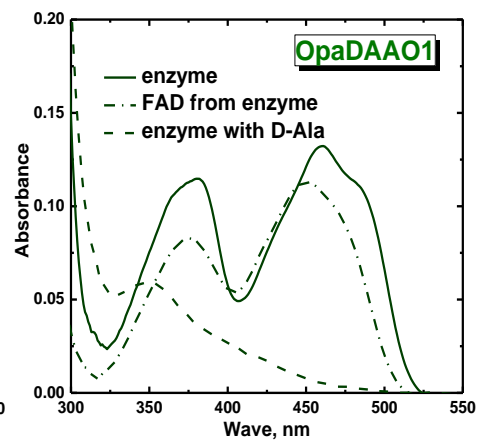
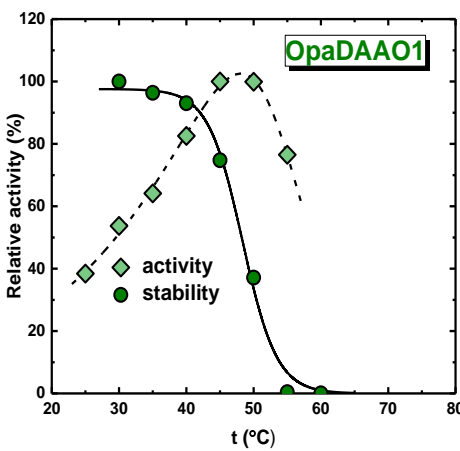
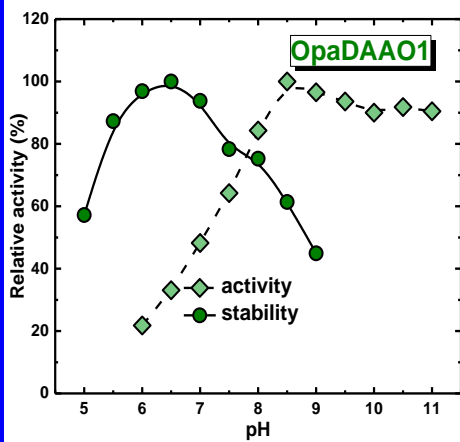
```

OpaDAAO1 GVA - - - FGIKYISWNFNC - - PKFLEV LKEYL - ASTGIVFVR RKIQNV - - - - - DEMFEF - - - - - ARTIFNC
OpaDAAO2 GVE - - - YGHEYTTVAITV - - PIYLHYLLQKL - LSLGVKLHRAHLHHI - - - - - KDAASY - - - - - FTDGKVDVTVNC
OpaDAAO3 GAAGDDIVFAFRYTGFTINPVQYLHYLLYRC-AQSGIN YVRRTVGSL - - - - - EEAKTLFLDGDDFVEADLVVNC
OpaDAAO4 - - - - - VSHIYKFDFTTISP PQYLAYLANEL - LKLGVAIQRGVVRNF - - - - - EDVA - - - - - ADYVIN C
OpaDAAO5 GIV - - - FGISYTTWNFNC - - PLFLQN LASFL - EKLGVTIKKKLEHL - - - - - SQAFLS - - - - - PNTKIVFNC
OpaDASPO GIK - - - FGATYNAWCMNS - - PMYIQFLERRLEMYYKVKIVQESLGS L - - - - - QQVAEL - - - - - FPGATIVNC
RgDAAO GA - - - IGVTYD T LSVHA - - PKYCQYLAREL - QKLGATFERRTVTS L - - - - - EQAFDG - - - - - ADLVVNA
TvDAAO DVA - - - YLVEFRSVC IHT - - GVYLNW LMSQC - LSLGATVVKRRVNH I - - - - - KDANLL - - - - - HSSGSRPDVIVNC
CbDAAO GVE - - - YGISYTTWNFNC - - PVFLQNMANFL - NKRNVTIIRKHLTHI - - - - - SQAYLT - - - - - VNTKVV FNC
ChDAAO SN - - - - ITHMVSFTSLTIAPT VYLAAL E ARV - RDLGAKLHRAHVPSL GALRTDPALL - - - - - ALYTRPPAAV FVC
    
```

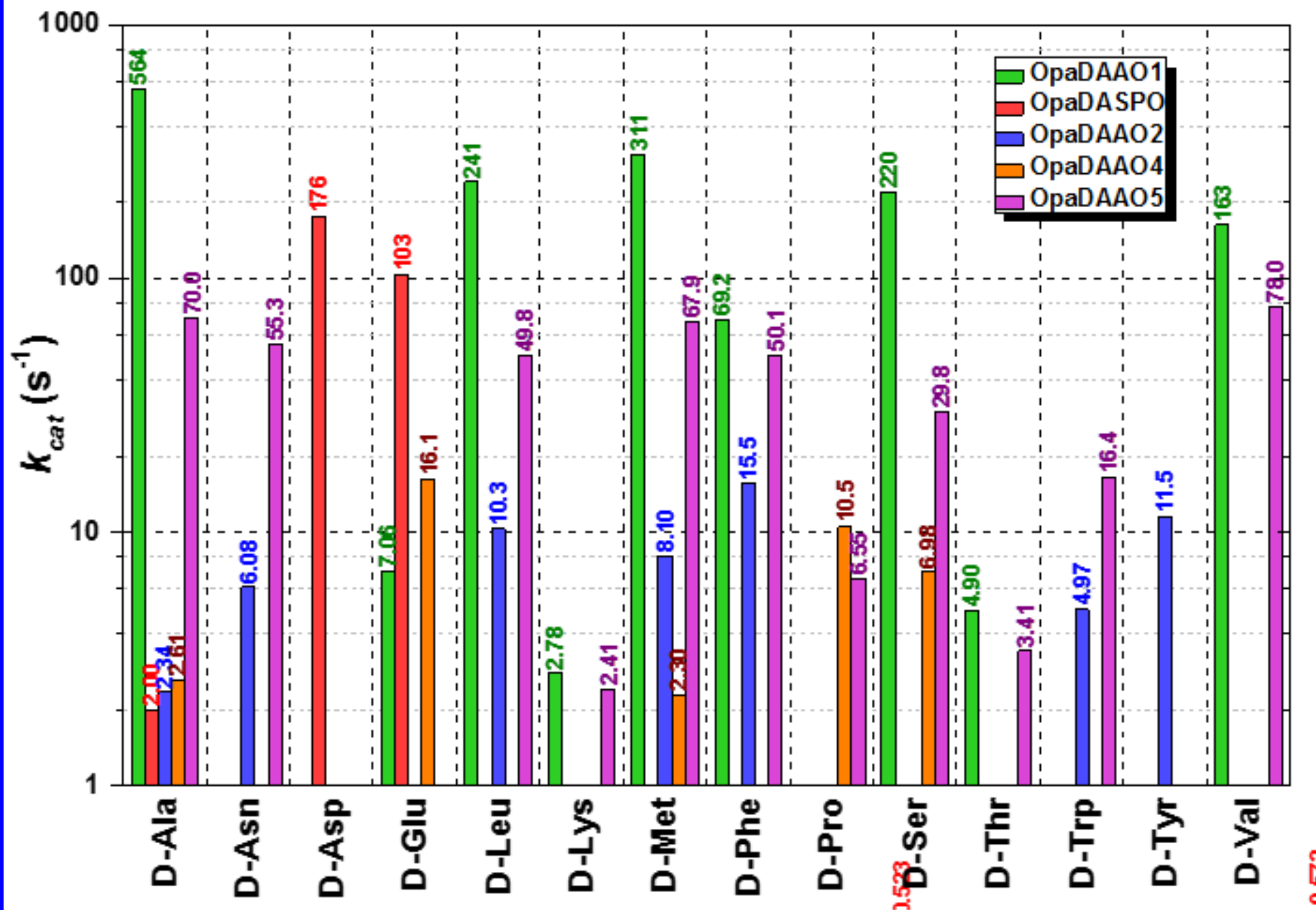




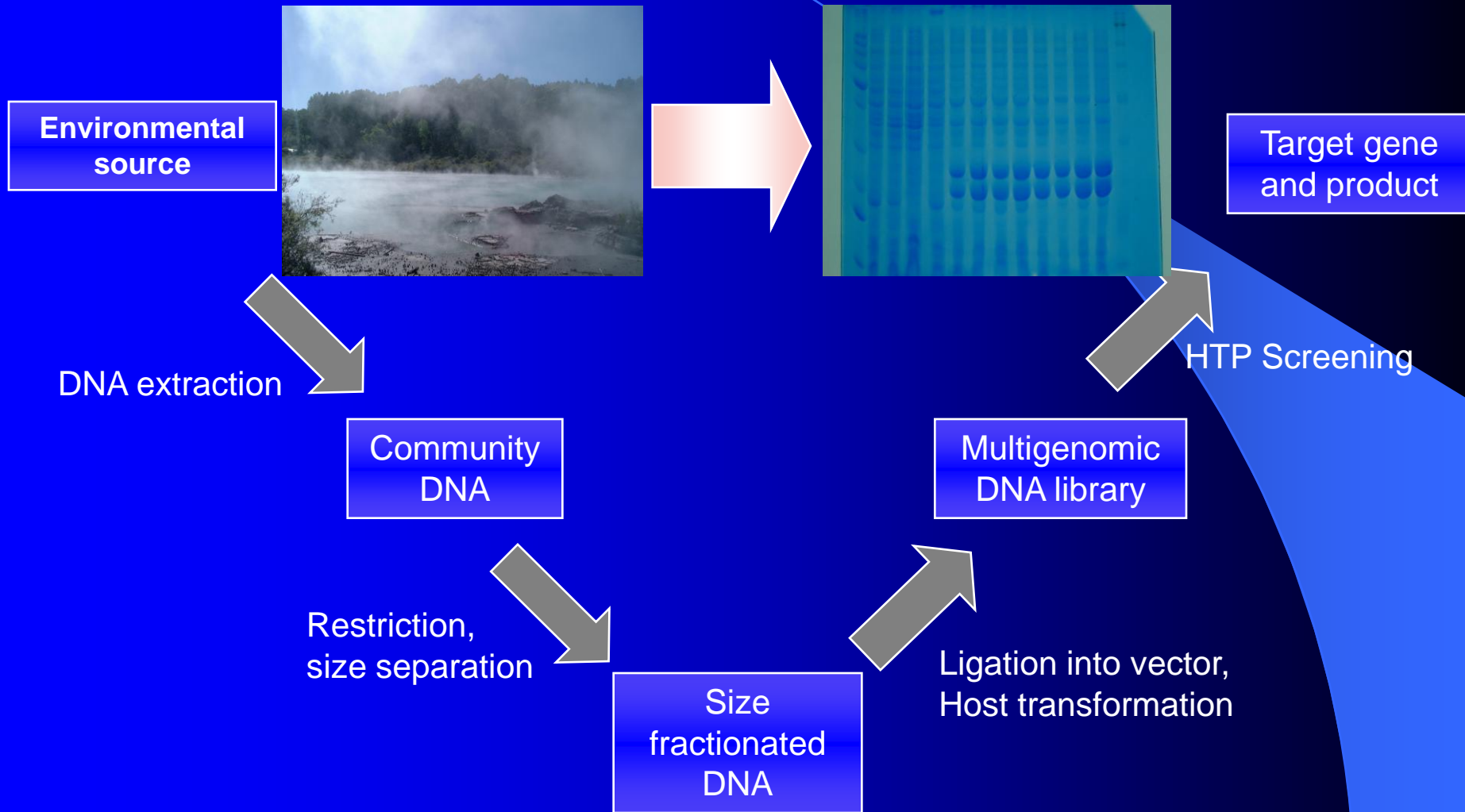




# Activity of new OpaDAAOs with D-amino acids



# Metagenome screening



# FROM WHERE WILL MANY OF THE NEW APPLICATIONS COME?

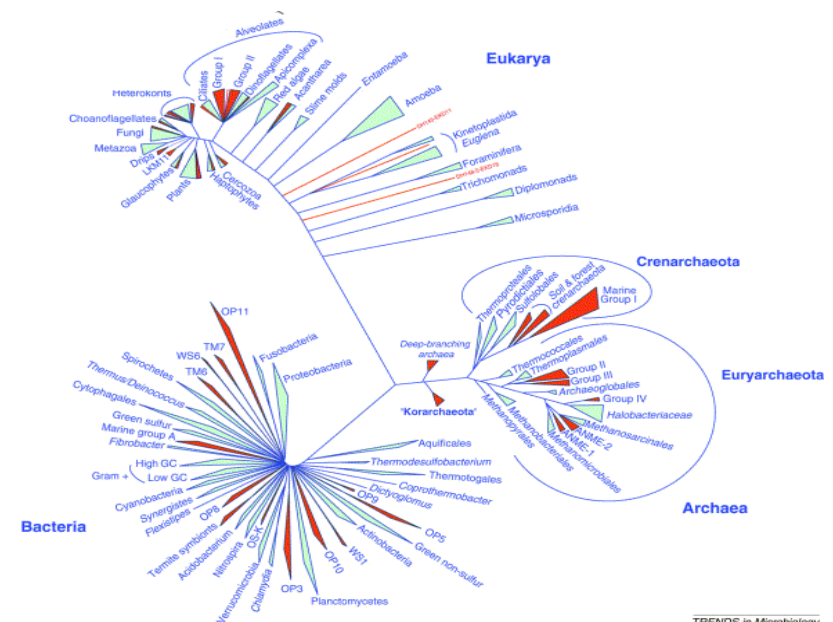
## - Biodiversity

## 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)	$3.5 \times 10^4$	>90
Arthropods/invertebrates	$10^6 - 10^7$	10
Nematodes	$5 \times 10^5$	3
Higher plants	$2.7 \times 10^5$	>90
Algae <sup>a</sup>	$10^4 - 10^5$	[70]
Bryophytes	$2.5 \times 10^4$	70
Fungi <sup>a</sup>	$1.5 \times 10^6$	[5]
Bacteria <sup>a</sup>	$10^4 - 10^5$	[1-10%]
Archaea <sup>a</sup>	$10^5 - 10^6$	[0.1-1%]
Viruses <sup>a</sup>	$10^5 - 10^6$	[4]

<sup>a</sup>These 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

Consiglio Nazionale delle Ricerche  
Istituto Sperimentale Talassografico



Misha Yakimov-cruiser



Peter Golyshin-genomicist



Olga Golyshina-genomicist



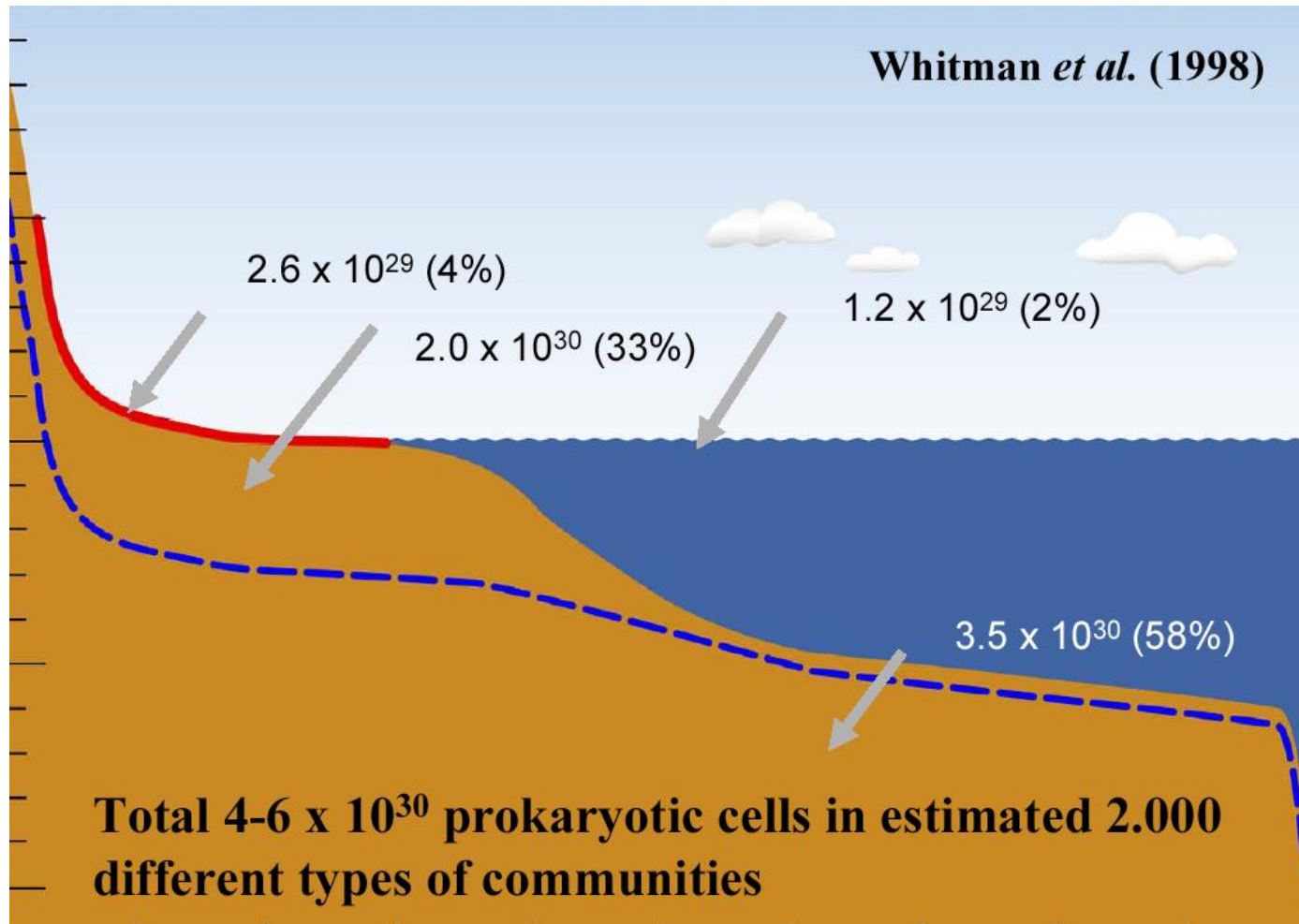
Kenneth Timmis-environmentalist...



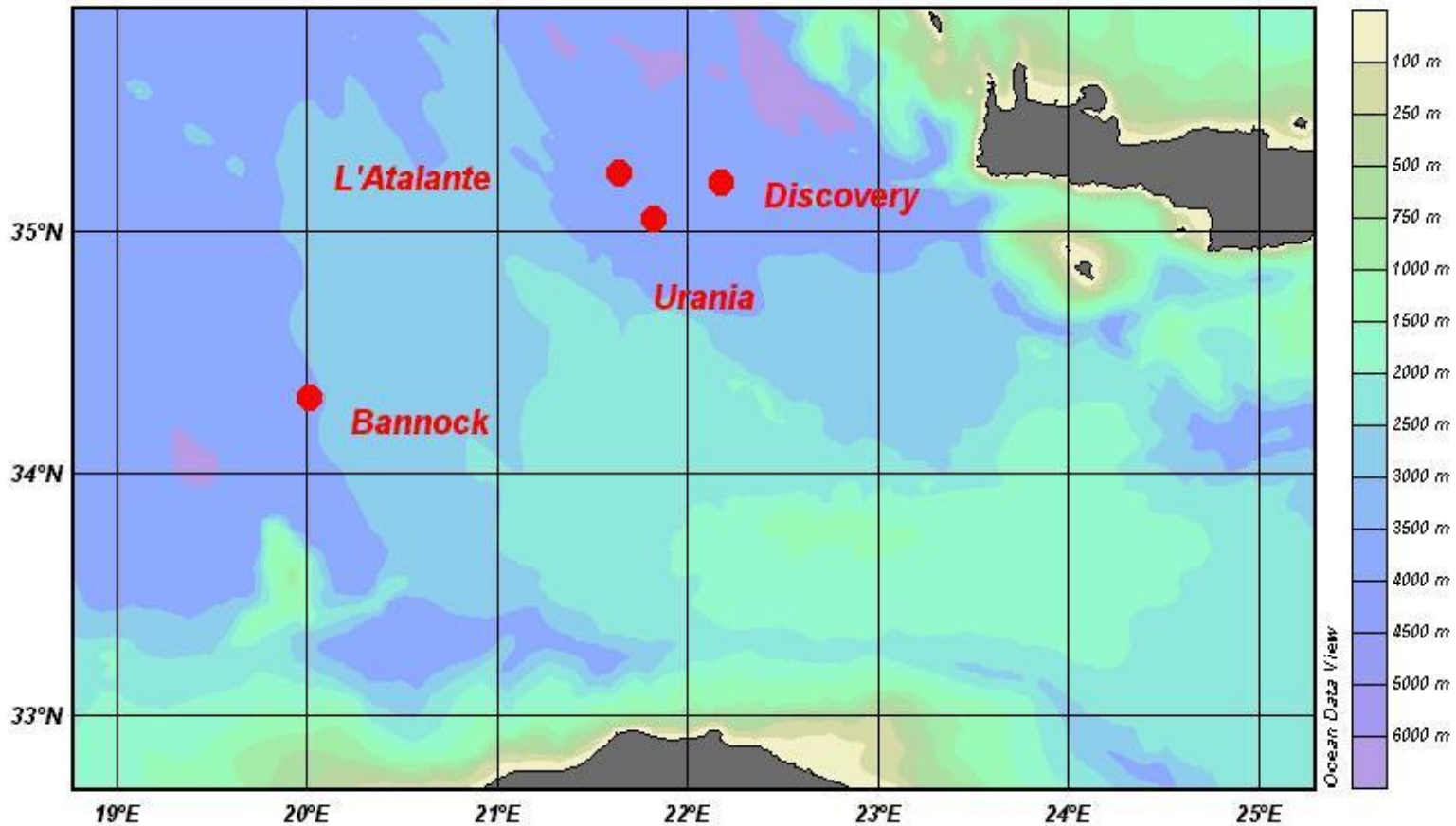
Biocatalysis Group-enzymologists



## 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



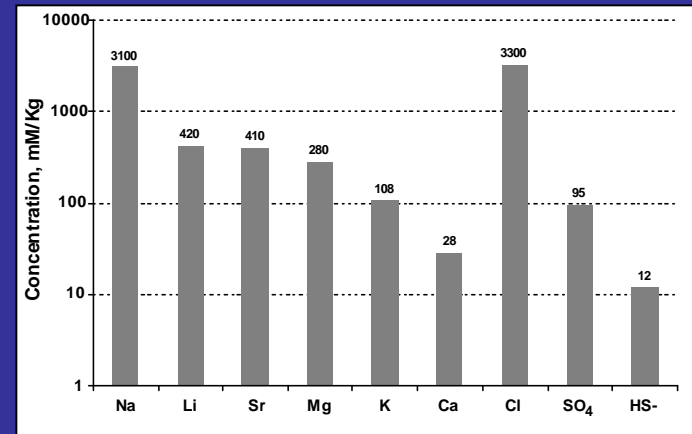
## Normal Sea Water



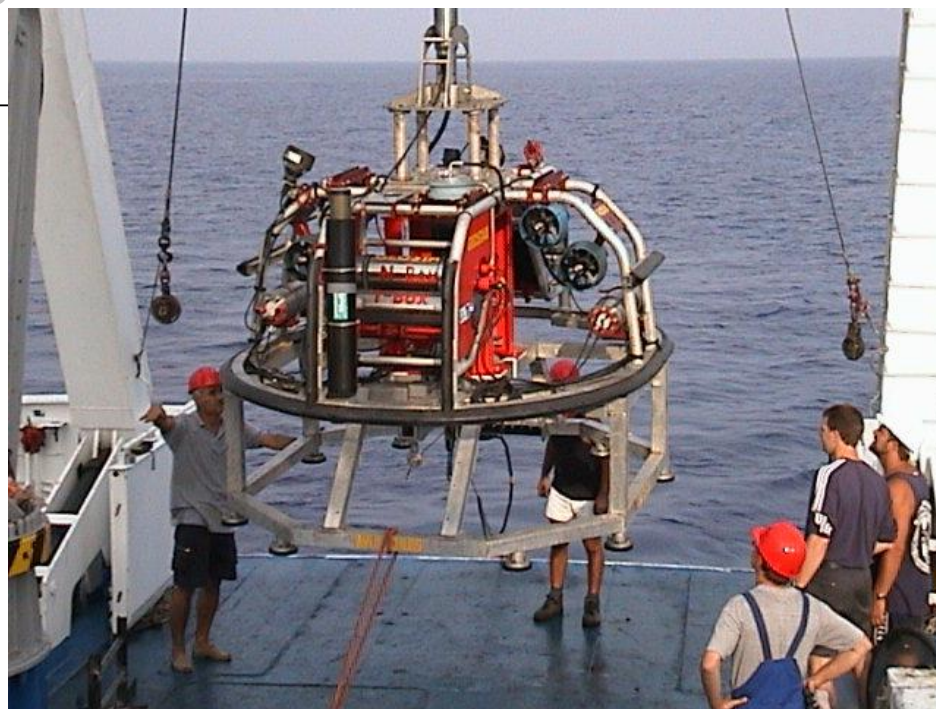
Upper Interface Layer

Lower Interface Layer

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



# Sampling strategies

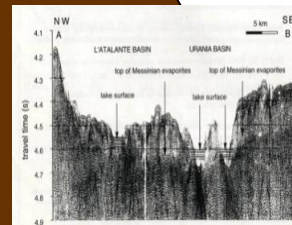


MODUS

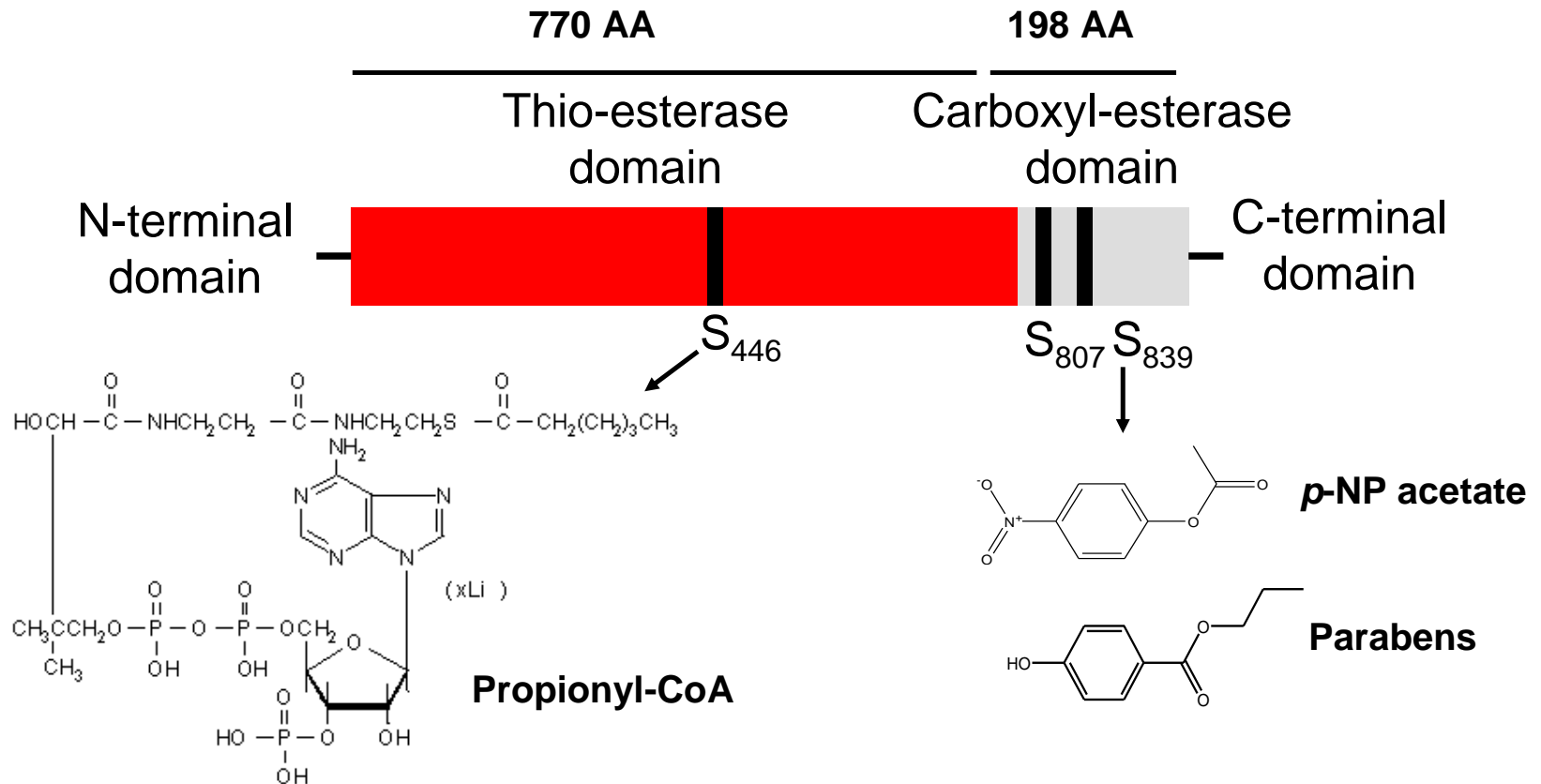


SCIPACK

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

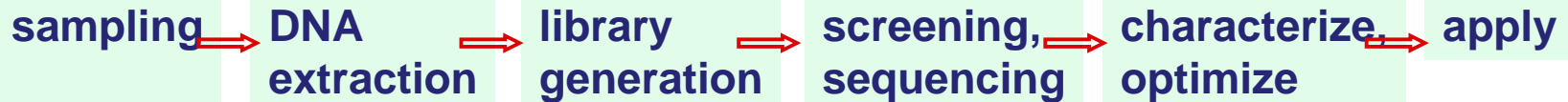


<http://www.vialactia.com/>

# 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*



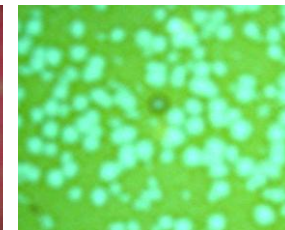
### RESULTS:

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

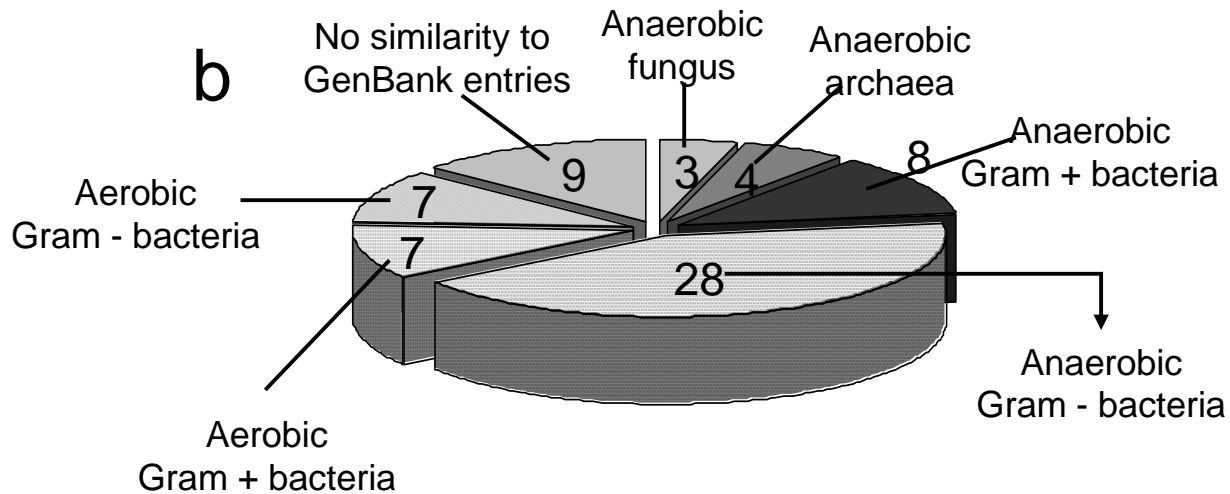
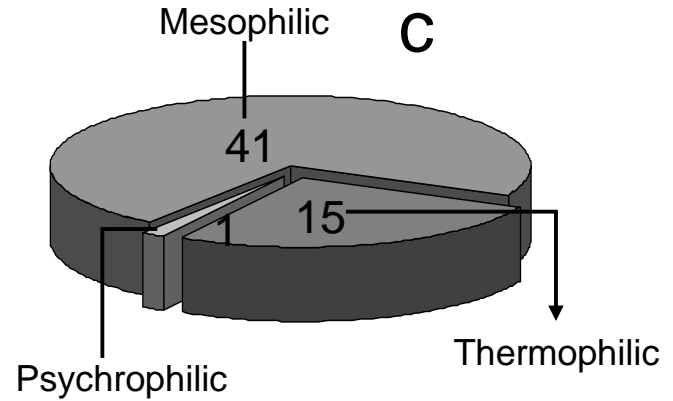
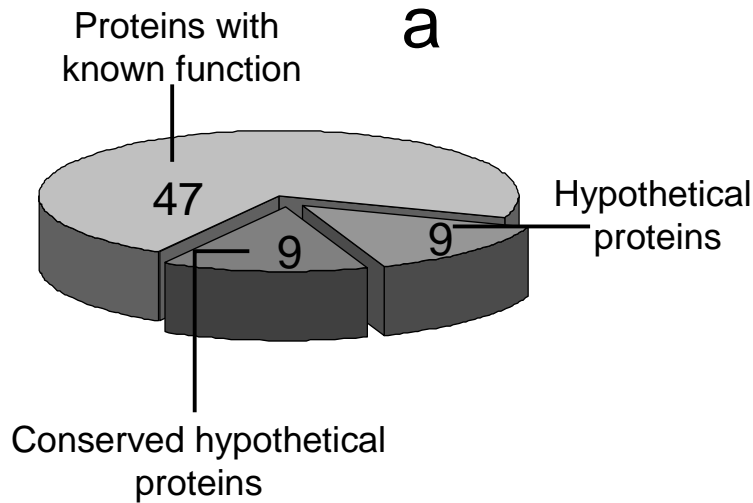
Cellulases



Esterases



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





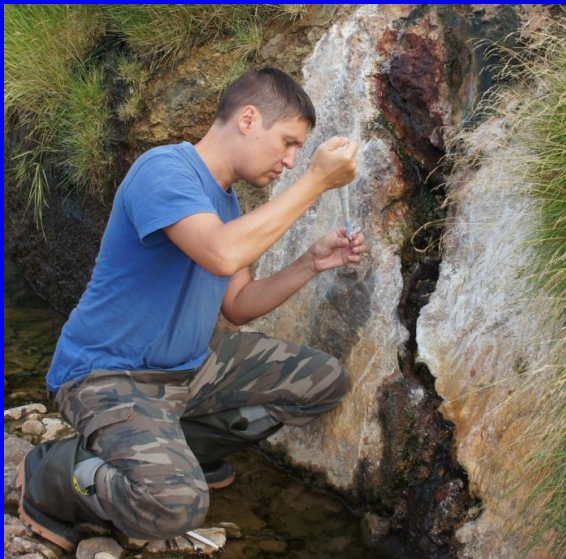
# Горячие источники вулкана Этна



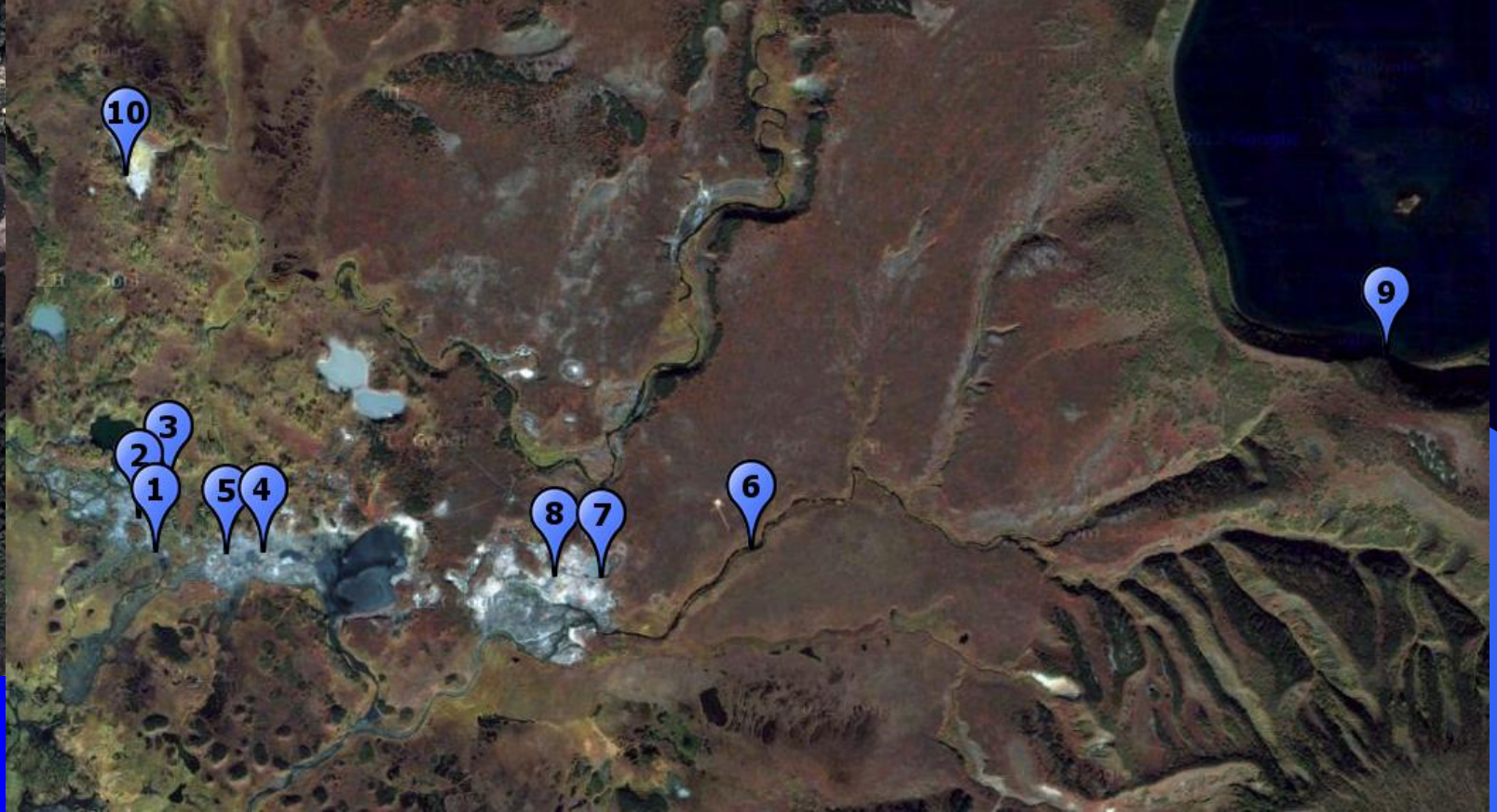












# МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ МУТАГЕНЕЗА

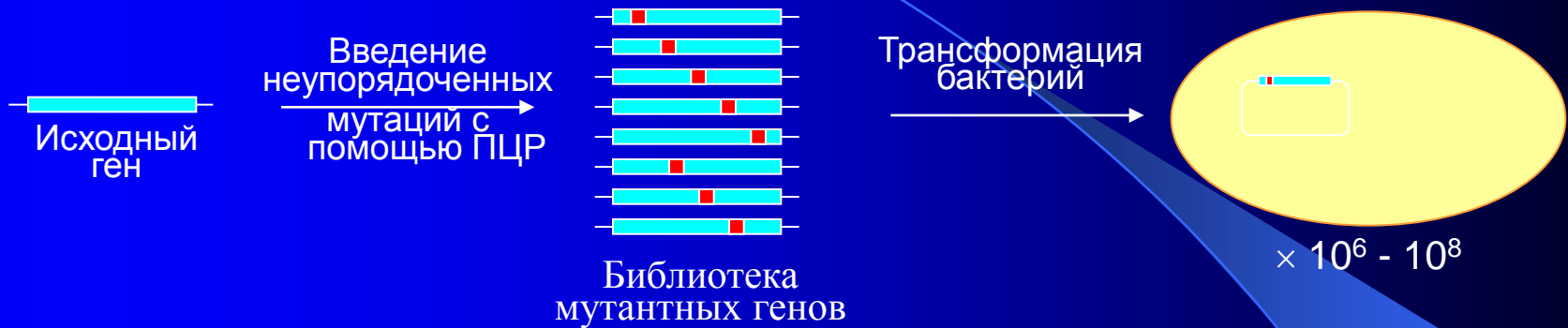
## Неупорядоченный мутагенез

- 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)

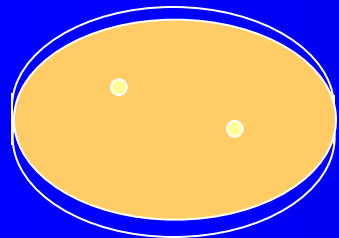
# Мутагенез с помощью метода «направленной эволюции»

## Получение библиотеки мутантных генов

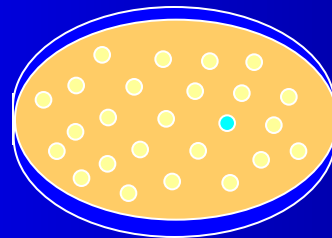


## Анализ библиотеки

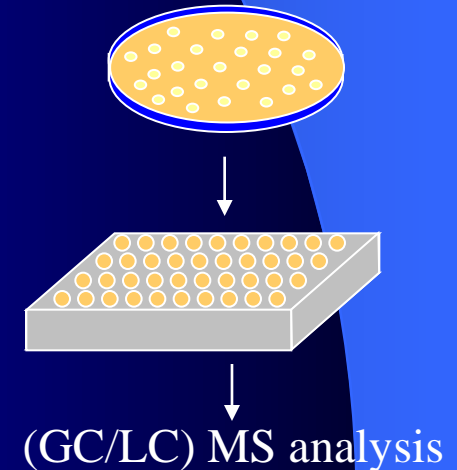
### Прямой отбор



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



Биотрансформация с помощью целых клеток



# 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)

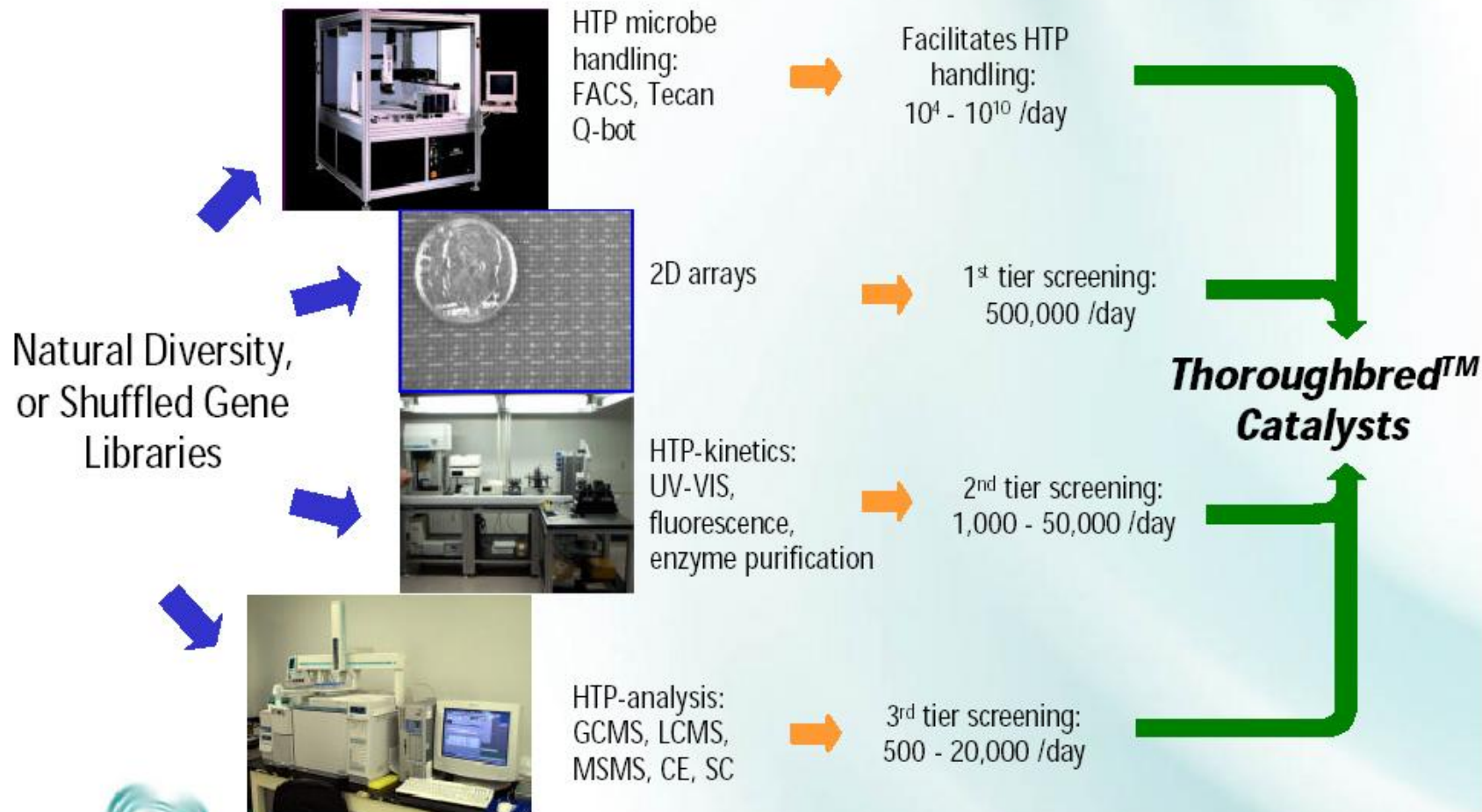
	5	10	200
Number of amino acids changed simultaneously			
1			
2			
3			
4			
5	2 476 099	623 976 948	6 278 520 528 393 960
6		9 879 635 010	3 876 986 426 283 270 000
7		107 264 608 860	2 041 510 281 040 010 000 000

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*

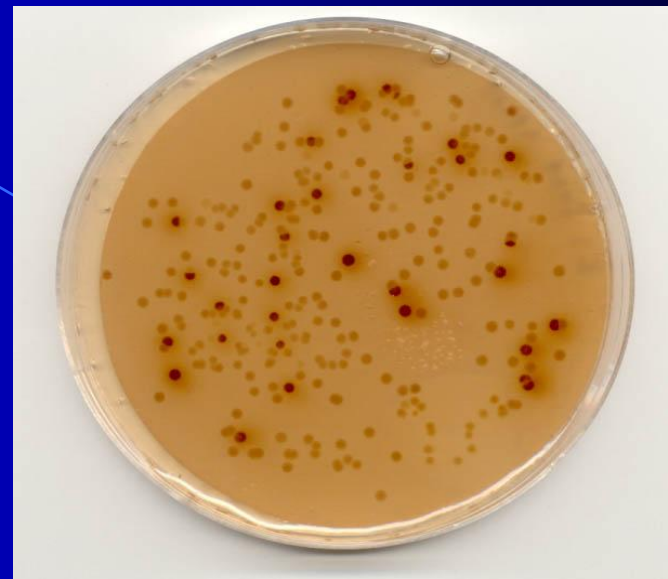
- Метод основан на размножении клонированного в плазмиду гена в специальном штамме *E.coli* XL1-Red (Stratagene), мутантного по трем генам, ответственным за первичную репарацию ДНК:
  - *mutS* (удаление несовпадающих пар ),
  - *mutD* (отвечает за 3'-5'-эксонуклеазную активность в ДНК-полимеразе III) 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.<sup>1</sup>

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

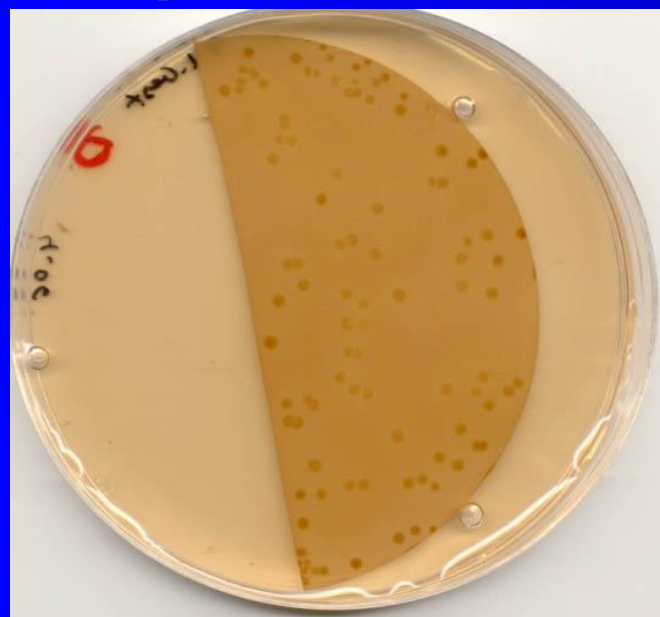
# Получение L-специфичной аминоксидазы (N.Turner, 2003, Ang.Chem.)



Master plate



First dilution of active clone

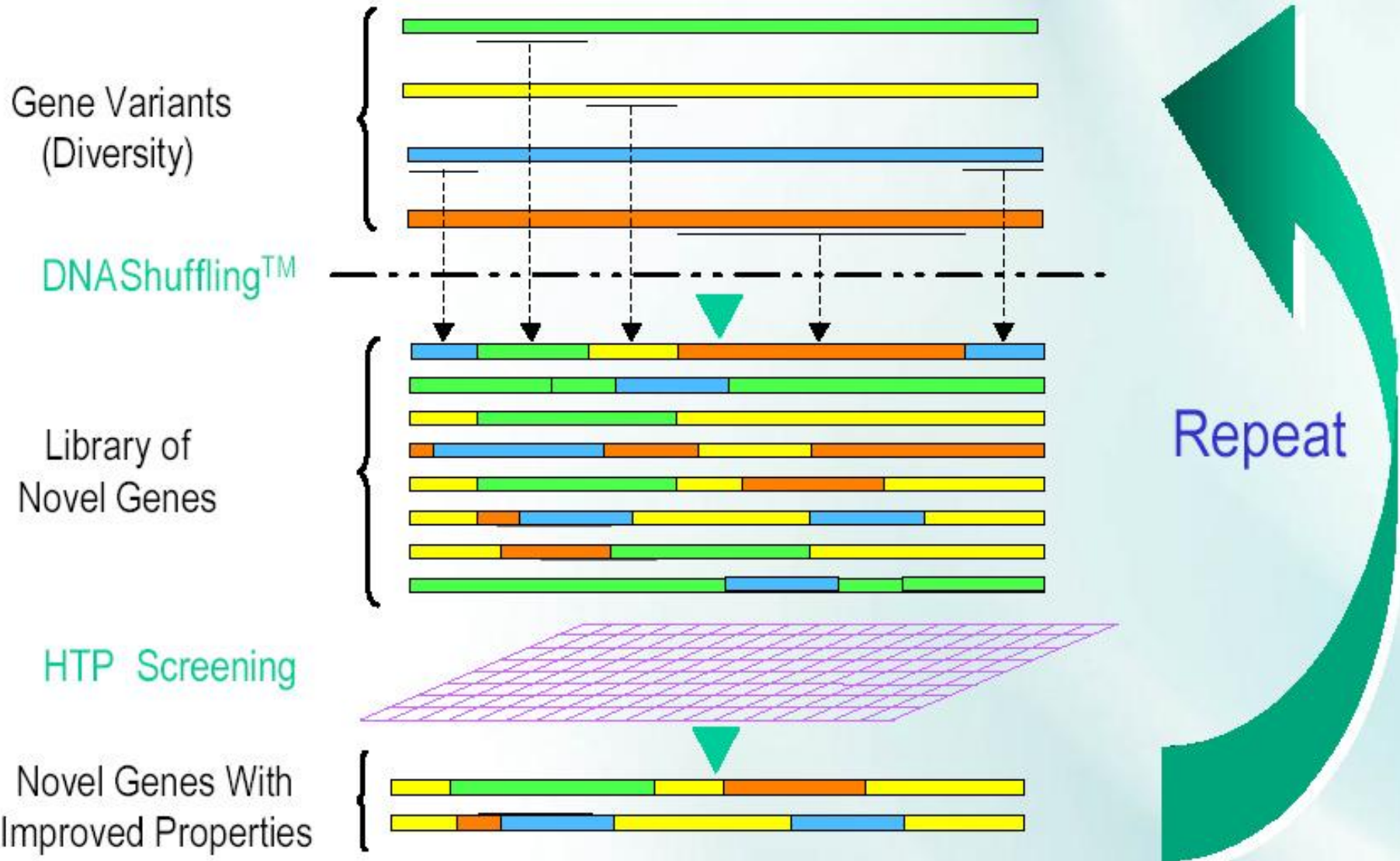


Pure clone assayed against D-enantiomer



Pure clone assayed against L-enantiomer

# “Gene Shuffling” (Генная мозайка)

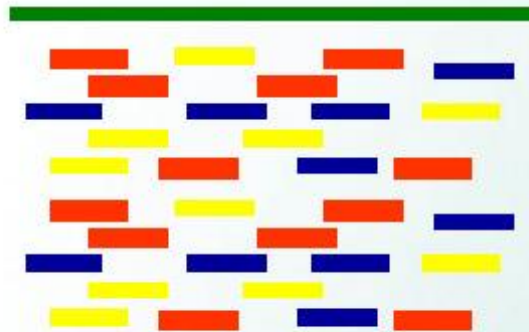




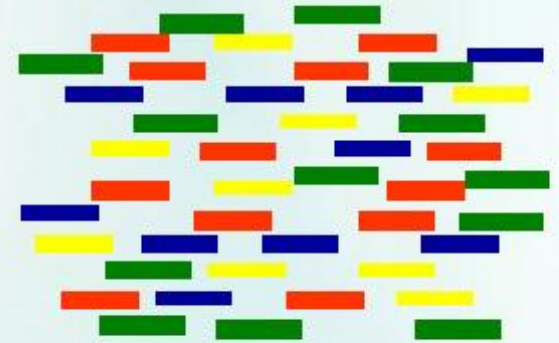
## Gene Shuffling



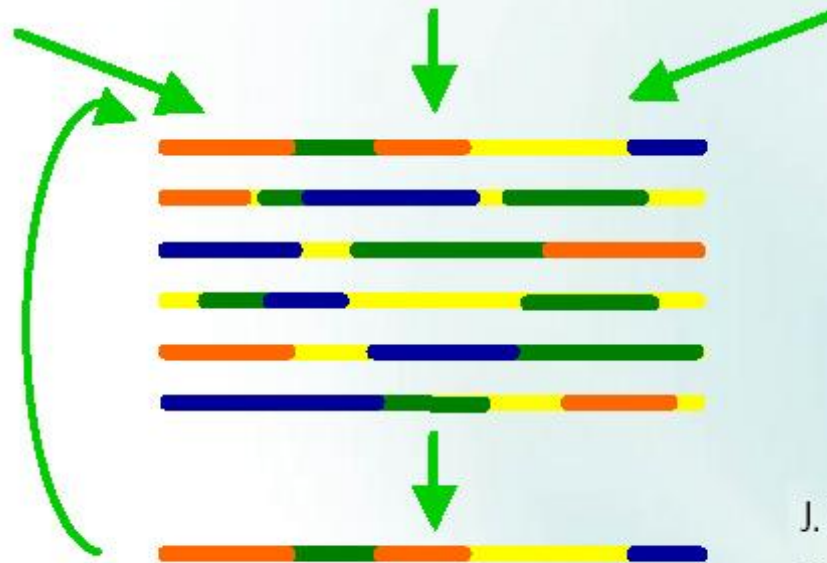
## Semi-Synthetic Shuffling



## 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

---

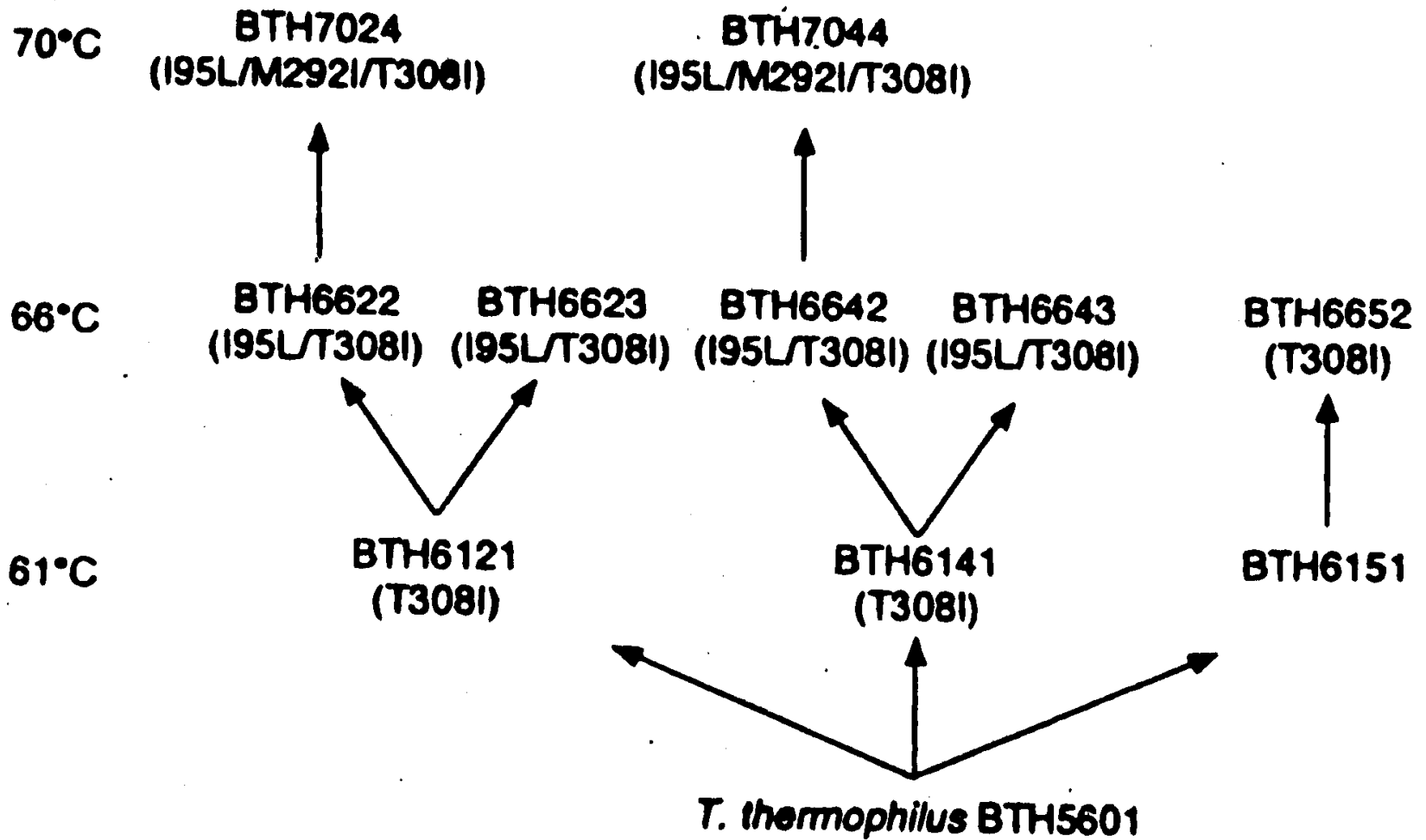
Serial increase in the thermal stability of  
3-isopropylmalate dehydrogenase from  
*Bacillus subtilis* by experimental evolution

---

SATOSHI AKANUMA,<sup>1,2</sup> AKIHIKO YAMAGISHI,<sup>1</sup> NOBUO TANAKA,<sup>2</sup> AND TAIRO OSHIMA<sup>1</sup>

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

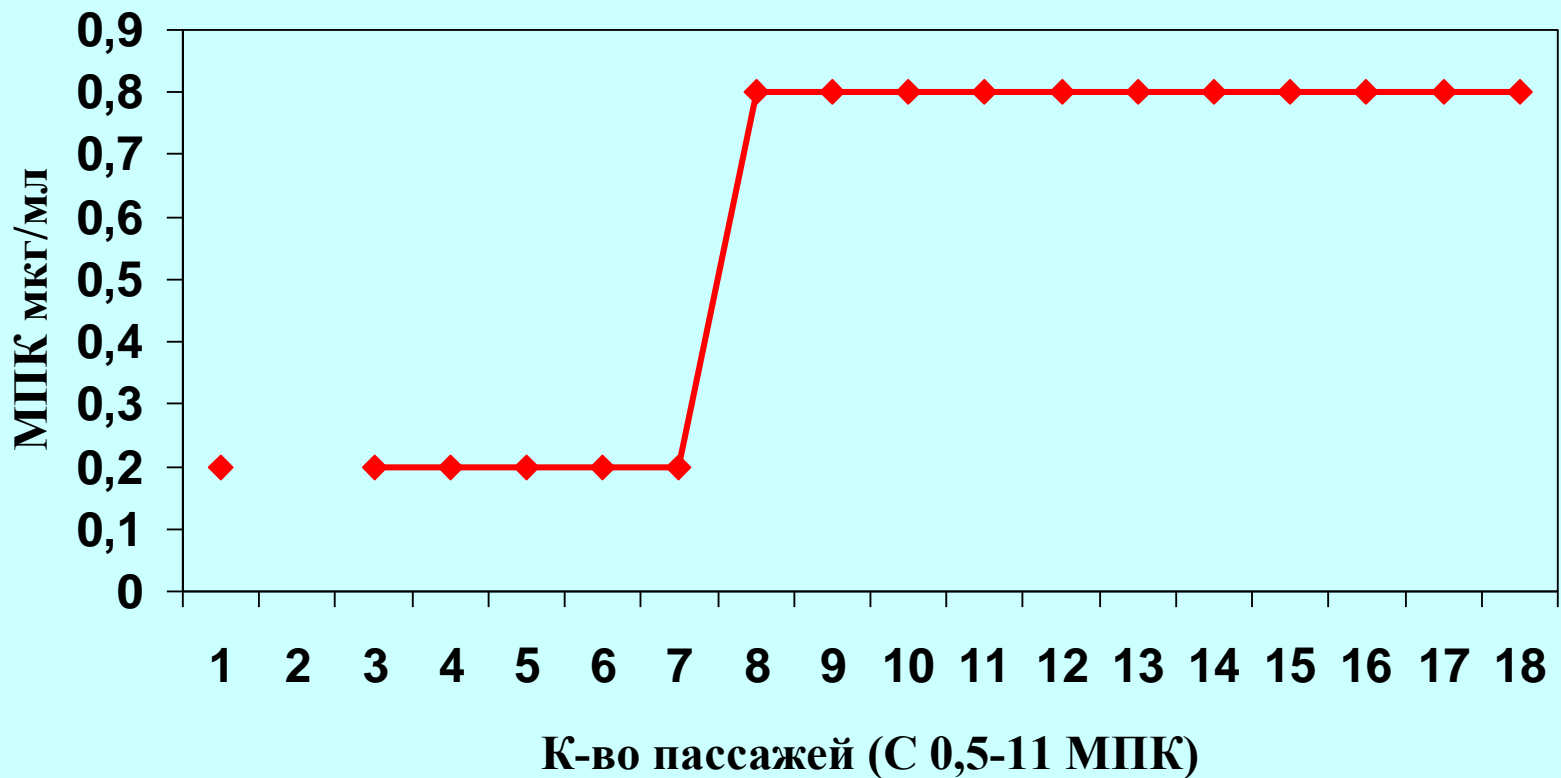
<sup>2</sup>Department of Life Science, Tokyo Institute of Technology, Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 226, Japan



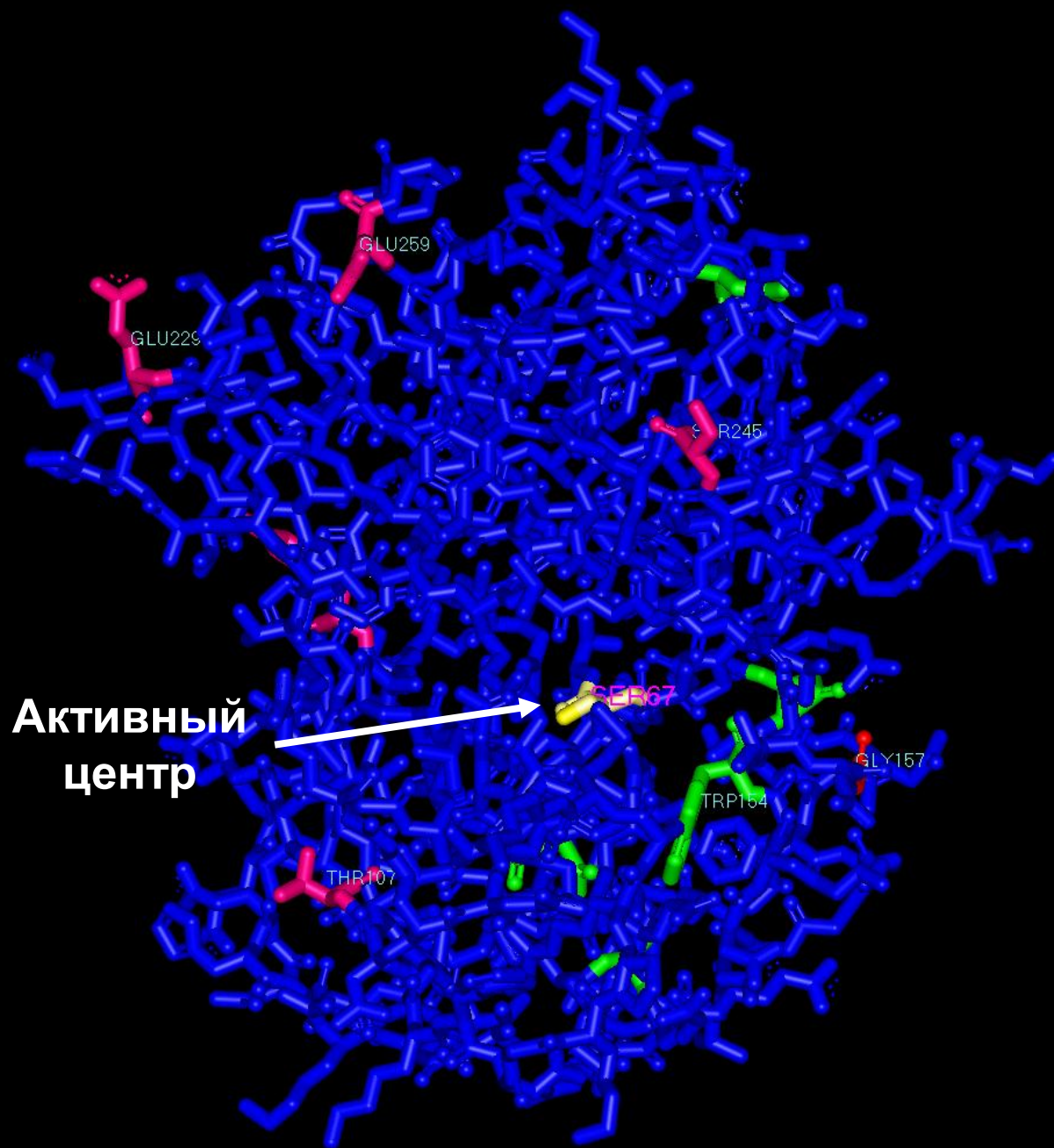
**Fig. 5.** Evolution pathway of *T. thermophilus* mutant strain, which carried *B. subtilis leuB* gene. Temperatures at which mutant strains were selected are shown.



# Формирование устойчивости *B. anthracis* к офлоксацину *in vitro*



Choe et al AAC 2000;44:1766



**Активный  
центр**

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

**Красные –  
сильный эффект**

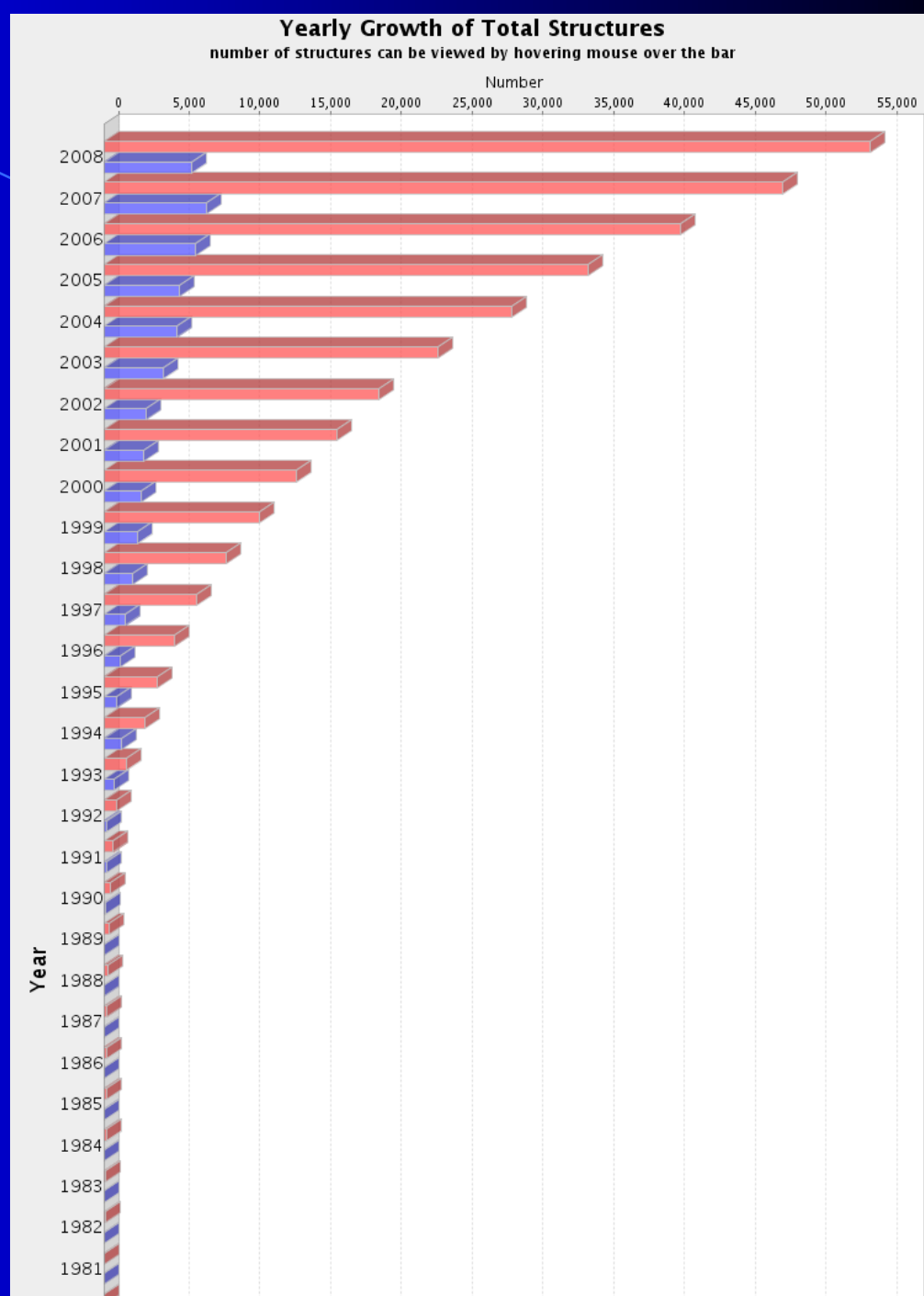
**Зеленые –  
умеренный  
эффект**

# “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 PDB

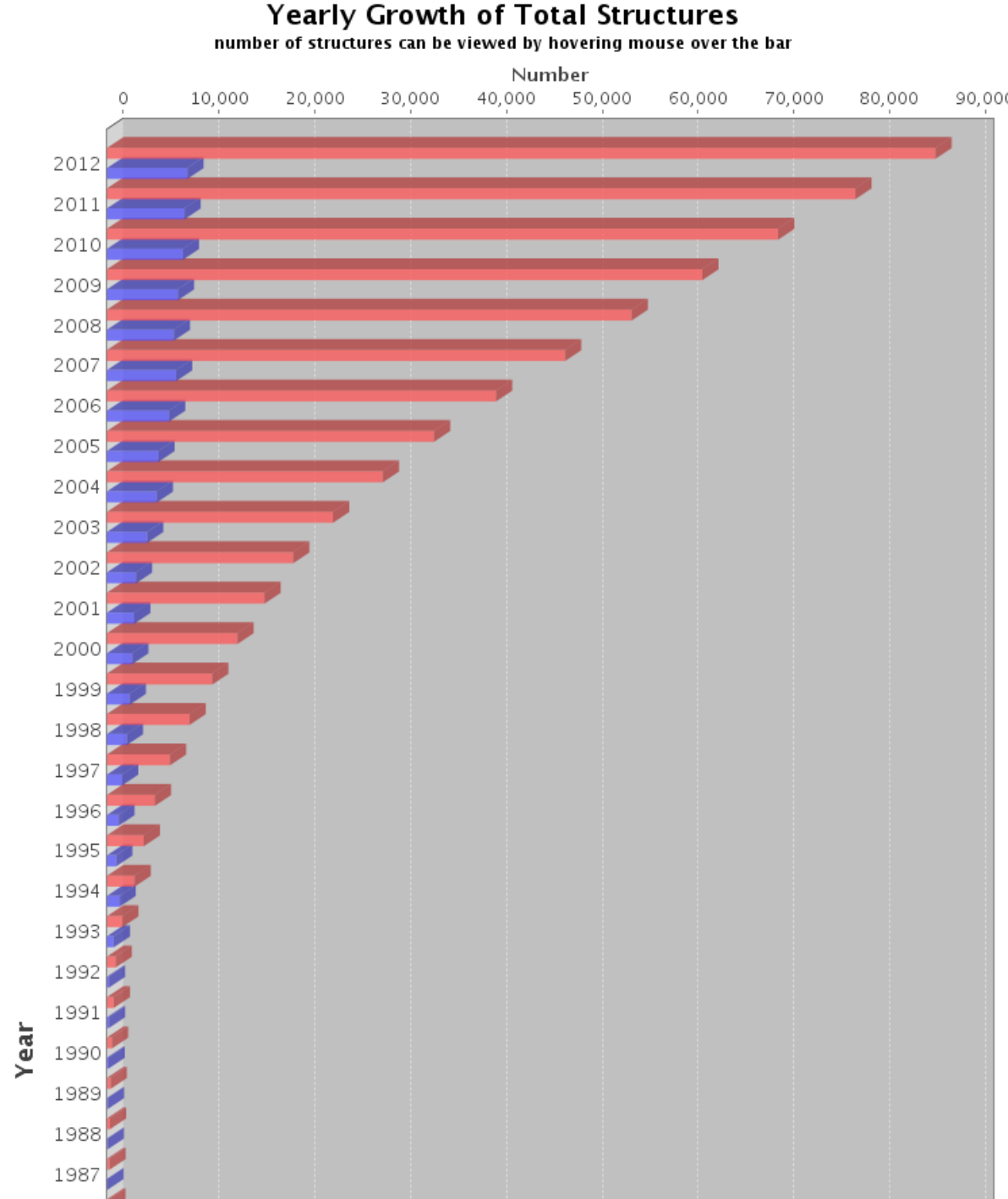
## 2008



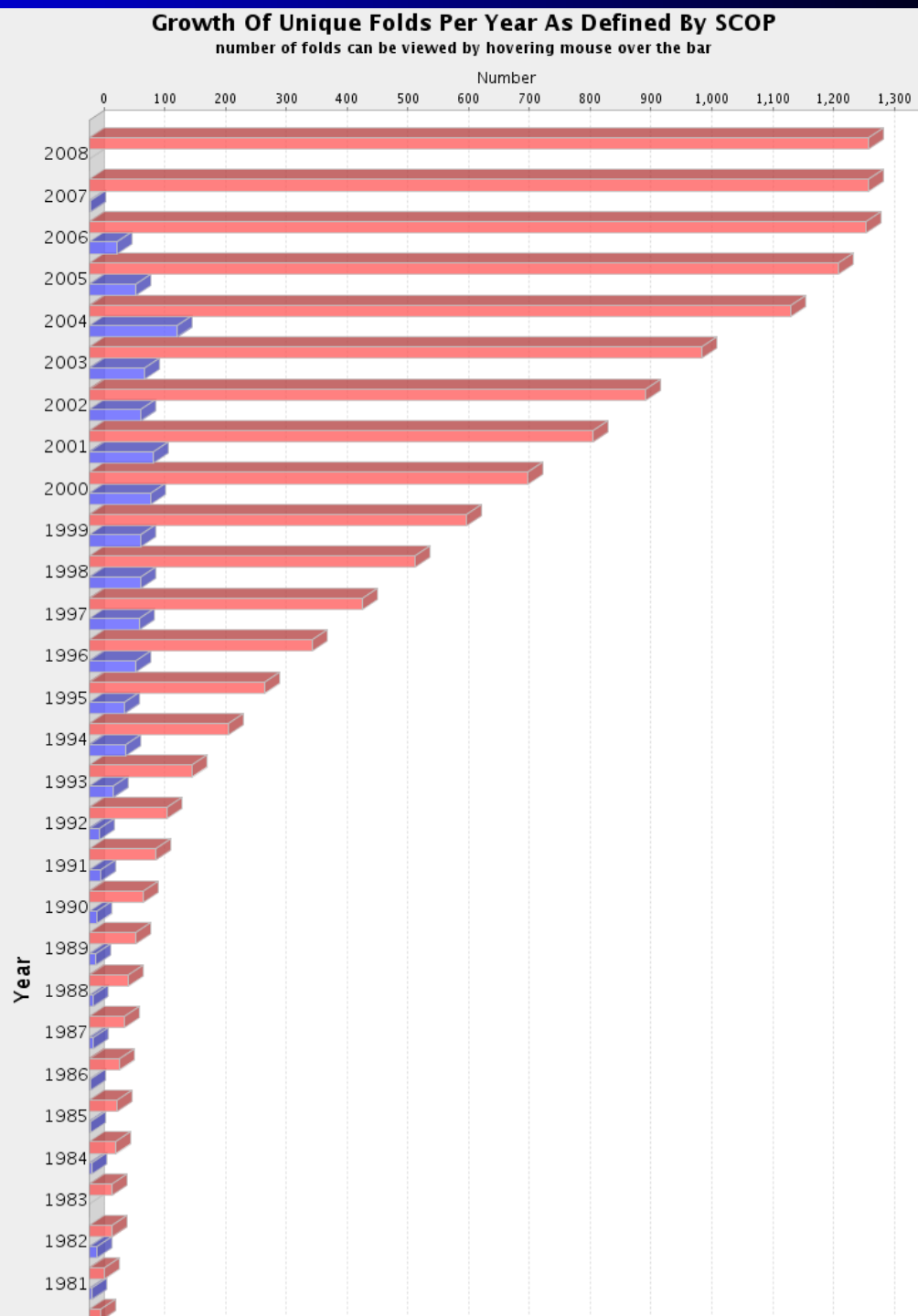
Рост количества  
структур в банке  
PDB

2012

2016 –  
- 124286  
структур

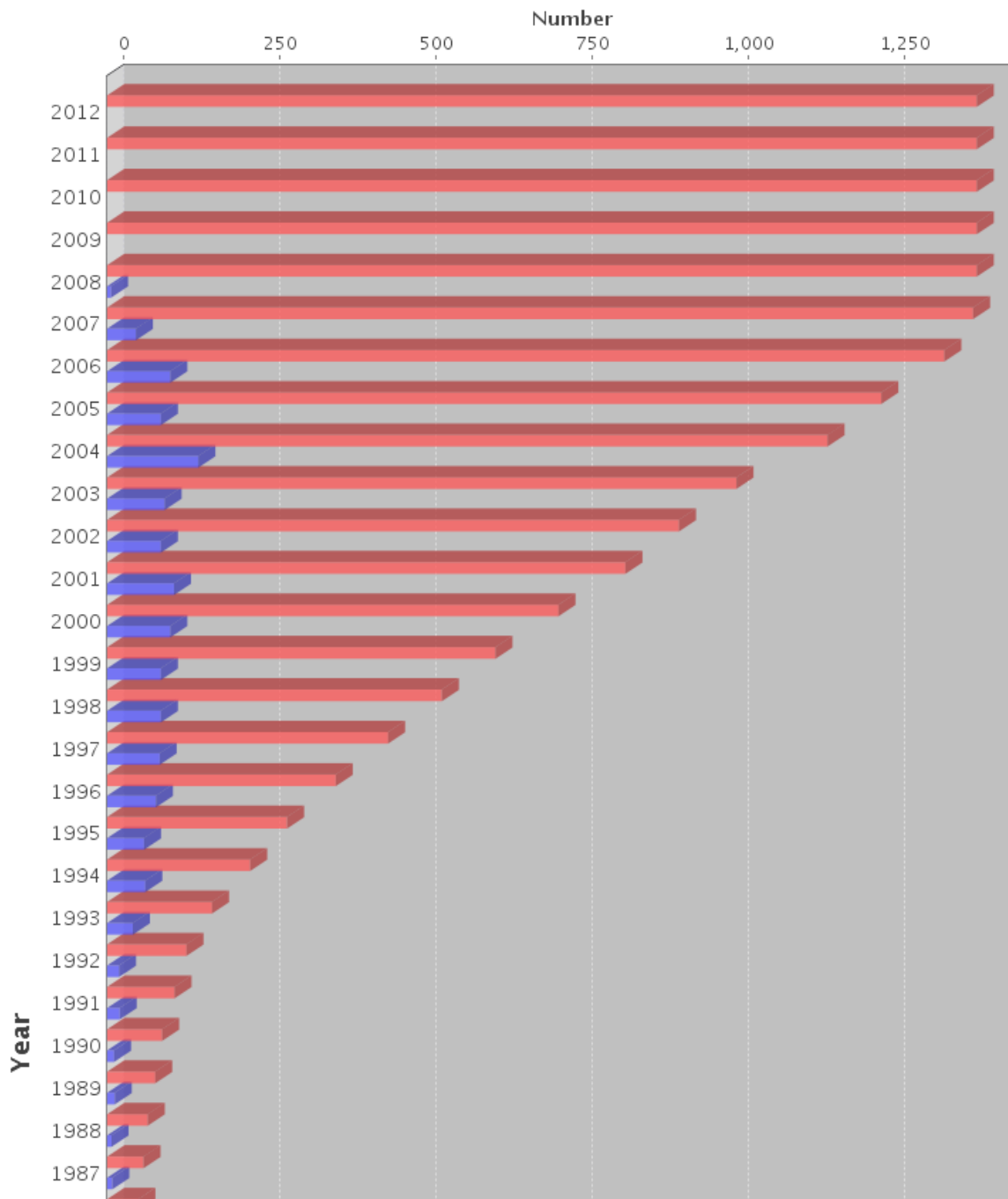


Рост  
количества  
УНИКАЛЬНЫХ  
структур  
белков  
  
2008



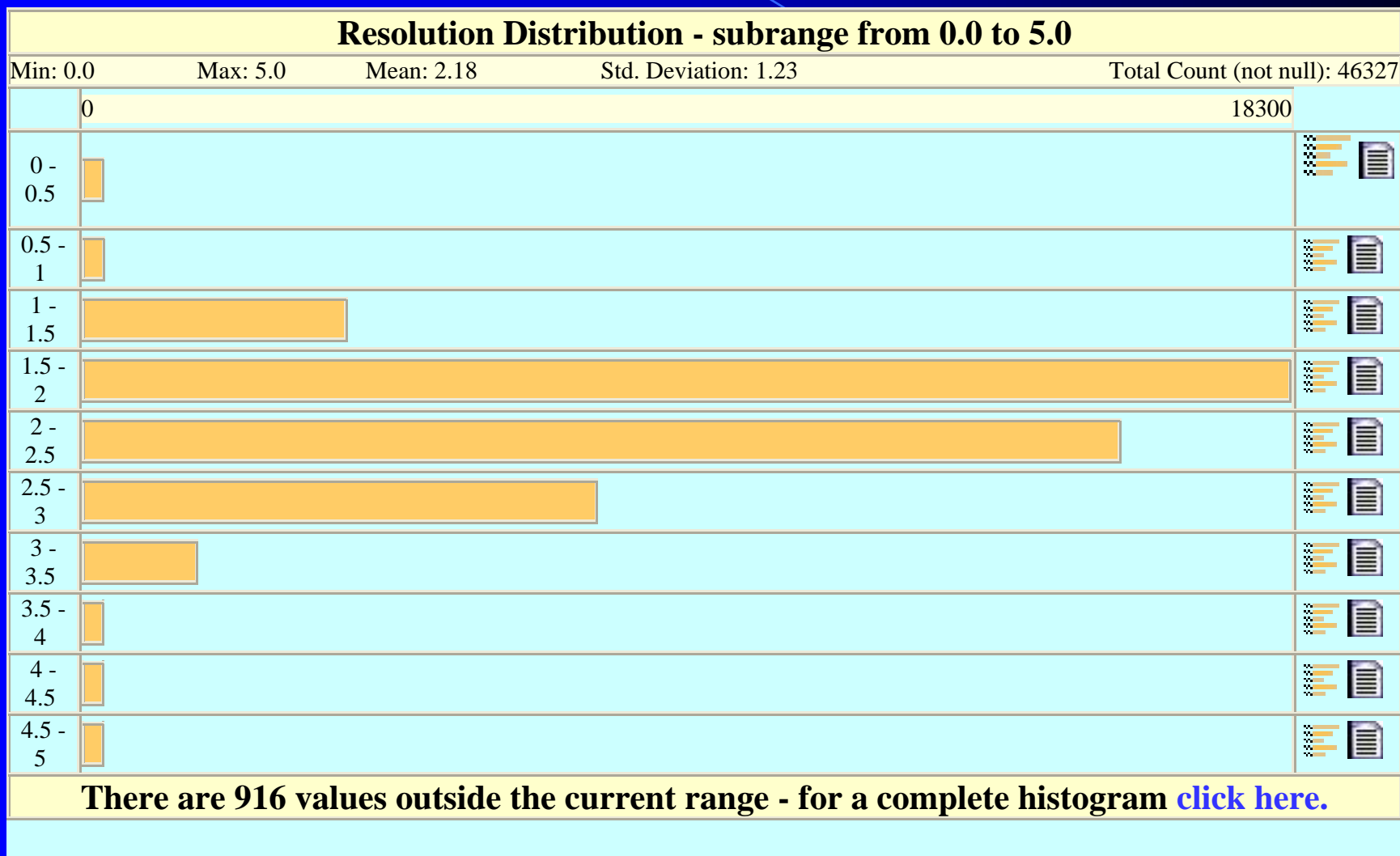
Рост  
количества  
УНИКАЛЬНЫХ  
структур  
белков  
  
2012

Growth Of Unique Folds Per Year As Defined By SCOP (v1.75)  
number of folds can be viewed by hovering mouse over the bar

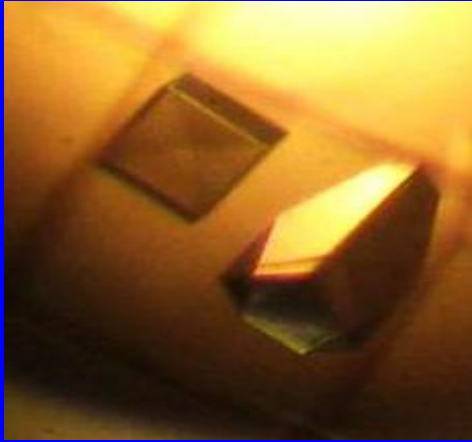




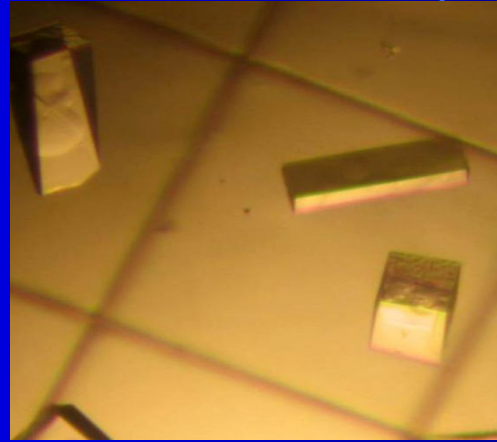
# Более 50% структур имеют разрешение $\leq 2,0\text{\AA}$



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



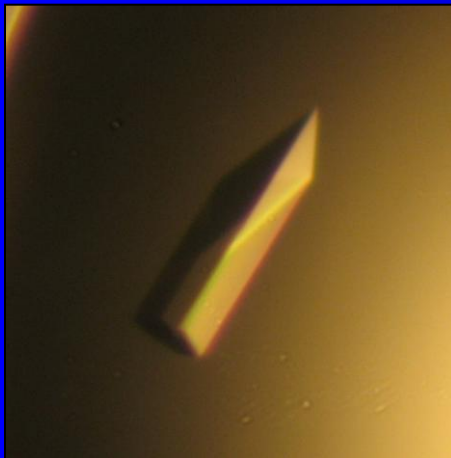
**AraFDH + NAD<sup>+</sup>**



**apo-AraFDH**

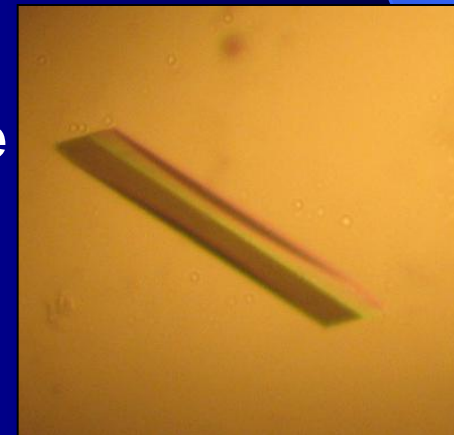


**AraFDH + NAD<sup>+</sup> + azide**

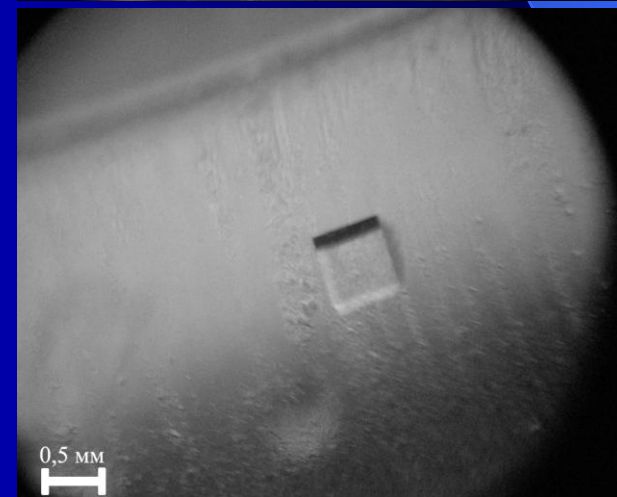
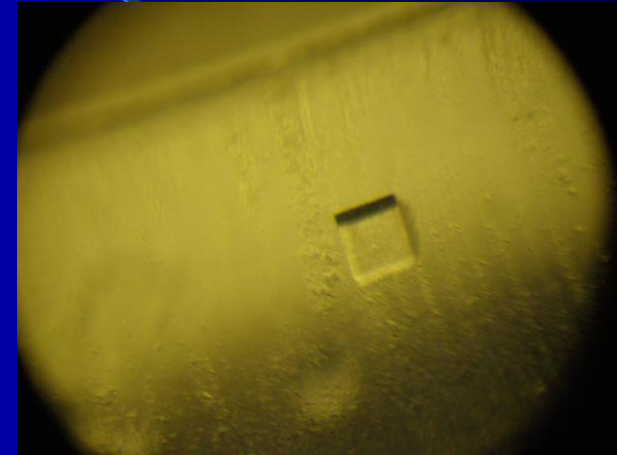
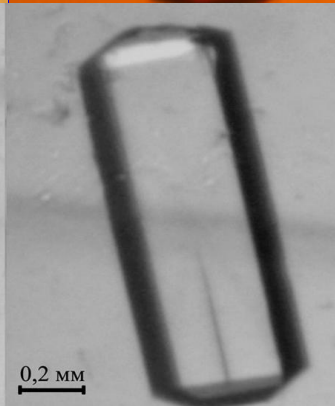
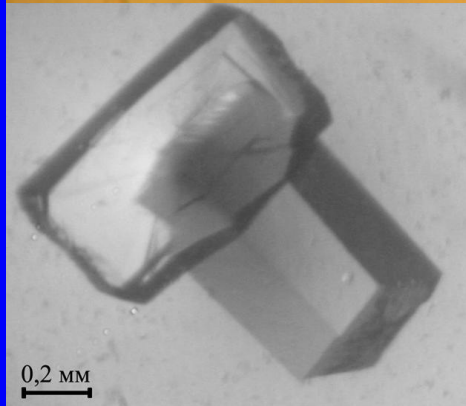
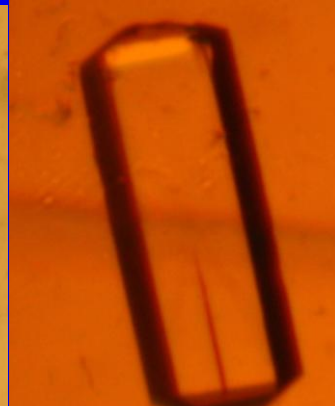
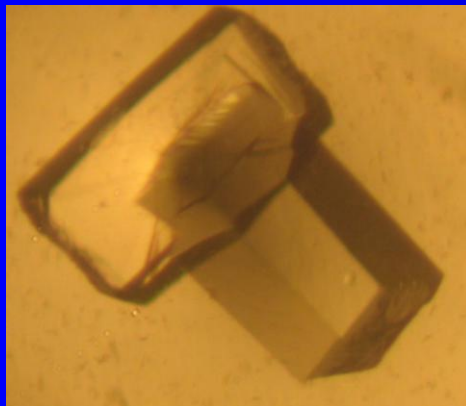
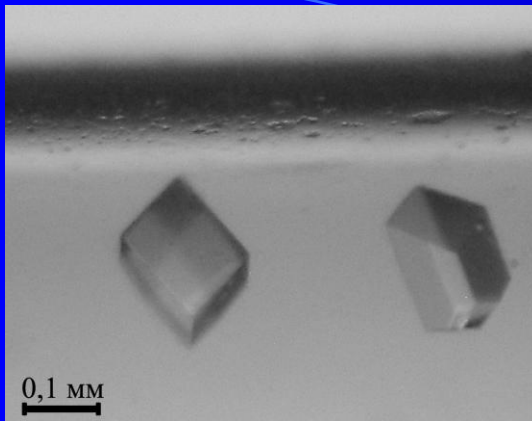


**SoyFDH + NAD<sup>+</sup>**

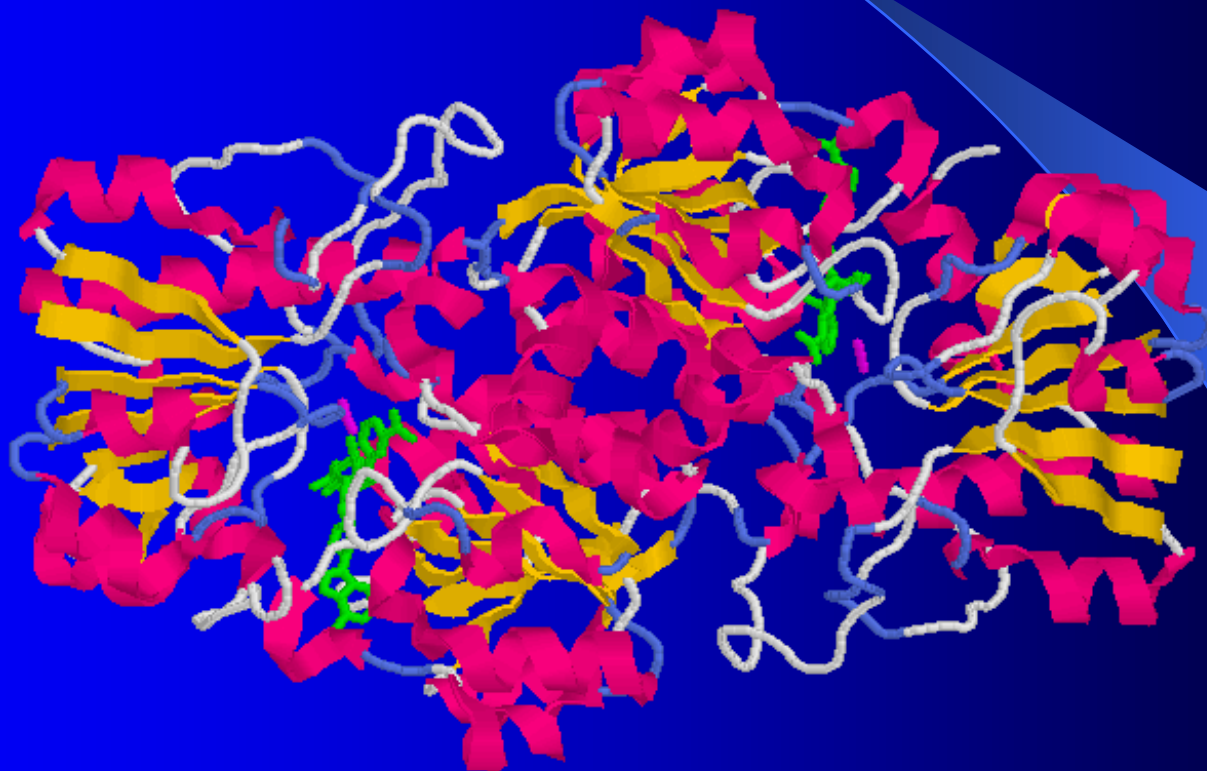
**SoyFDH + NAD<sup>+</sup> + azide**



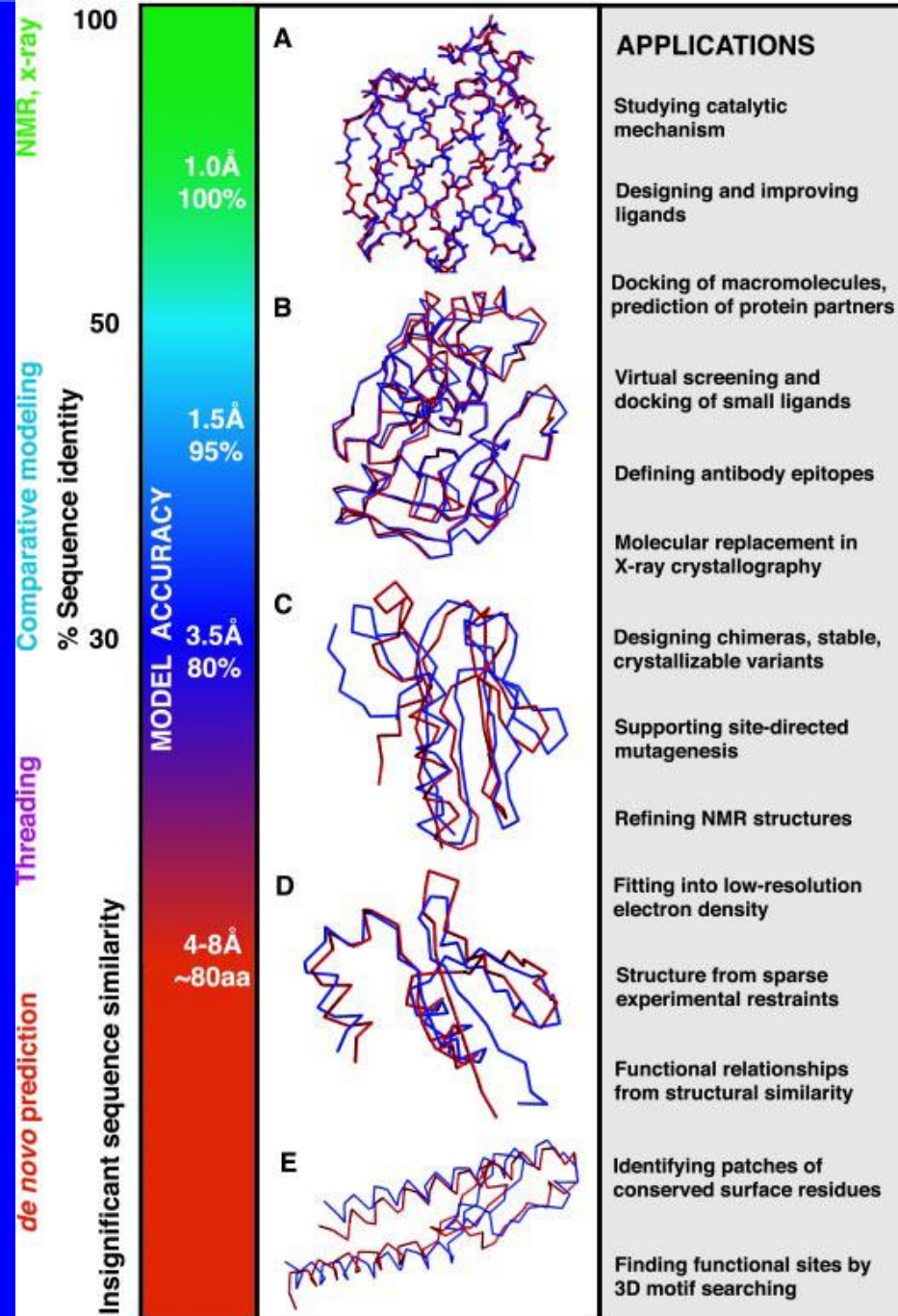
# Crystal of AraFDH obtained in space



# Конформационные изменения в молекуле формиатдегидрогеназы





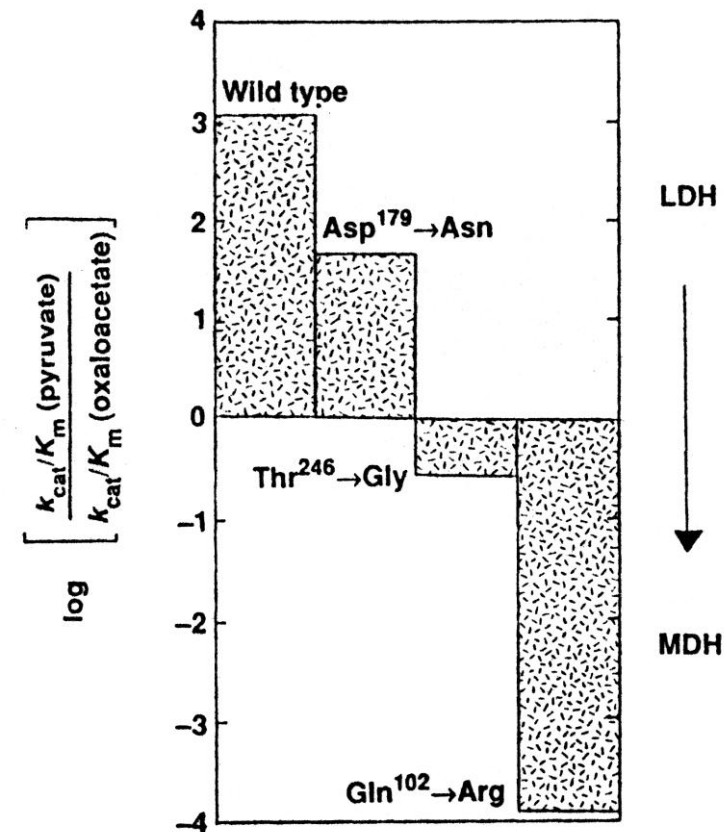
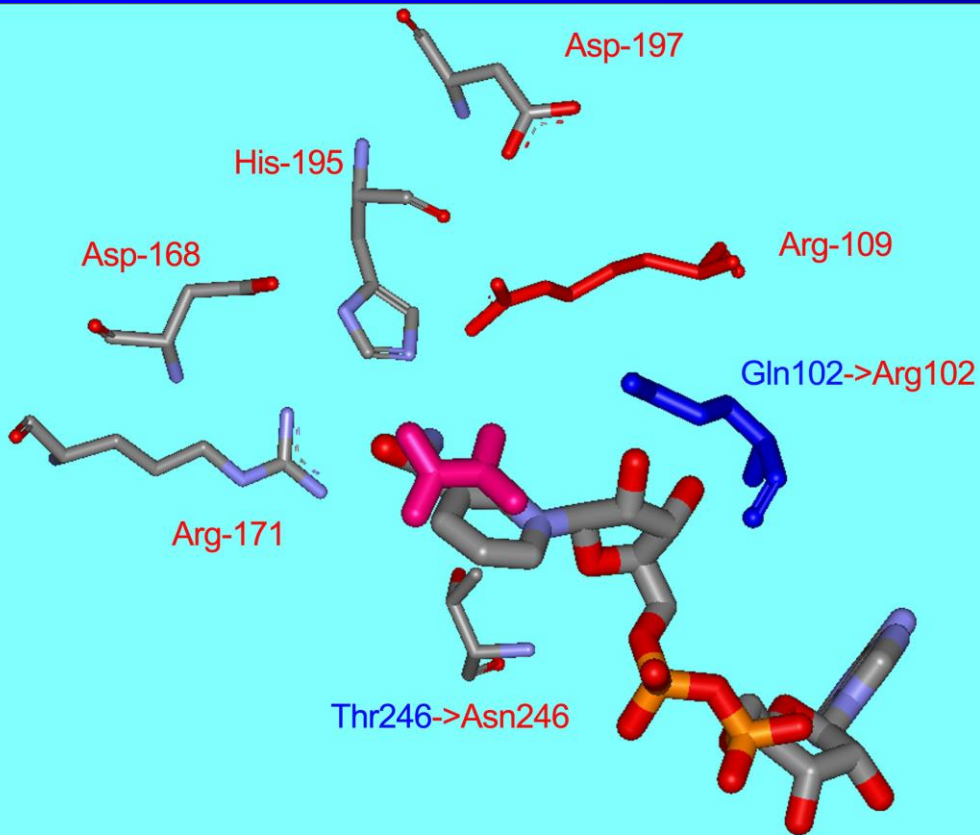


# Protein Structure Prediction and Structural Genomics

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



# Получение малатдегидрогеназы из лактатдегидрогеназы

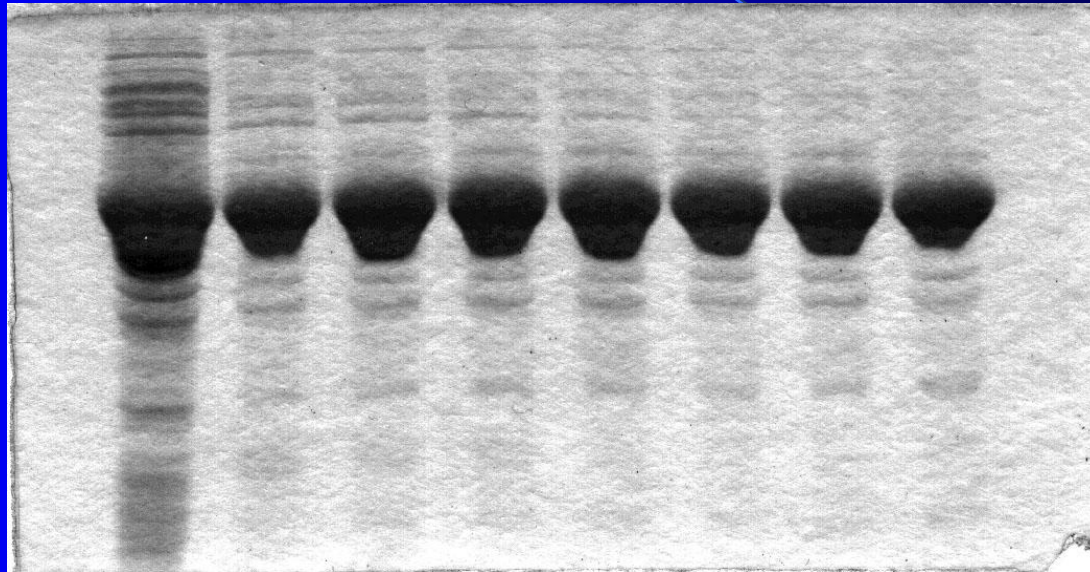


# Rational design vs directed evolution

- ***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

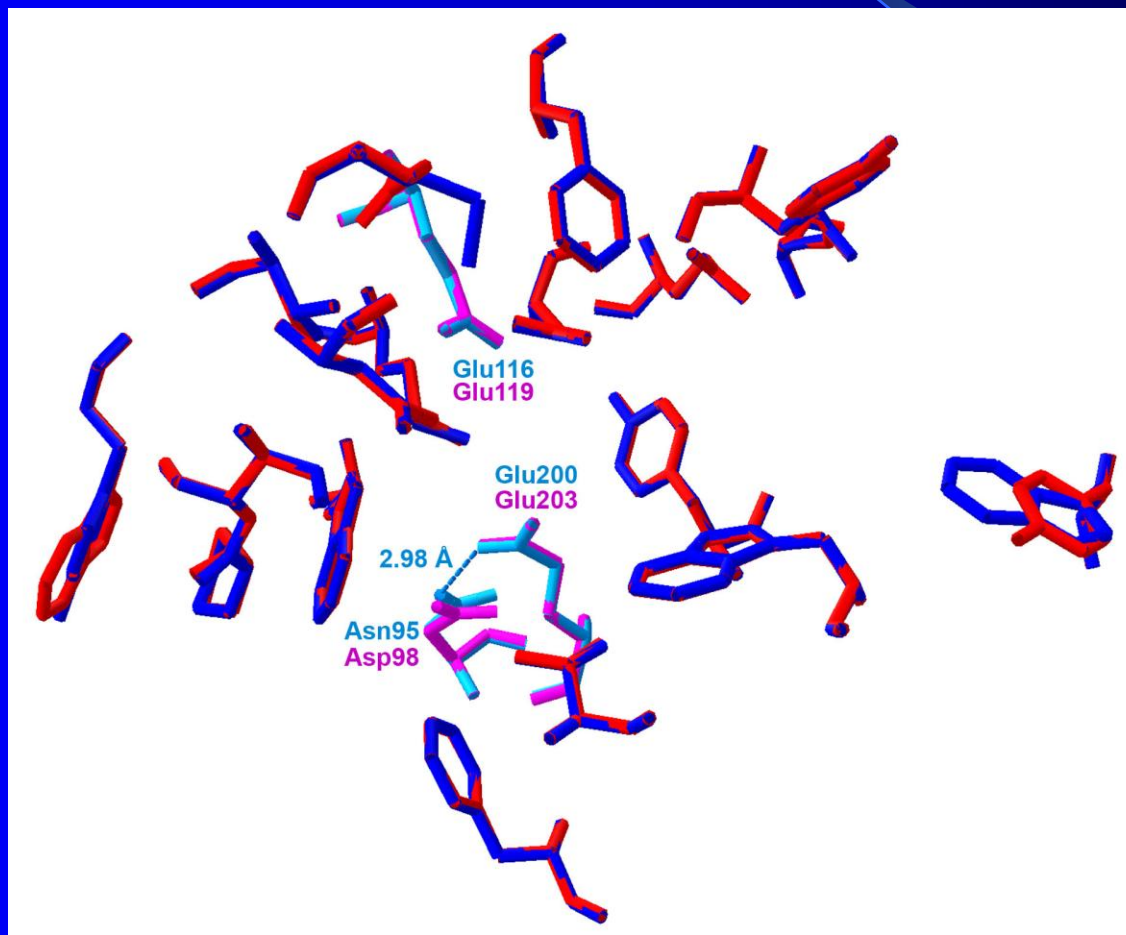


Time,  
min 0 10 20 30 40 60 90 120

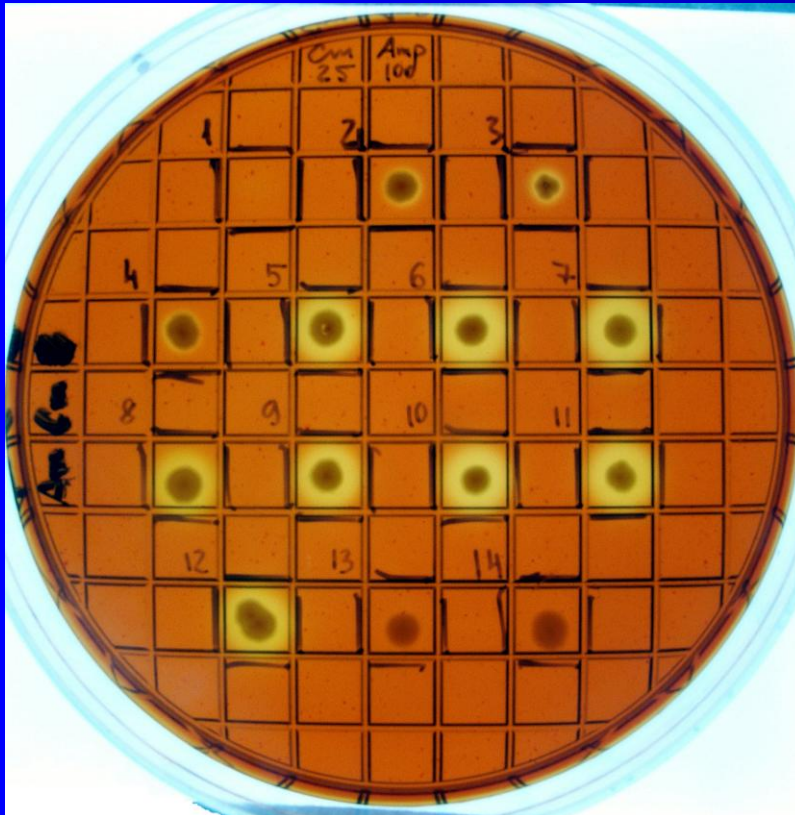
Heat treatment of disrupted cell suspension at 60 °C



# Изменение рН-оптимума активности эндо- $\beta$ -глюконазы III



# Окраска по активности при рН 5,5



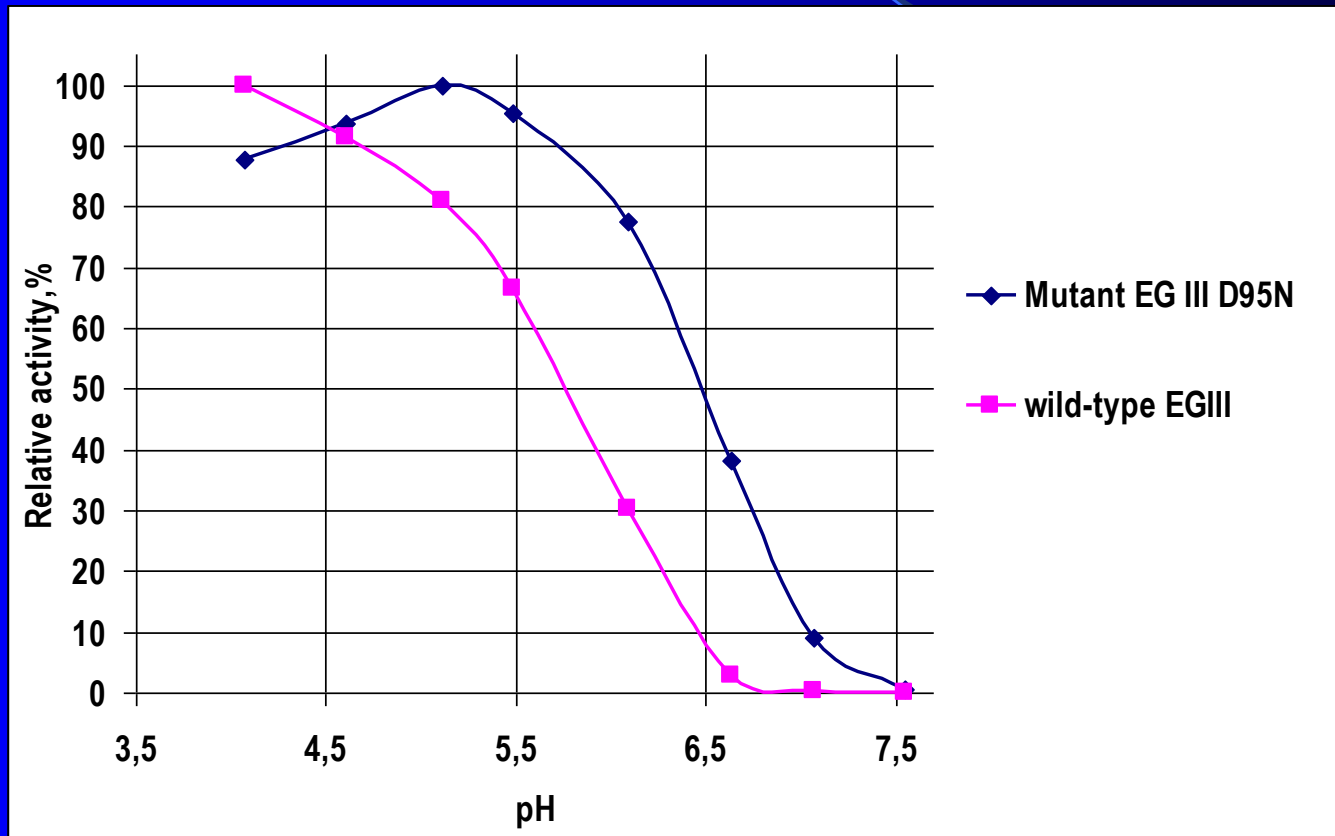
2-4 – EBGIII дикого типа

5-12 – мутант EBGIII  
Asp95Asn

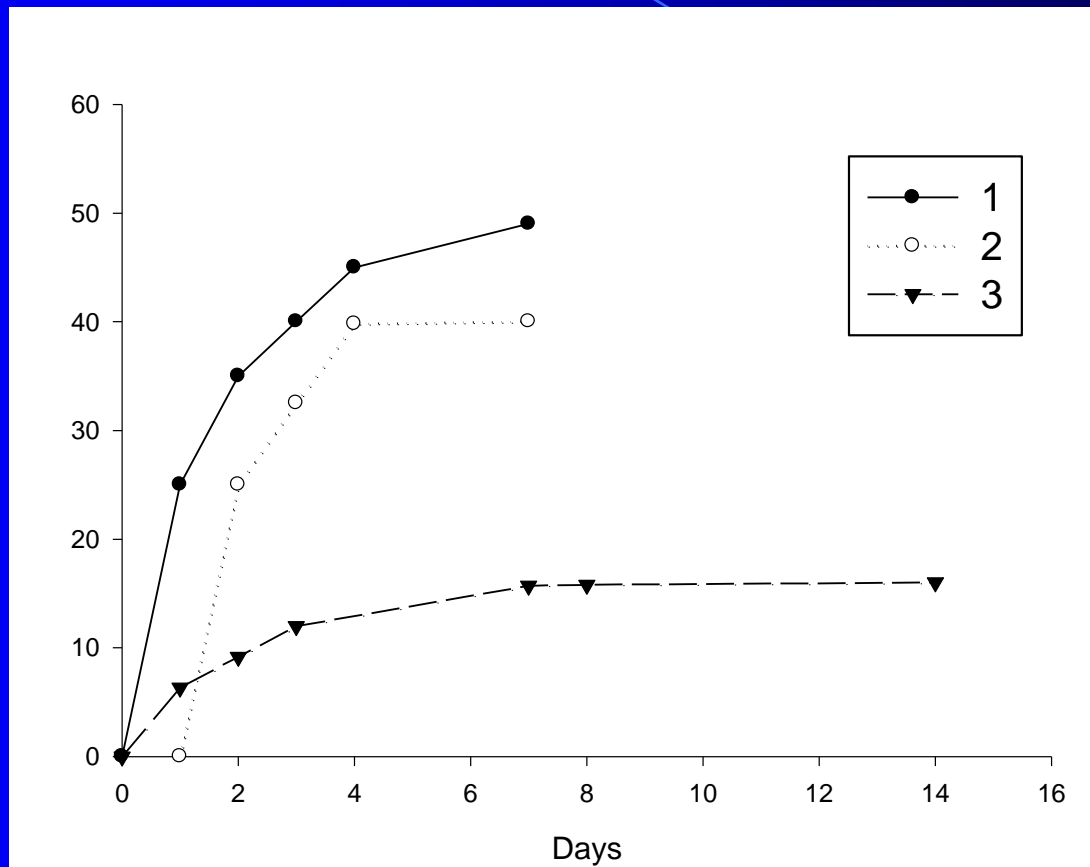
13-14 – контроль



# Определение рН оптимума активности исходной и мутантной EBGIII

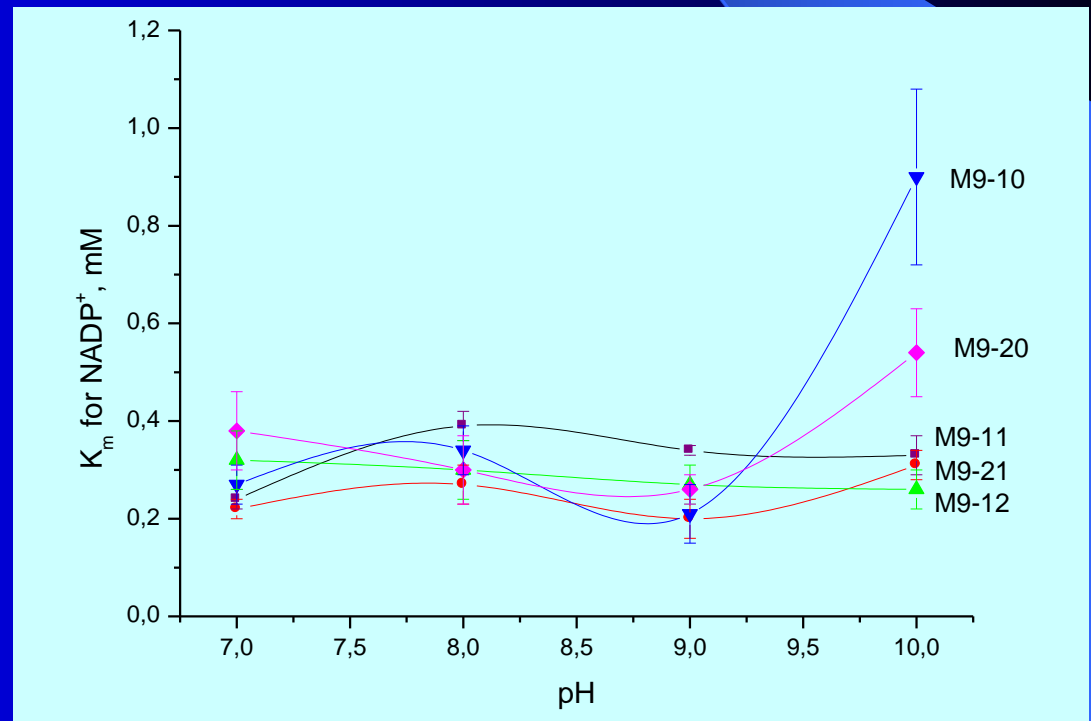
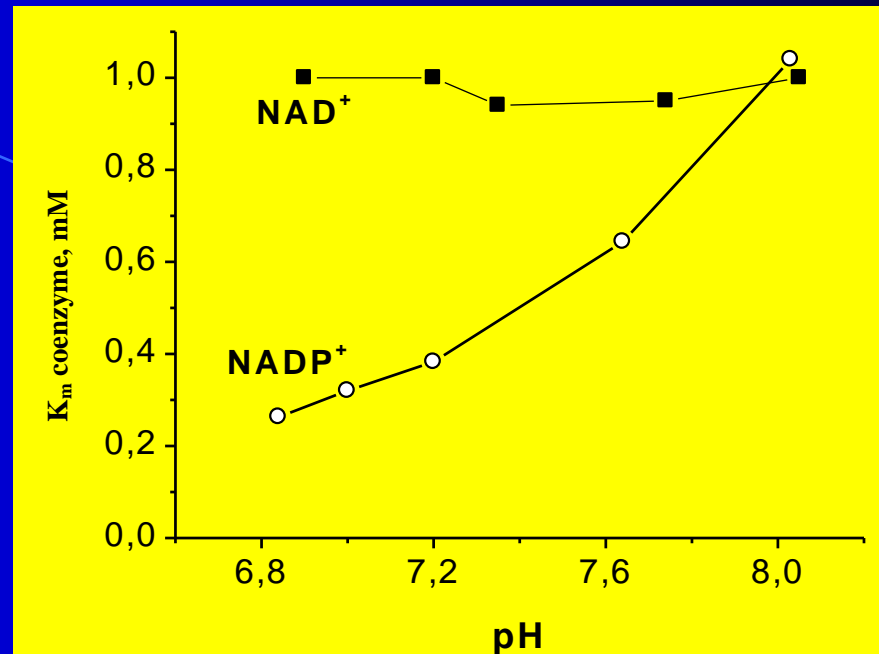


# НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ПЕРОКСИДАЗЫ ТАБАКА



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

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



# Диагностика SARS COV-2 с помощью изотермической ПЦР

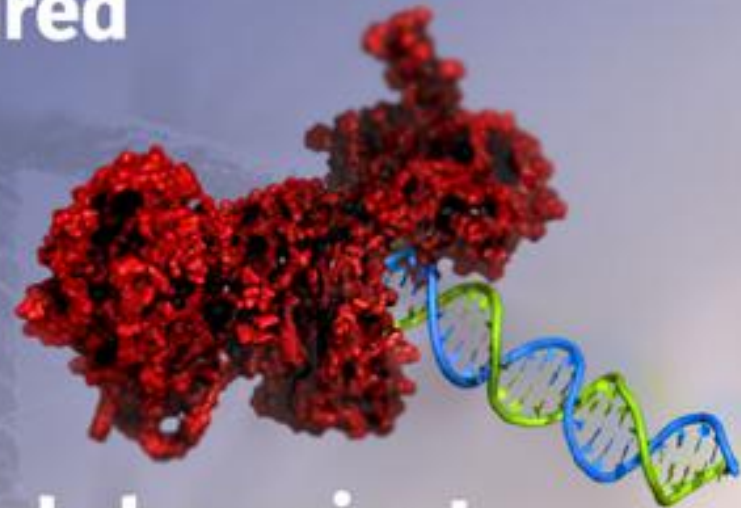


Jena Bioscience  
Building Blocks of Life

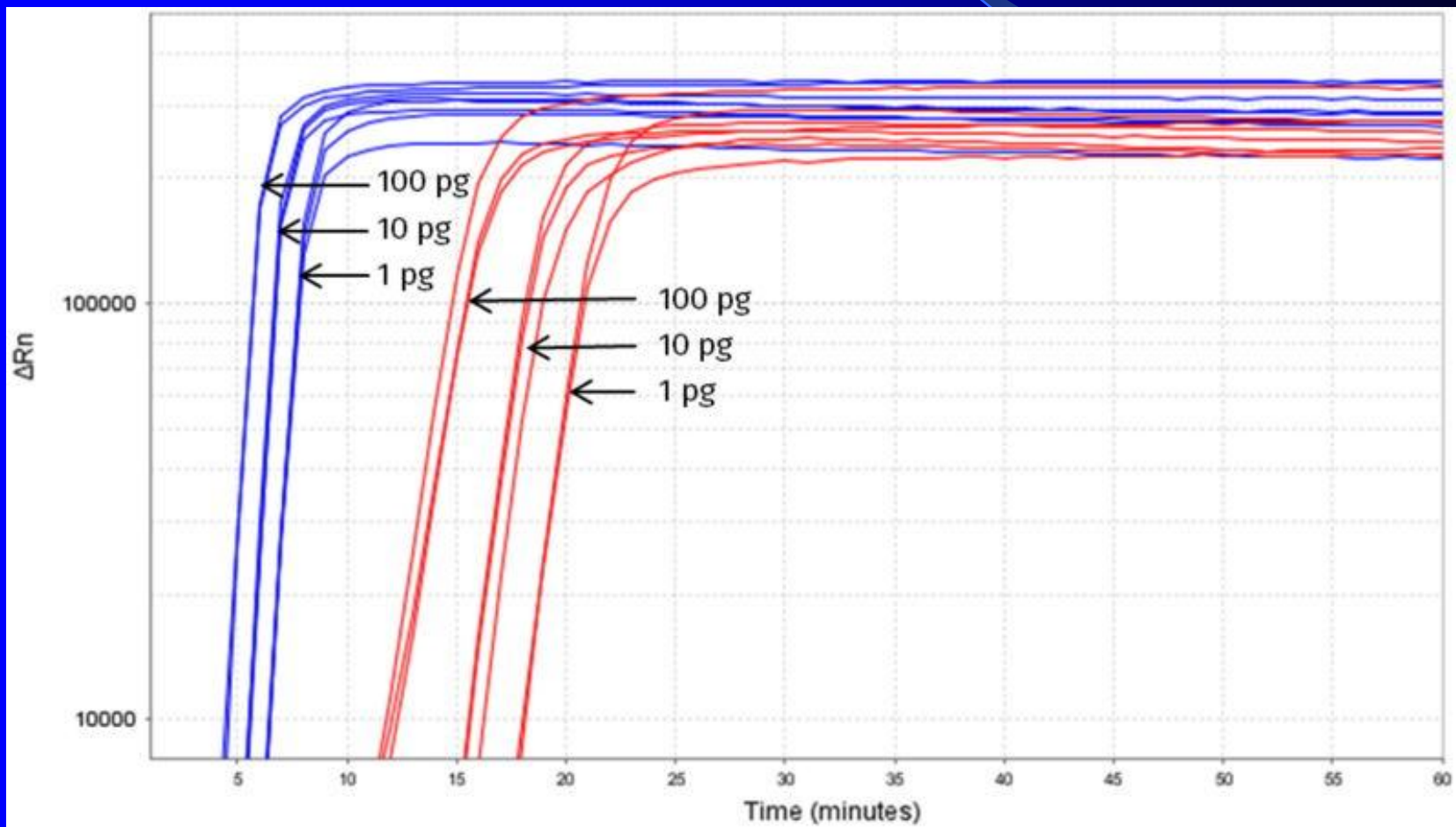
## The racing car among Bst Polymerases

**From zero to hundred  
in no time.**

**Discover the  
amplification speed champion!**



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

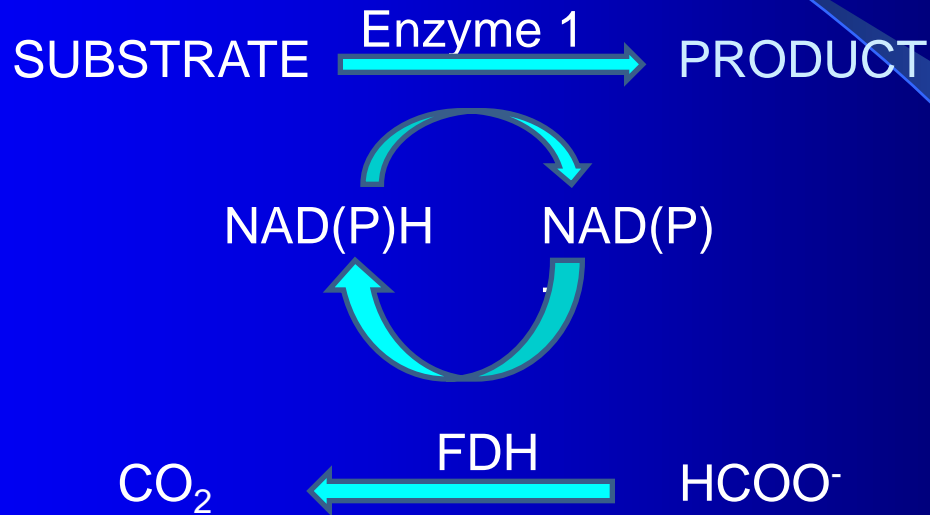




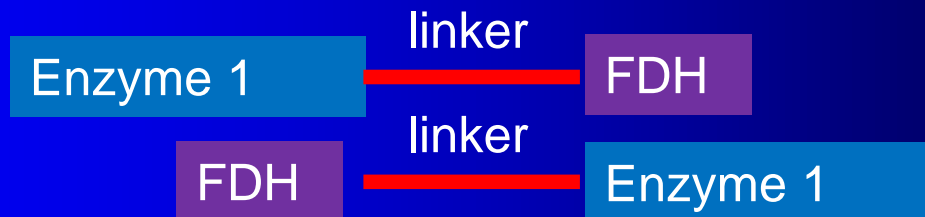
# FUSION ENZYMES



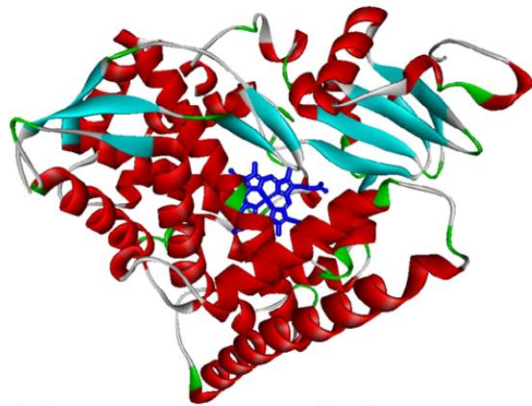
# Scheme of catalysis with NAD(P)H regeneration



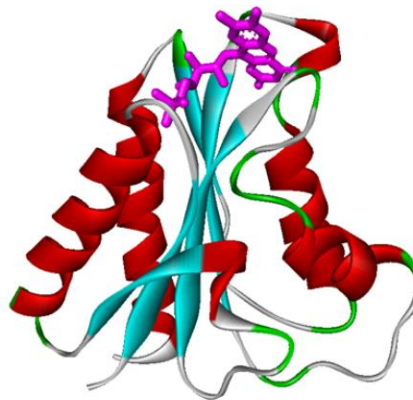
## Possible fusion enzymes



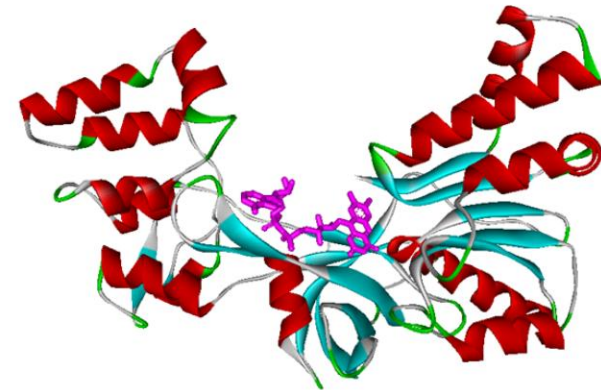
# Cytochrome P450 monooxygenase from *Bacillus megaterium* (P450 BM3)



Heme-containing  
domain



FMN-containing  
domain

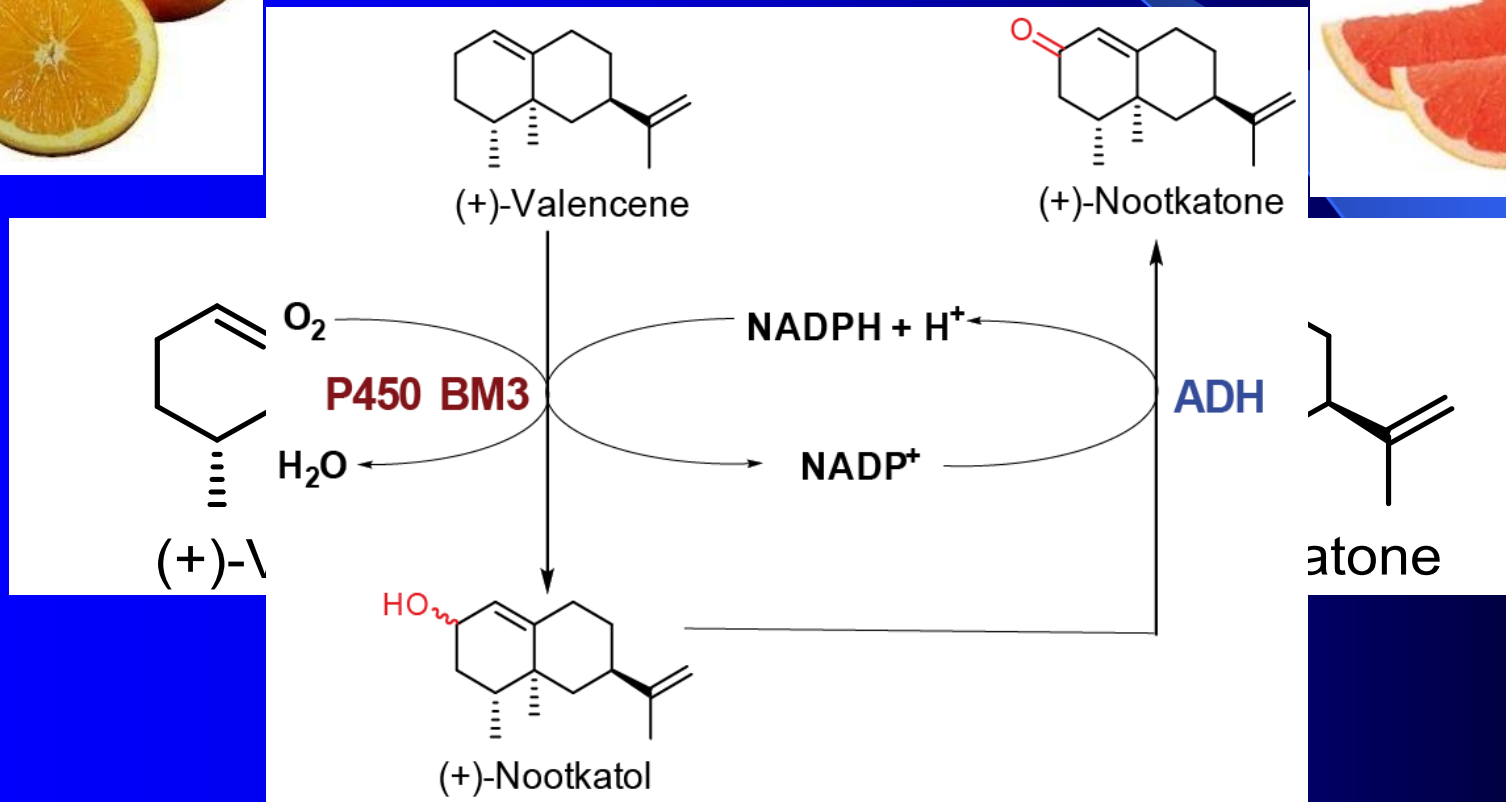
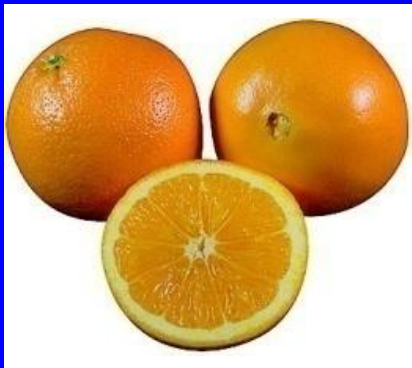


FAD-containing  
domain

Catalytic domain

Reductase domain

# Two-step oxidation of valencene to nootkatone



# 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

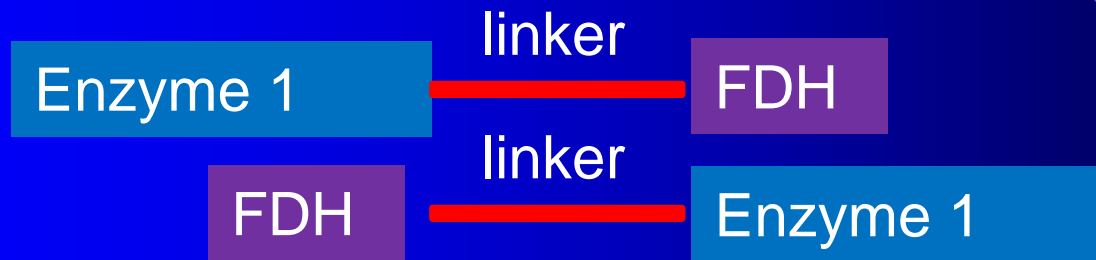
Dimer of two hybrid subunits,  
 $2 \times 1\ 600 = 3\ 200$  aa (at least)





# 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- or C-terminii) for purification

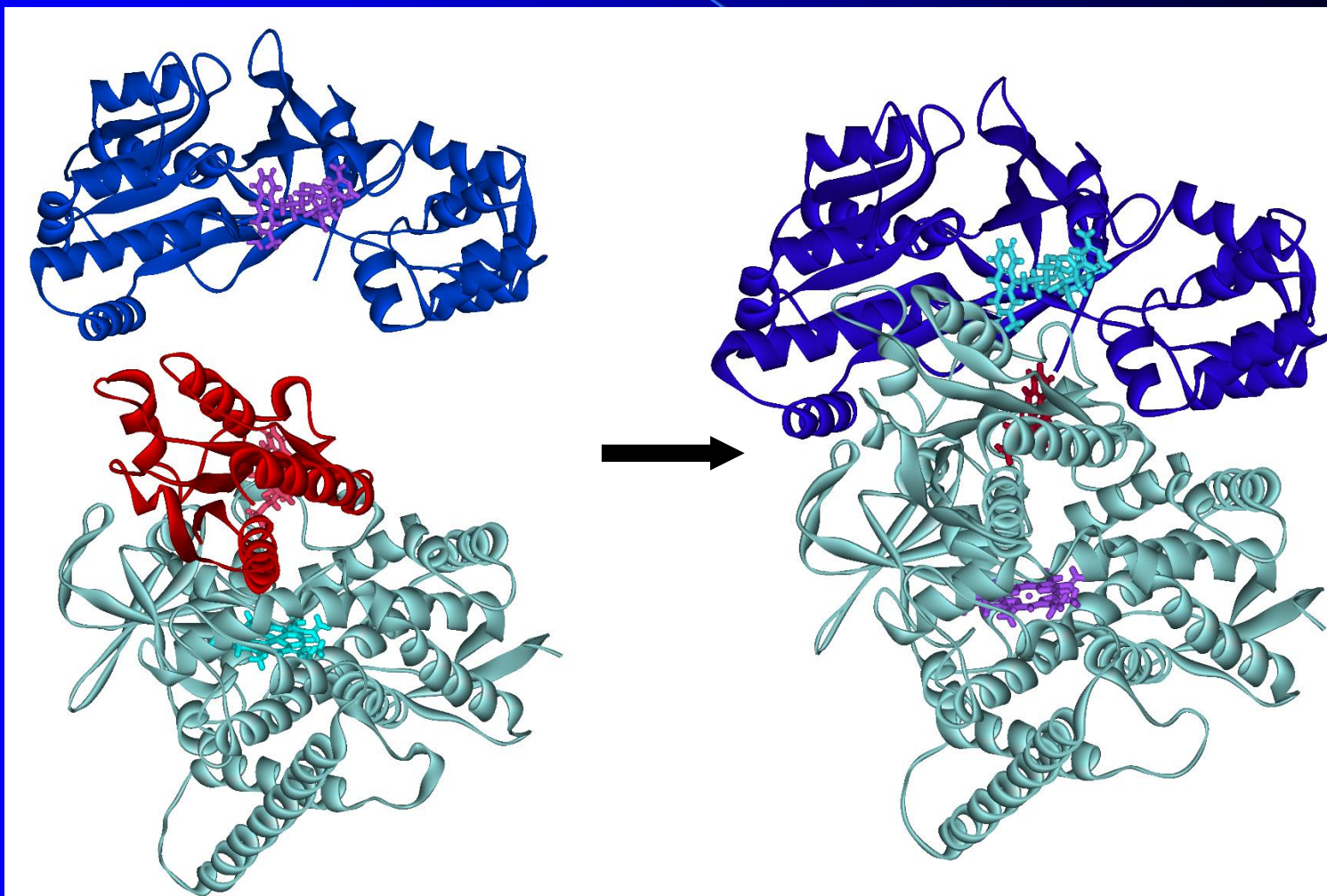


# Modeling full structure P450 BM3

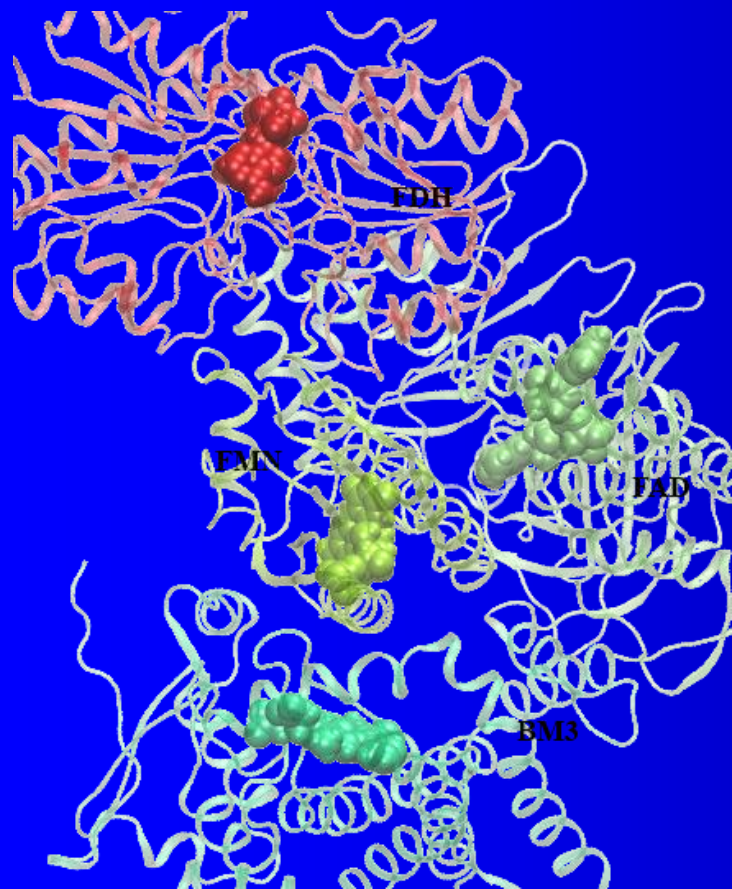
FAD-содержащий домен  
PDB: 4DQK

FMN-содержащий домен

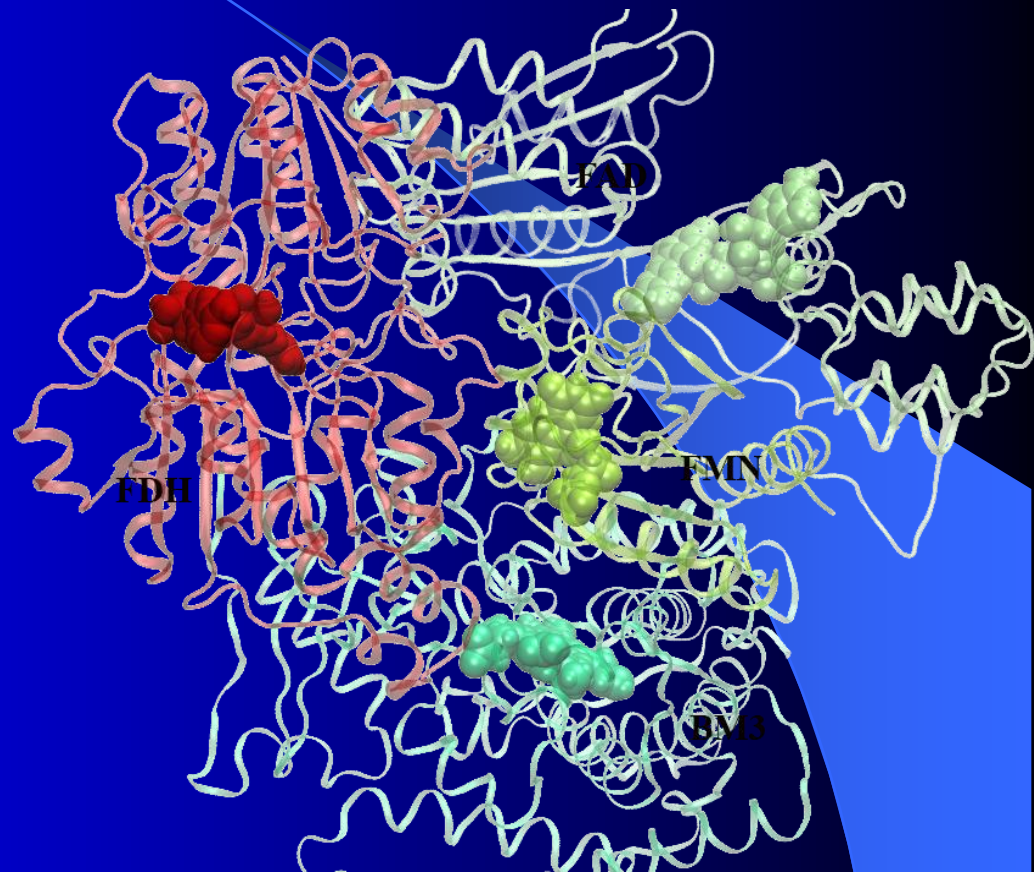
Гем-содержащий домен  
PDB: 1BVY



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



**BM3-FDH**

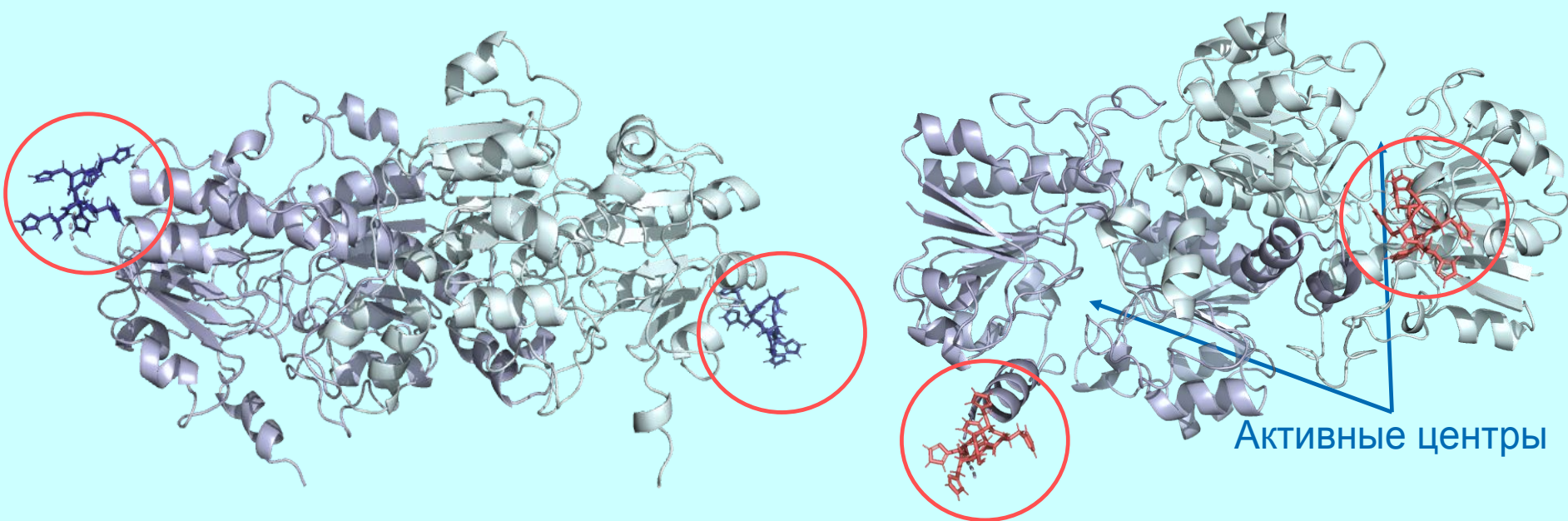


**FDH-BM3**





# Position of His-tag in FDH



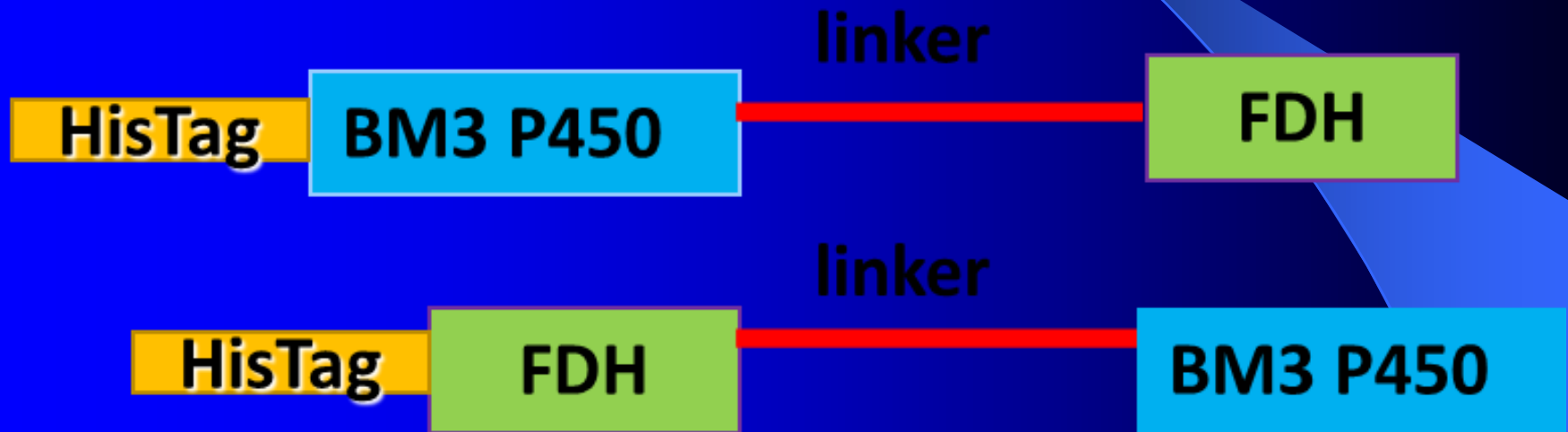
His<sub>6</sub>-PseFDH

PseFDH-His<sub>6</sub>

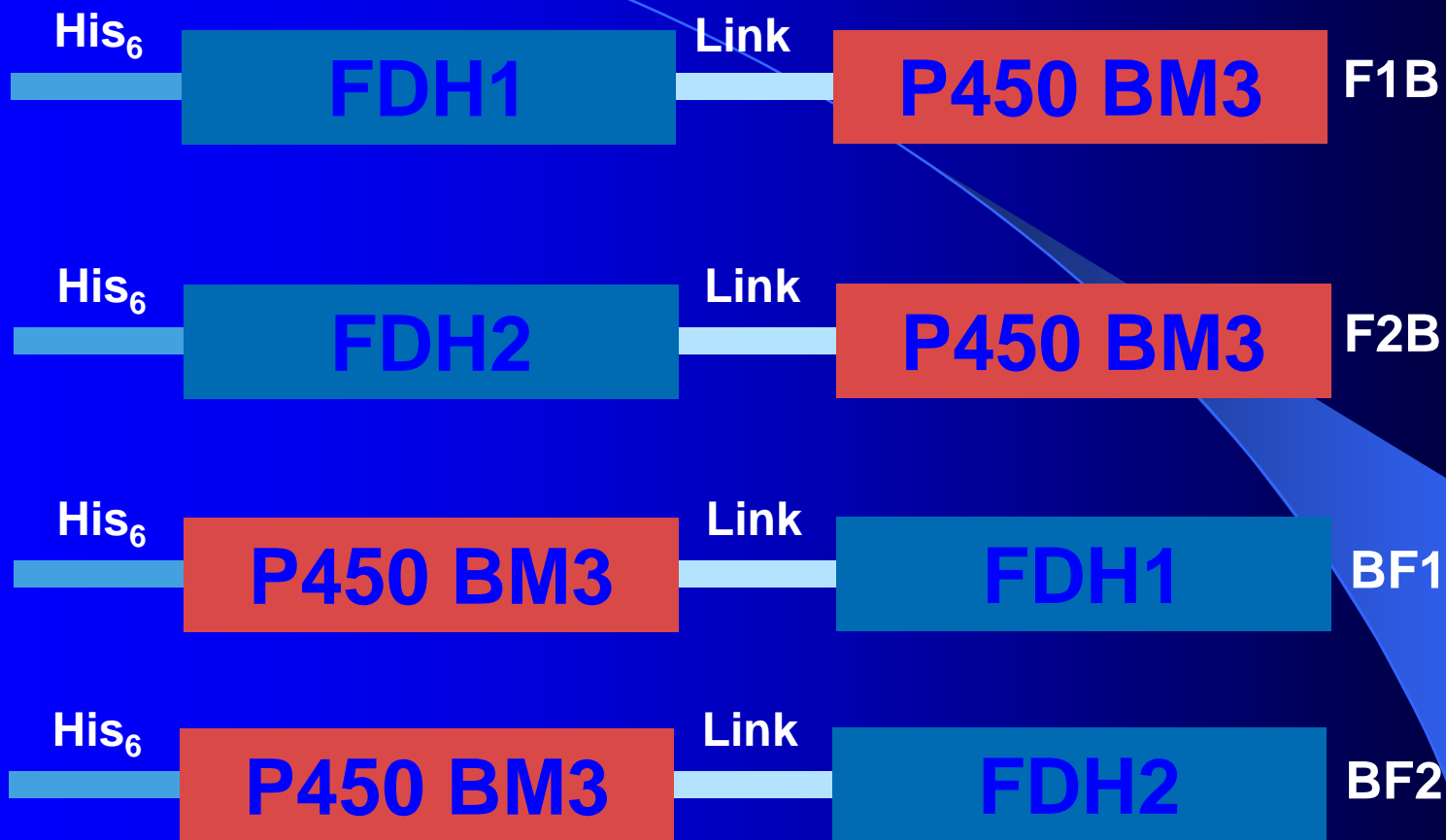
FDH	$k_{cat}$ , c <sup>-1</sup>	$K_M^{NAD^+}$ , мкМ	$K_M^{HCOO^-}$ , мм
OpaFDH	4,5	12,7	2
OpaFDH-His <sub>6</sub>	2,3	83	0,8



# Hybrid molecules prepared with FDH and BM3 P450



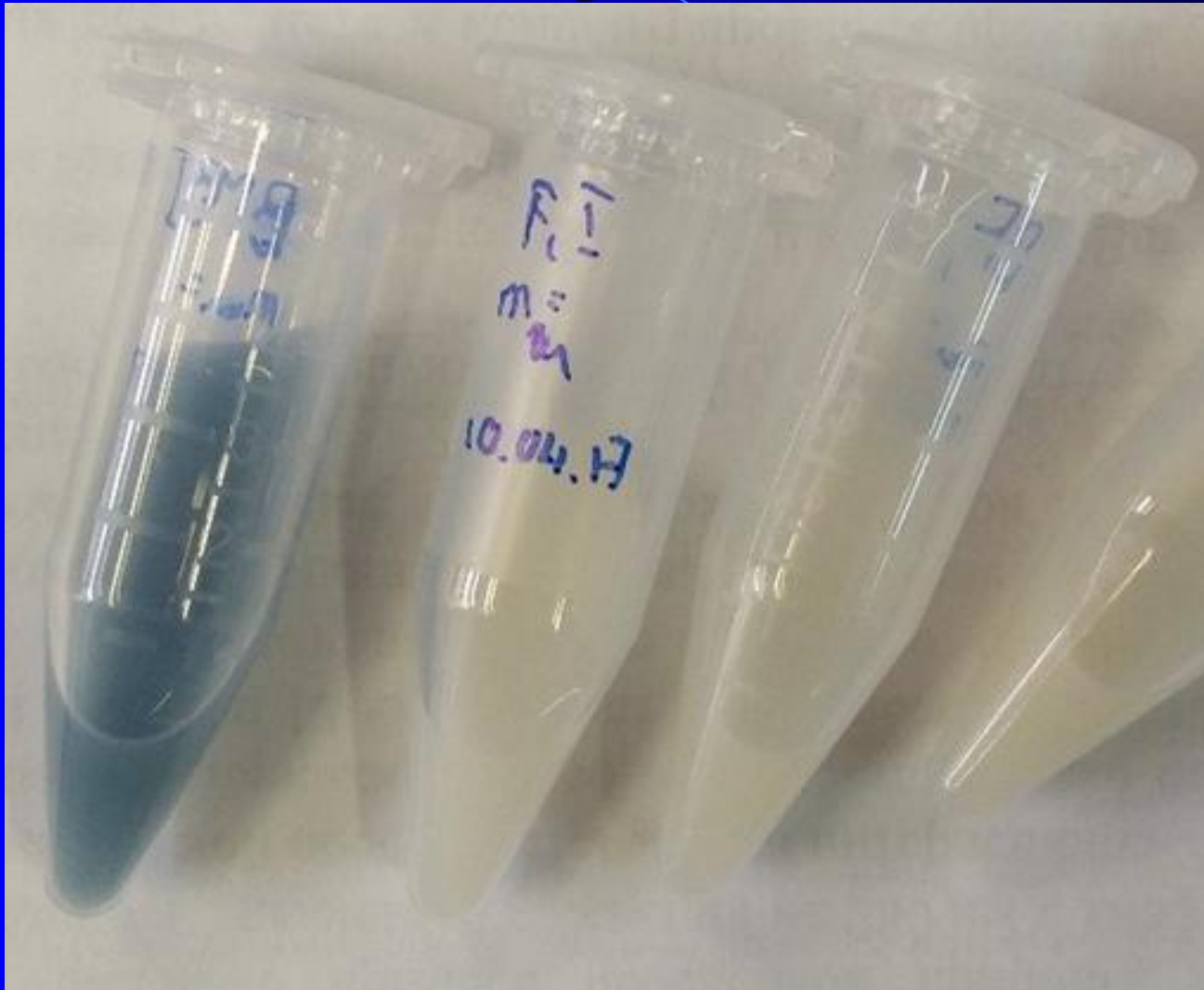




- FDH1 - PseFDH SM4 D221Q
- FDH2 - PseFDH D221Q
- Link - linker SGGGGS



# Expression of free enzymes and hybrids

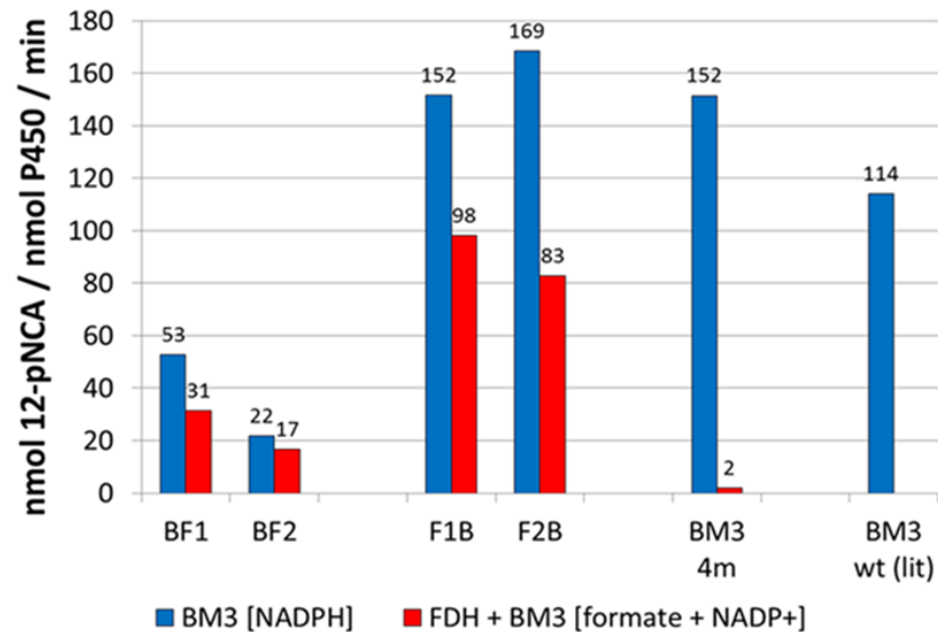
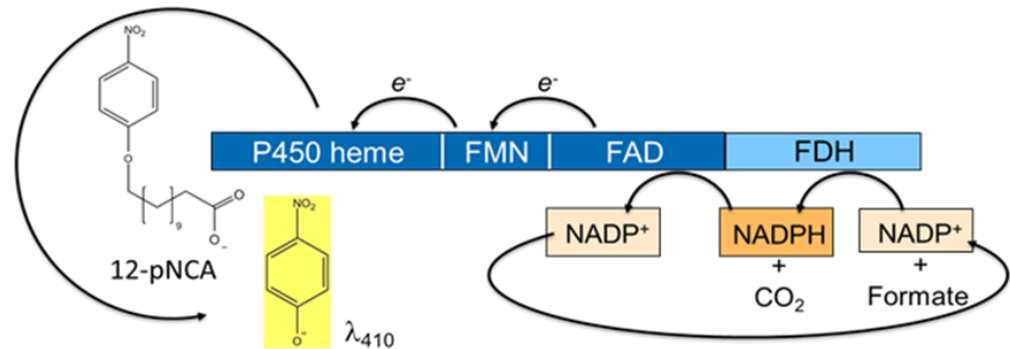


P450 BM3<sup>(4m)</sup> A74G/F87V/L188G/R471C

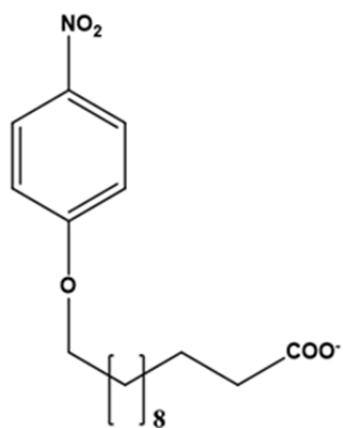
FDH-1 (1m) NADP<sup>+</sup> D222Q

**F1B** FDH-1 ASGGGGG P450 BM3

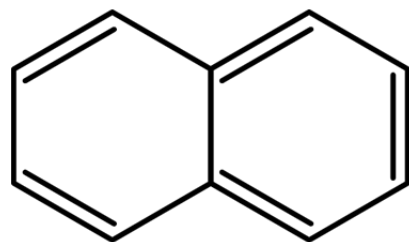
**BF1** P450 BM3 ASGGGGG FDH-1



# Tested substrates of P450 BM3



**12-pNCA**



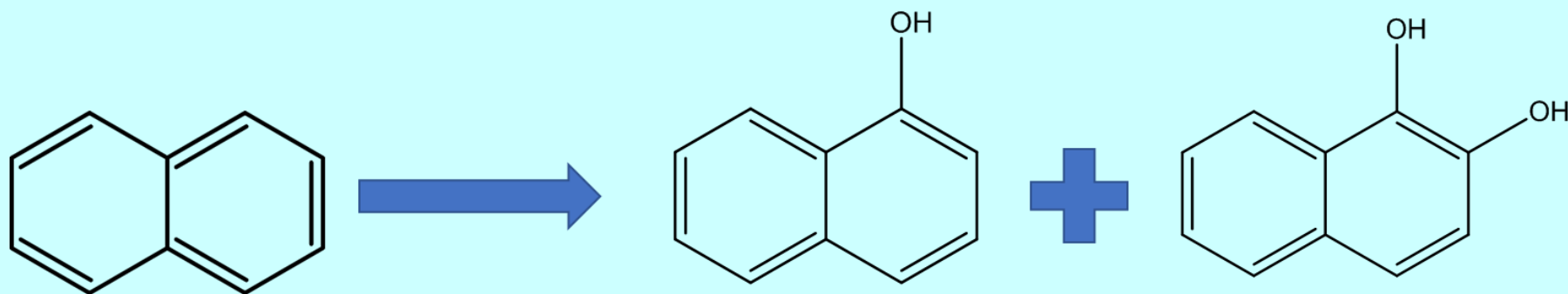
**Naphtalene**



**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	$70 \pm 5$
F1-BM3	$0,54 \pm 0,05$	3,5	$13 \pm 2$
F2-BM3	$0,88 \pm 0,04$	5,7	$8 \pm 1$

0,05M NaPB pH 7,5, 0,3 mM naphthalenea, 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

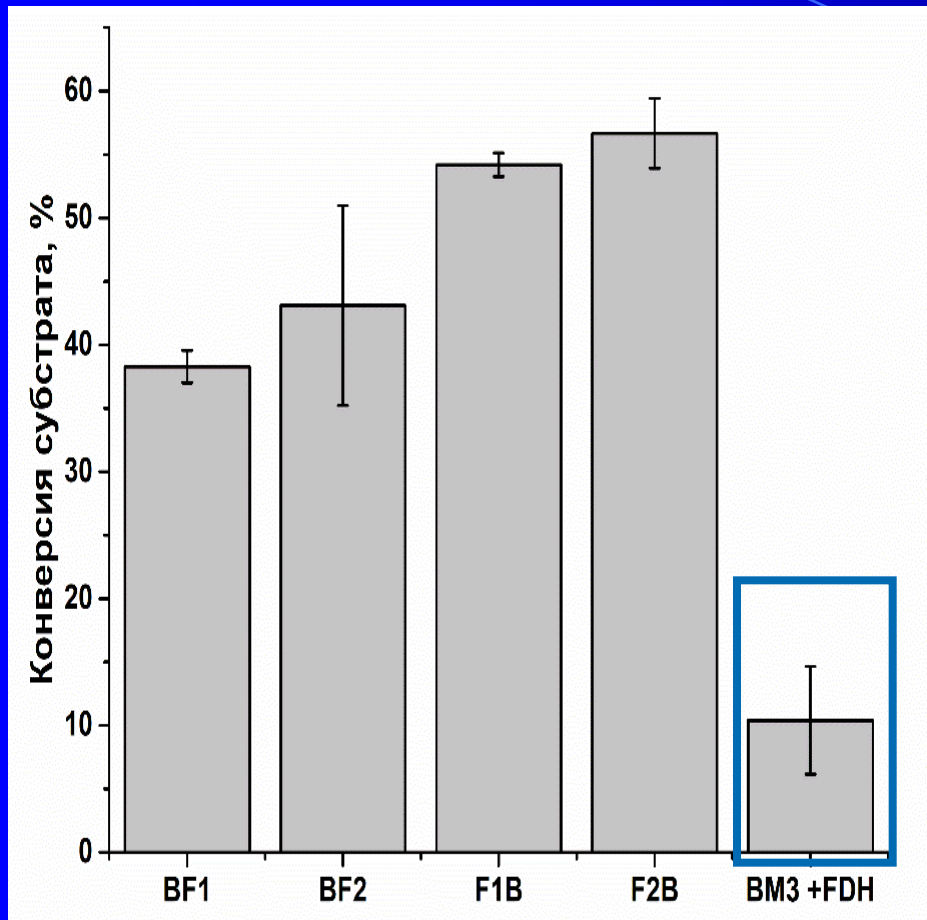
Enzyme	A, U/ml	$A_{\text{fusion}}/A_{\text{BM3}}$	Conversion, %
BM3	$0,39 \pm 0,02$	1	$3,0 \pm 0,5$
F1-BM3	$0,87 \pm 0,02$	2,2	$34 \pm 2$
F2-BM3	$1,03 \pm 0,03$	2,6	$49 \pm 2$

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<sup>+</sup> 1,5 M HCOON
- 10 minutes
- Room temperature
- 200 μM 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

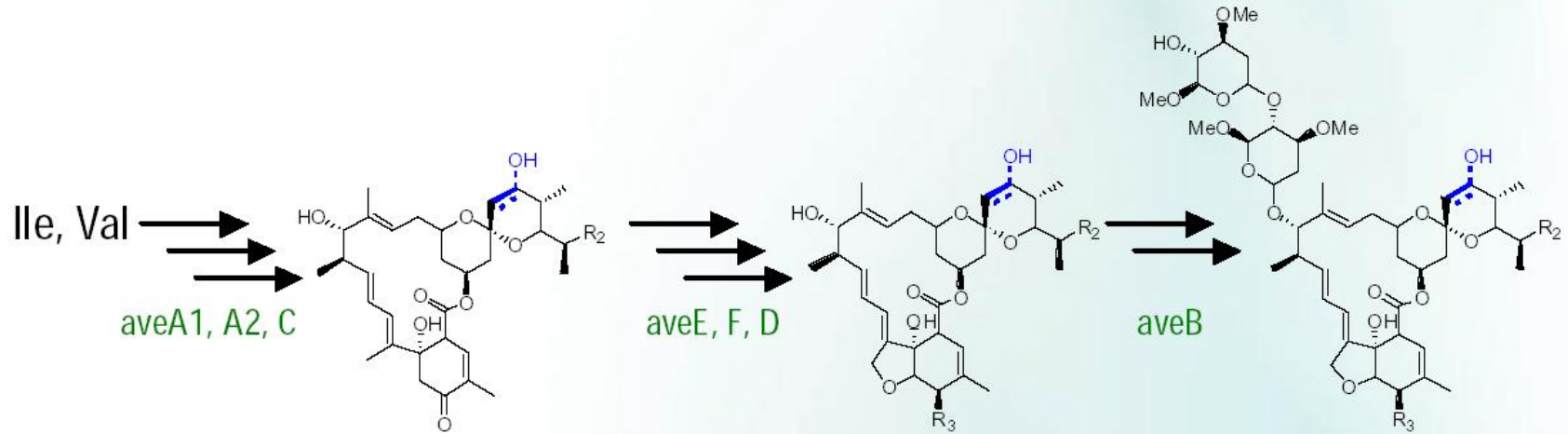
# Клетки – создание «идеального биокатализатора»

- 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<sub>2</sub> (a/b)

Nature of R<sub>3</sub> (A/B)

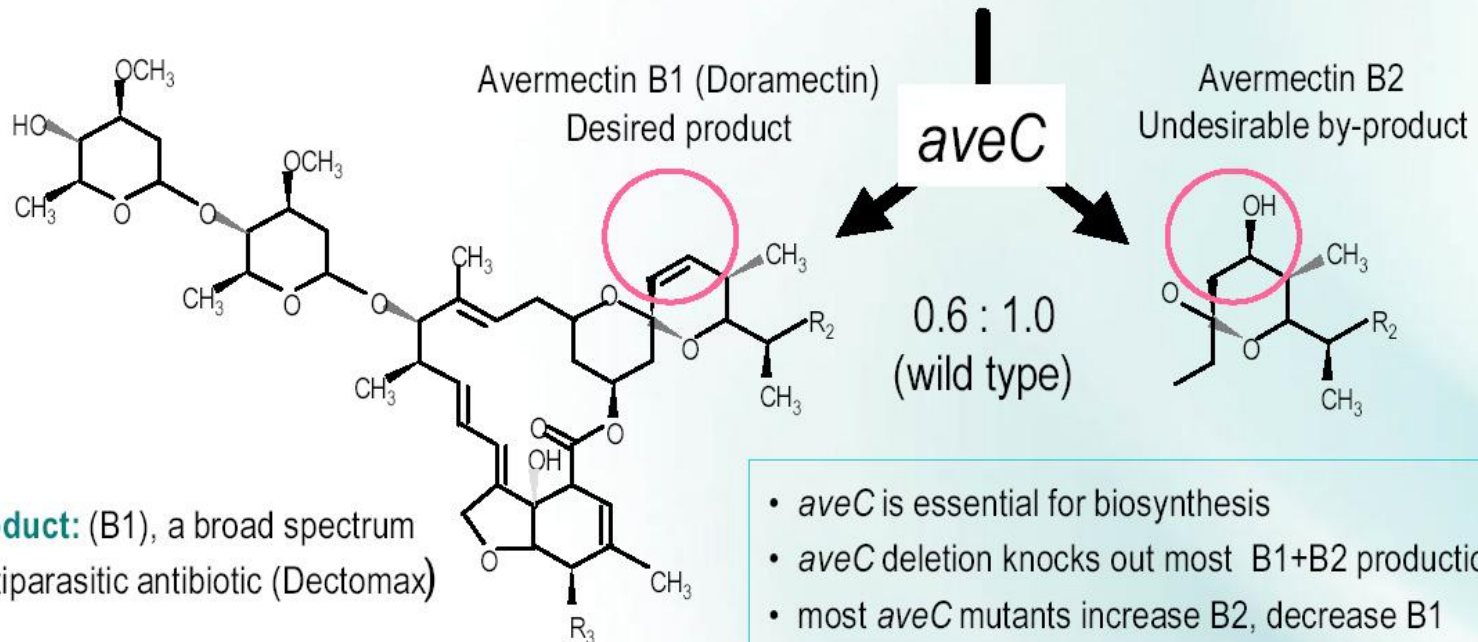
Avermectin B1 is the desired product for commercial applications.



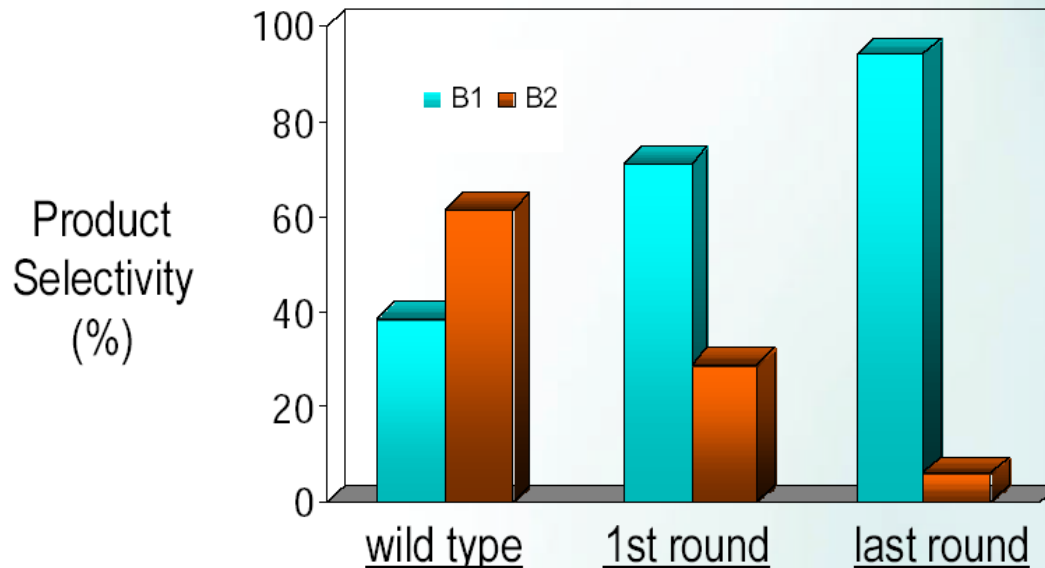
# Doramectin Fermentation:



Mixture of Avermectins produced  
by *Streptomyces avermitilis*



# Improved Doramectin Fermentation by Shuffling of a Biosynthetic Pathway Gene



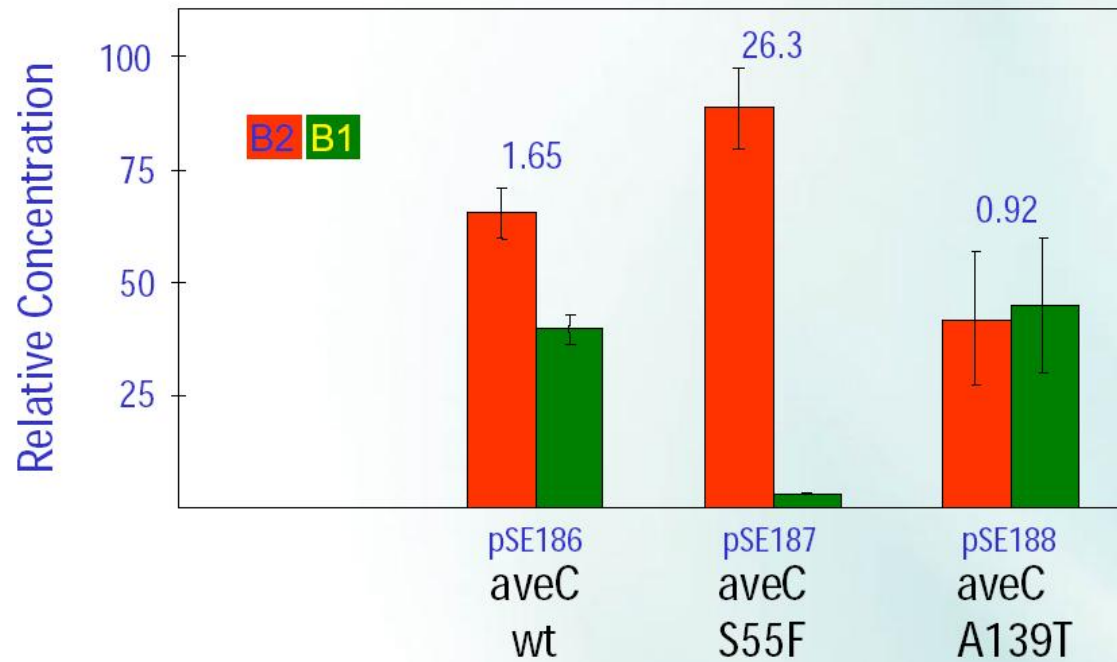
B1 : B2 Ratio: 0.6 : 1      2.5 : 1      >15 : 1

Commercial Status: Original Process    Commercialized    In Development

Rel. Yield vs. WT: 1      1.4      TBD

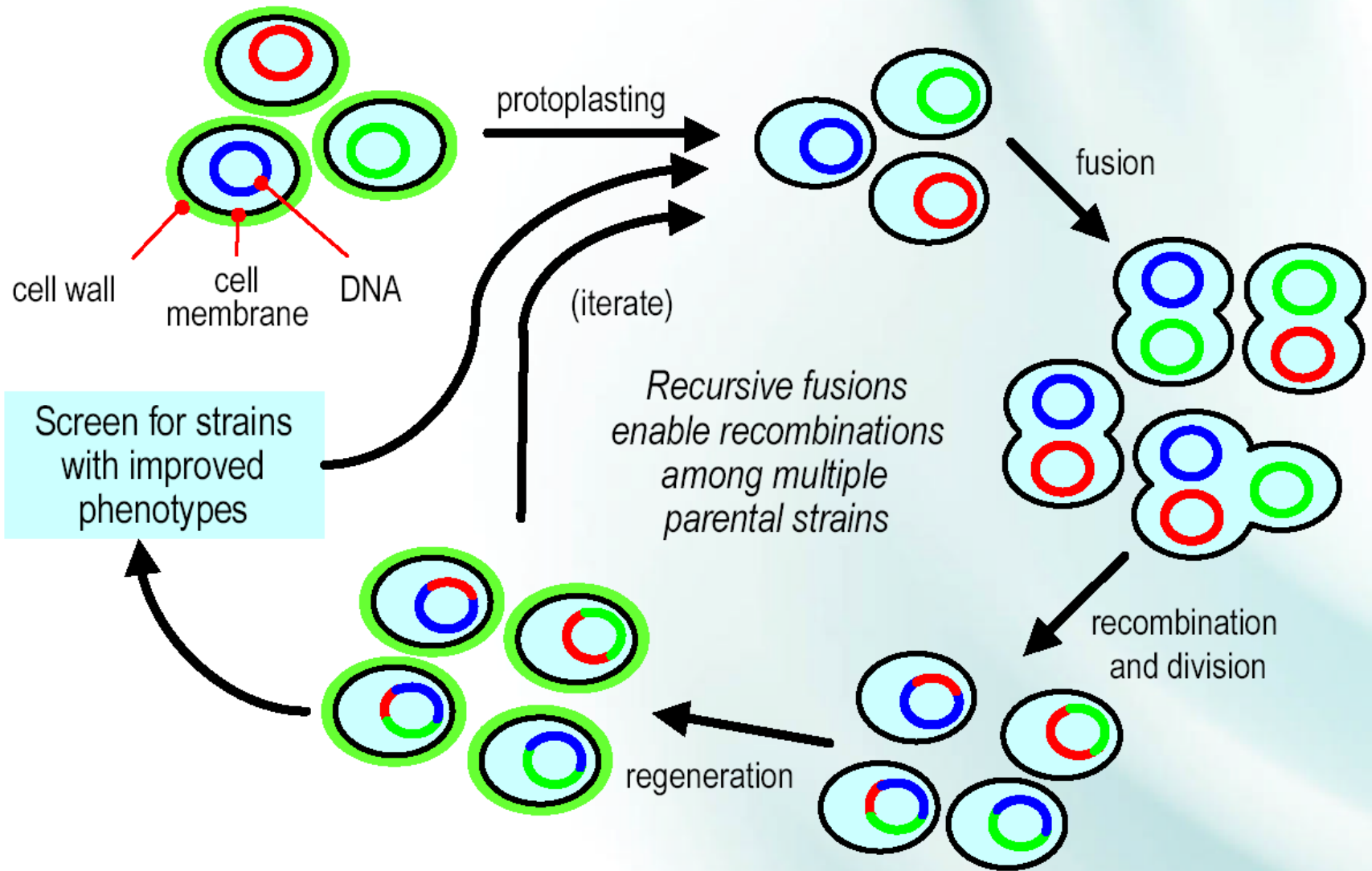
*...leads to greatly simplified product isolation*

## Mutations in aveC can influence B1:B2 ratio

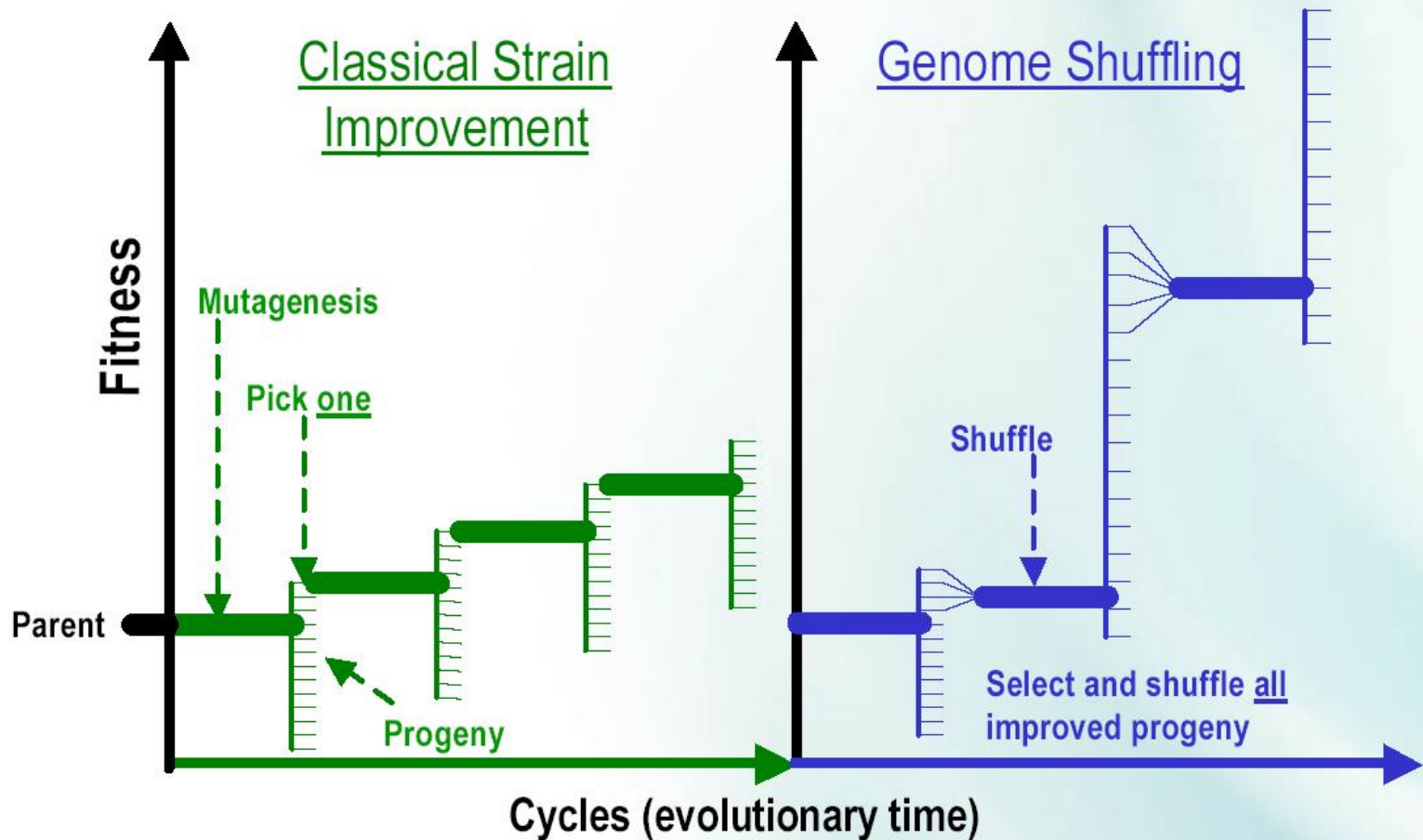


Stutzman-Engwall et al.,  
Biotechnol. Bioeng. (2003) 82:359

# Efficient Protoplast Fusion for Shuffling of Genomes

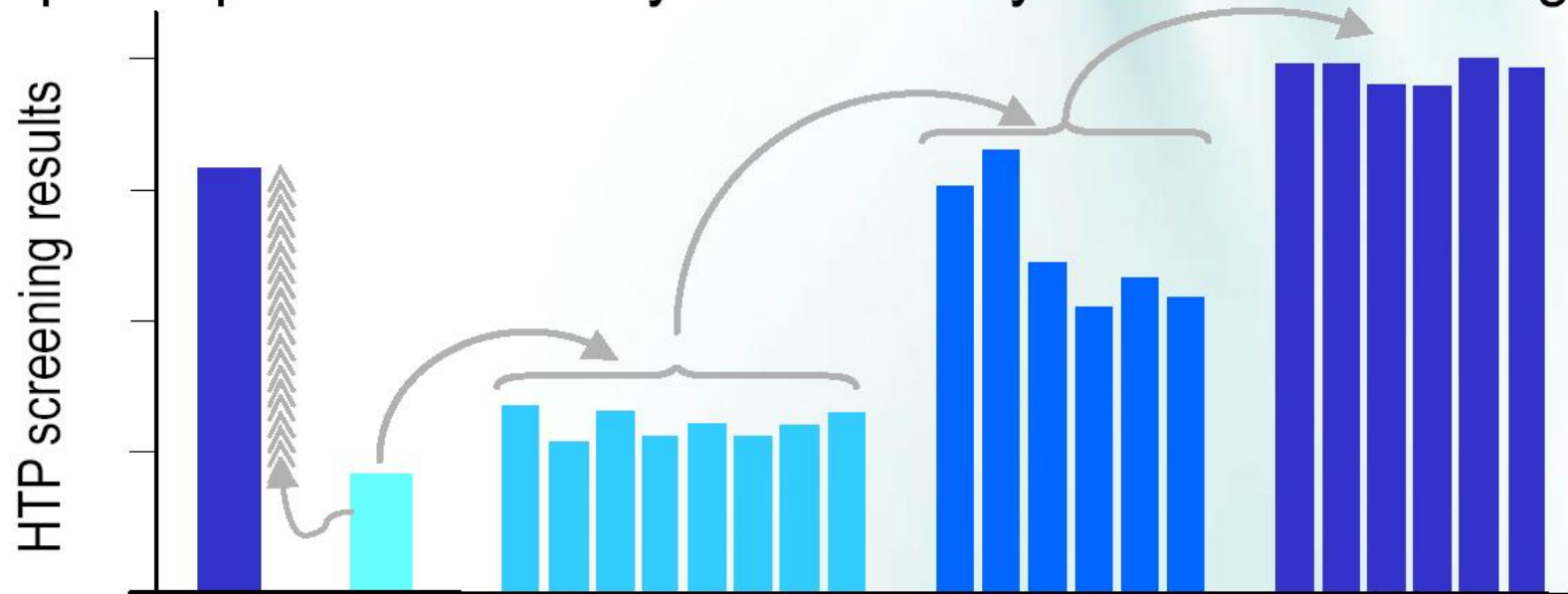



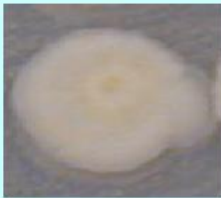
# The Rationale behind Genome Shuffling





# Rapid Improvement of Tylosin Titer by Genome Shuffling



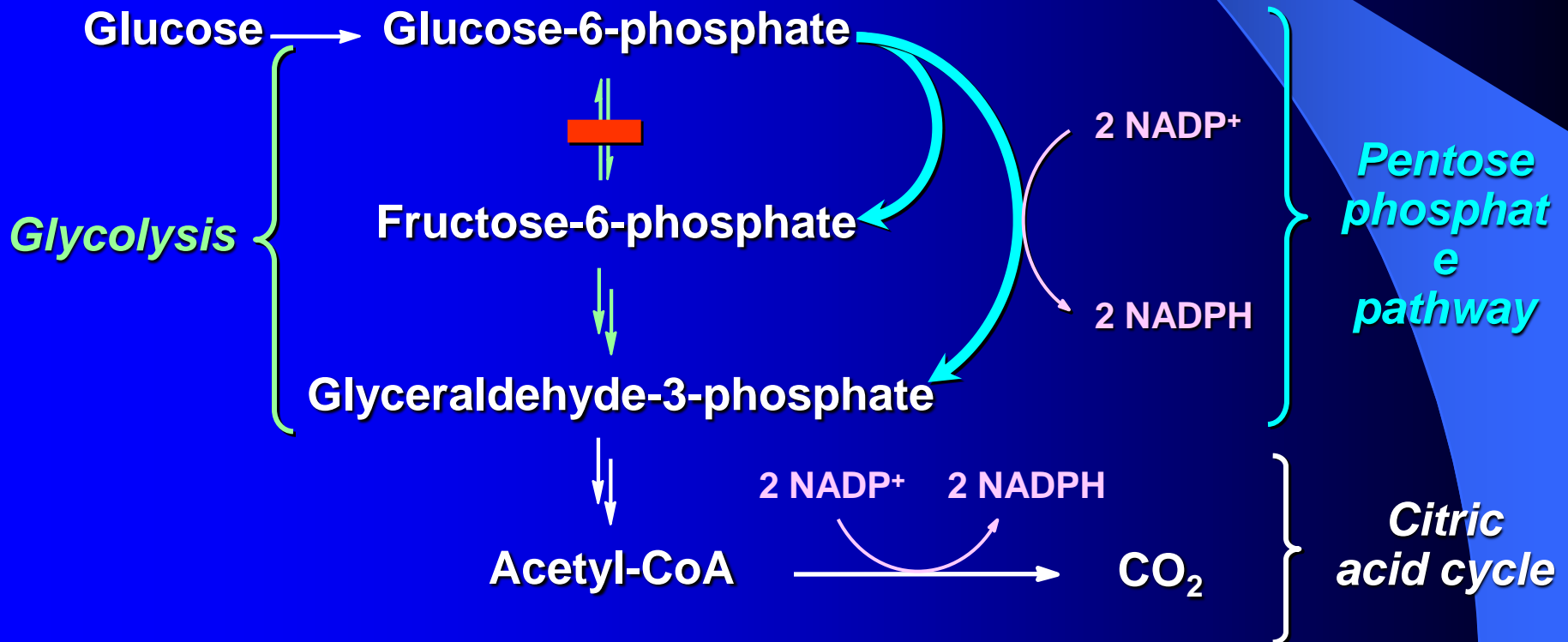
	Prod'n Strain	Original Strain	Classic Mutagenesis	1 <sup>st</sup> Round Genome Shuffle	2 <sup>nd</sup> Round Genome Shuffle
Rel. g/L	6.2 ± 2.4	1 ± 0.2			8.1 ± 1.2
Dev. Time	> 20 years		————— 1 year —————▶		
# screened	~10 <sup>6</sup>		22,000	1,000	1,000
Colony Morphology					

# 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 –  $\text{CO}_2$  – 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 М (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!!!**



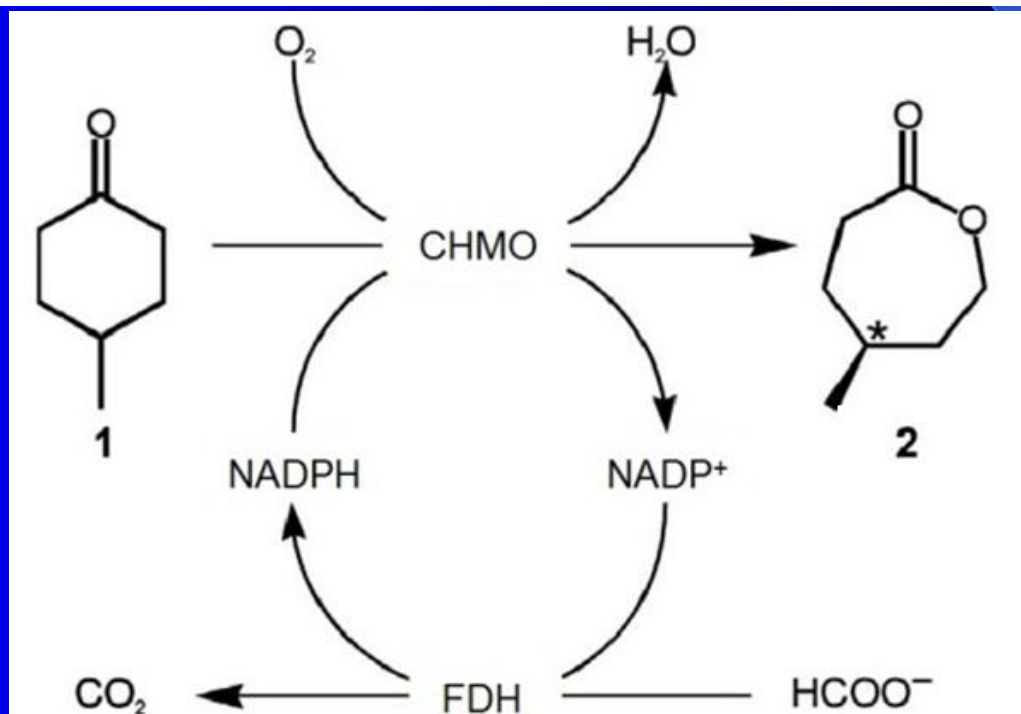
## Synthesis of chiral $\epsilon$ -lactones in a two-enzyme system of cyclohexanone mono-oxygenase and formate dehydrogenase with integrated bubble-free aeration <sup>†</sup>

Sebastian Rissom,<sup>a</sup> Ulrich Schwarz-Linek,<sup>b</sup> Marina Vogel,<sup>b</sup> Vladimir I. Tishkov<sup>c,‡</sup> and Udo Kragl<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut für Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich GmbH, D-52425 Jülich, Germany

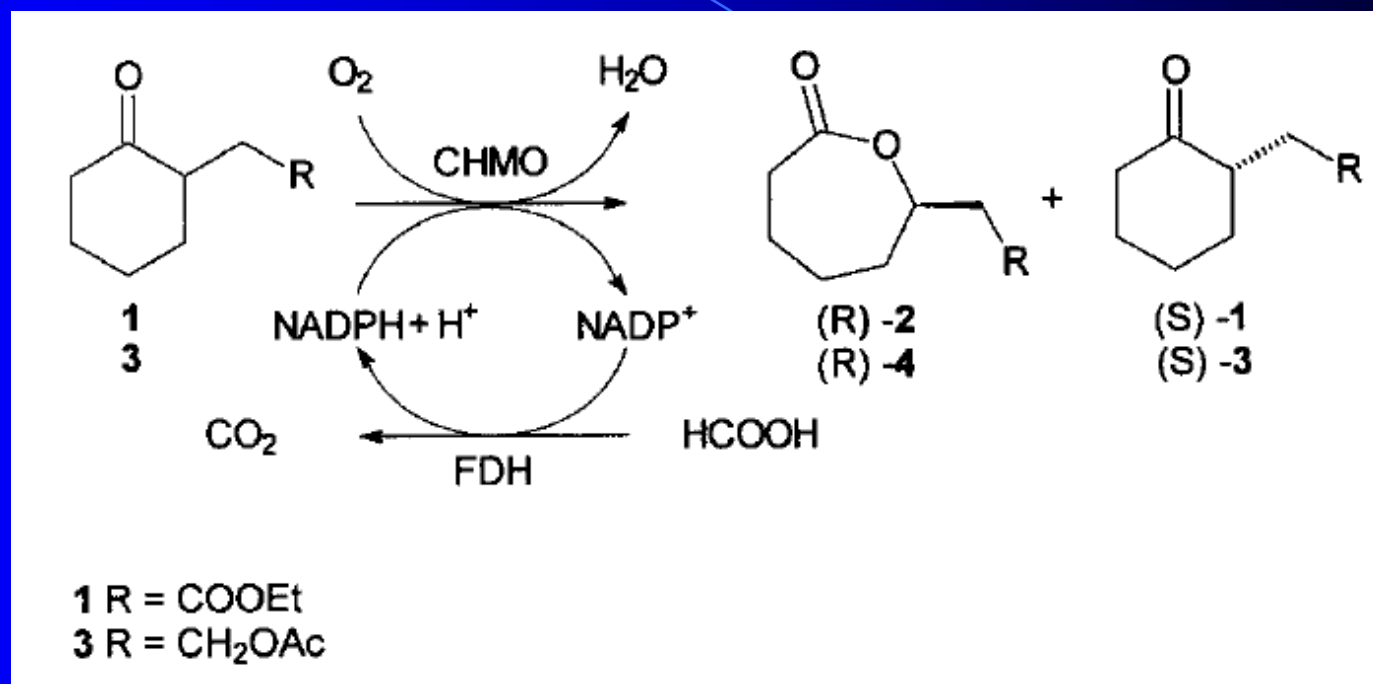
<sup>b</sup> Institut für Organische Chemie, Universität Leipzig, Talstraße 35, D-04103 Leipzig, Germany

<sup>c</sup> Department of Chemical Enzymology, M. V. Lomonosov Moscow State University, RUS-119899 Moscow, Russia



# Synthesis of Natural Product Precursors by Baeyer–Villiger Oxidation with Cyclohexanone Monooxygenase from *Acinetobacter*

Ulrich Schwarz-Linek,<sup>1a,a</sup> Andreas Krödel,<sup>a</sup> Friedrich-Alexander Ludwig,<sup>a</sup> Alexander Schulze,<sup>a</sup> Sebastian Rissom,<sup>b</sup> Udo Kragl,<sup>1b,b</sup> Vladimir I. Tishkov,<sup>c</sup> Marina Vogel\*<sup>a</sup>



Lactone	Yield <sup>b</sup> (%)	ee <sup>b</sup> (%)	Configuration
2	39	>99	<i>R</i> <sup>d</sup>
4	34	>99	<i>R</i> <sup>c</sup>

Synthesis, 2001, v.33, N6, p.947-951

