

PROTEİN YAPISI ve MÜHENDİSLİĞİ

Ders 3: Protein Mühendisliği Yöntemleri
Yönlendirilmiş Evrim (Non-Rational Dizayn) ve Yarı-Rasyonel DİZayn

Yıldız Teknik Üniversitesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
2013

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

Protein mühendisliği 3 temel strateji ile gerçekleştirilmektedir.

1.Rasyonel Dizayn

2.Yönlendirilmiş Evrim (Non-Rational Dizayn)

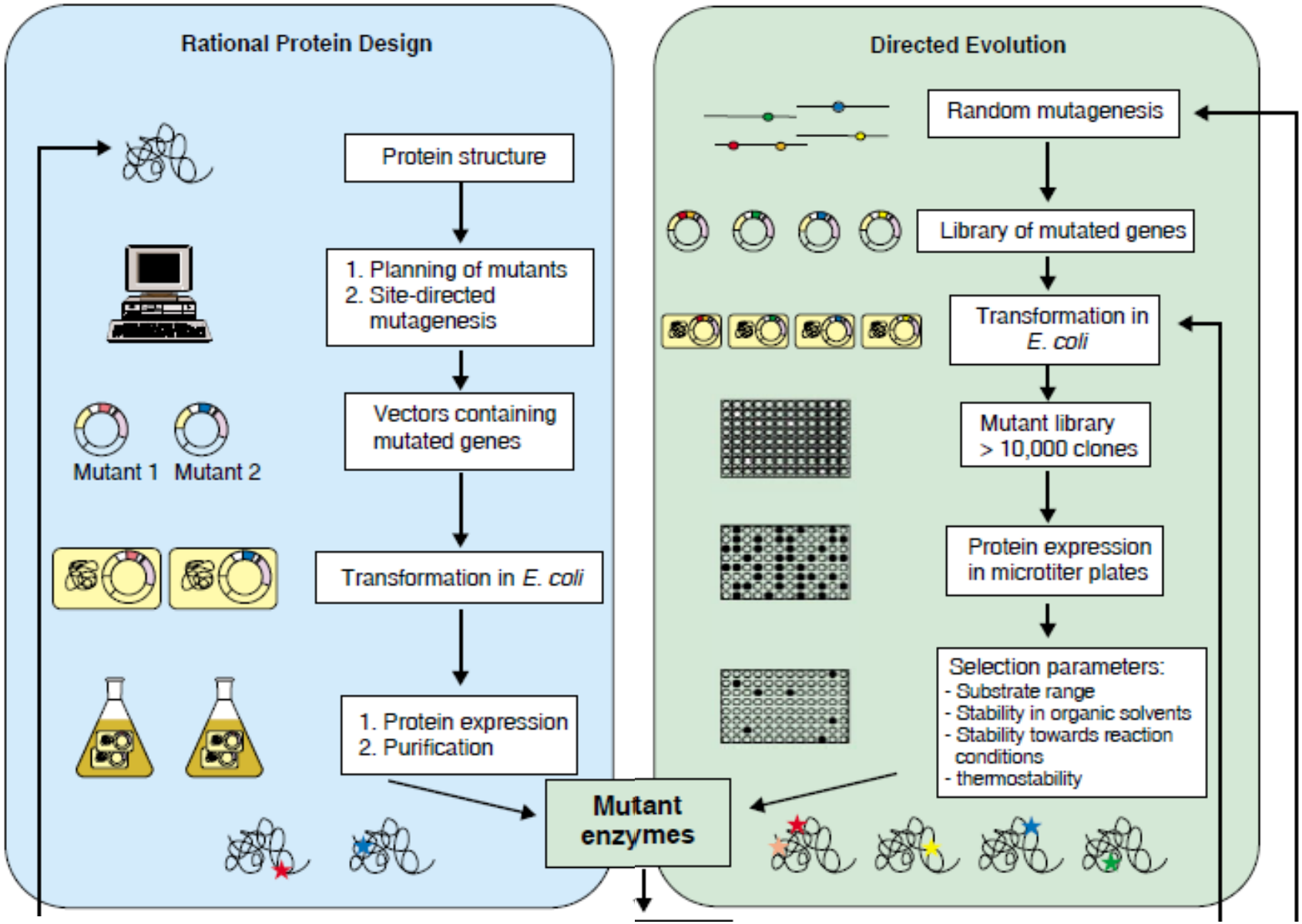
3.Yarı Rasyonel Dizayn

Kütüphane Tabanlı Yöntemler / Random Mutagenesis

Kütüphane Tabanlı Yöntemler
"Directed Evolution" /Yönlendirilmiş Evrim (Non-Rational Dizayn)

Random mutagenesis ya da directed evolution rasyonel dizayndan farklı olarak amino dizisi, protein yapı ve fonksiyonu ile ilgili hiç bir bilgi gerektirmez.

Bu teknik milyonlarca yıl ile tariff edeilebilecek evrim zaman skalasını yıllar, aylar ya da haftalara indirgeyerek laboratuar ortamında in vitro da doğal evrimi taklit eder.


Rational Protein Design
Protein structure
1. Planning of mutants
2. Site-directed mutagenesis
Vectors containing mutated genes
Mutant 1
Mutant 2
Transformation in E. coli
1. Protein expression
2. Purification
Mutant enzymes
Directed Evolution
Random mutagenesis
Library of mutated genes
Transformation in E. coli
Mutant library > 10,000 clones
Protein expression in microtiter plates
Selection parameters:
- Substrate range
- Stability in organic solvents
- Stability towards reaction conditions
- thermostability

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

Yönlendirilmiş evrim 1980lerden beri çeşitli enzimlerin farklı özelliklerini değiştirmek ya da geliştirmek için kullanılmaktadır. Asıl etkili bir teknik haline gelmesi ise Arnold and Stemmer'in 1990larda bu tekniği geliştirmesi ile olmuştur.

Günümüzde uygulanan farklı yönlendirilmiş evrim metodlarına baktığımızda bunları 2 temel grup altında inceleyebiliriz:

Rekombinatif olmayan metodlar-Genlerin rastgele mutasyonu

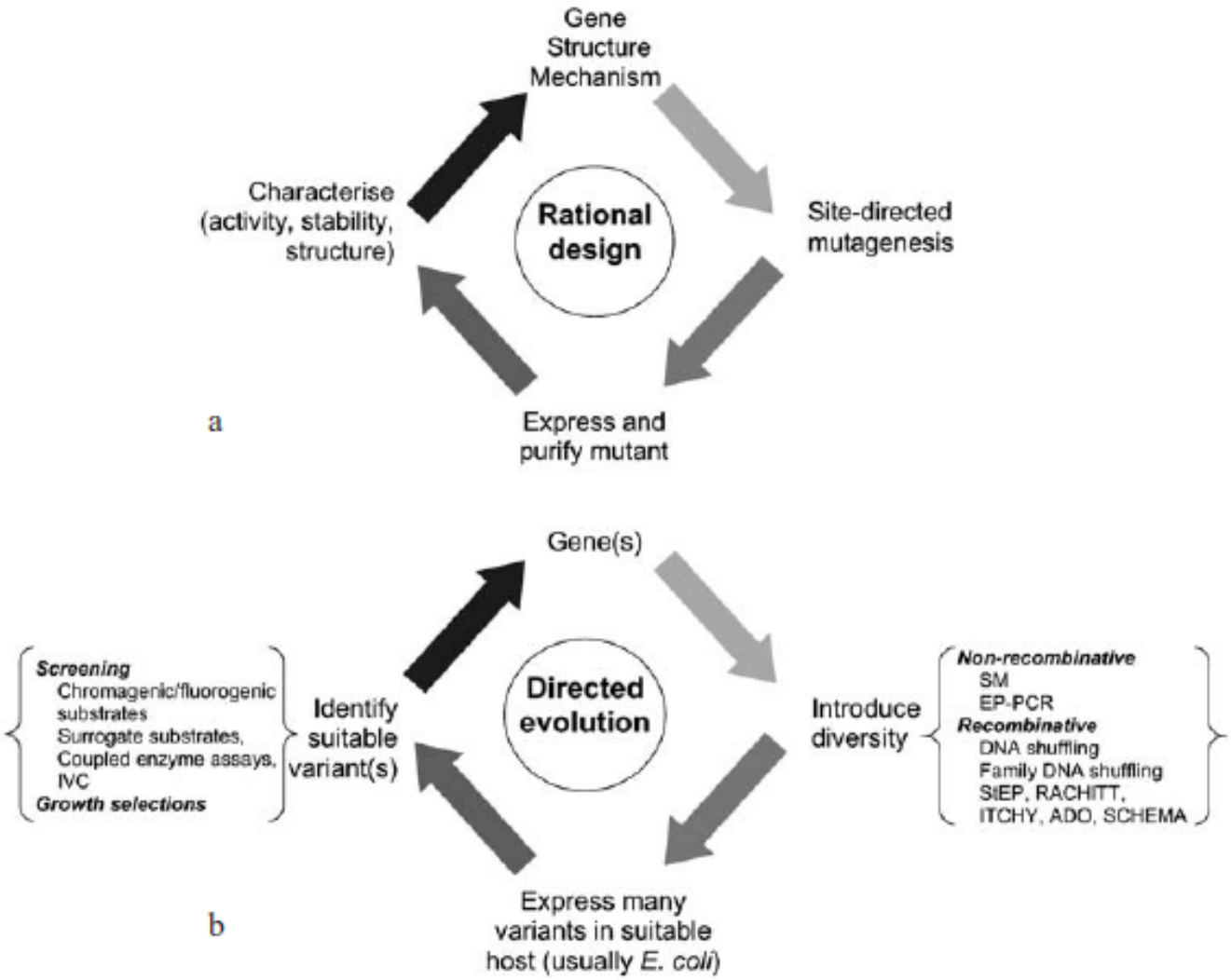
SM, Error Prone PCR

Rekombinatif Metodlar- farklı kaynaklardan homolog enzimlerin gen fragmentlerinin rekombinasyonu

DNA Shuffling, Family DNA Shuffling, StEP, RACHITT, ITCHY, ADO, SCHEMA

Aynı atadan evrimleşmiş homolog enzimleri kodlayan genlerin rekombinasyonu önemli bi rçeşitlilik ve yüksek oranda yeni ve fonksiyonel enzimin elde edilmesini sağlamaktadır.

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim



Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

Yönlendirilmiş evrim 2 temel adım gerektirir.

1. Random genetik kütüphanelerin kurulması,
2. Artmış katalitik aktivite, seçicilik ya da geliştirilmiş stabilite gibi hedeflenen özelliğe sahip enzim varyasyonlarının kütüphane içinden taranması ve seçilmesi.

Her iki adım için de doğru stratejinin seçilmesi hedeflenen amaca ulaşmak için kritik öneme sahiptir.

Oldukça geniş olan mutant kütüphanelerinden hedef protein seçmek için *high-throughput solid phase digital imaging, phage display, ribosome display, yeast-two hybride system* gibi etkili bir tarama metodu yönlendirilmiş evrimin başarılı olması için en önemli gerekliliktir.

Geniş bir kütüphaneden tarama ve seçme yapılması araştırıcının çok vaktini alması bu metodun dezavantajını oluşturmaktadır. Bu nedenle genellikle hedef enzimi geniş kütüphanelerden taramak ve seçmek için robotic sistemler kullanılır.

Bir kütüphaneden 10^3-10^4 varyasyonun taramanın güvenli bir seleksiyon için yeterli Kabul edilmektedir.

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

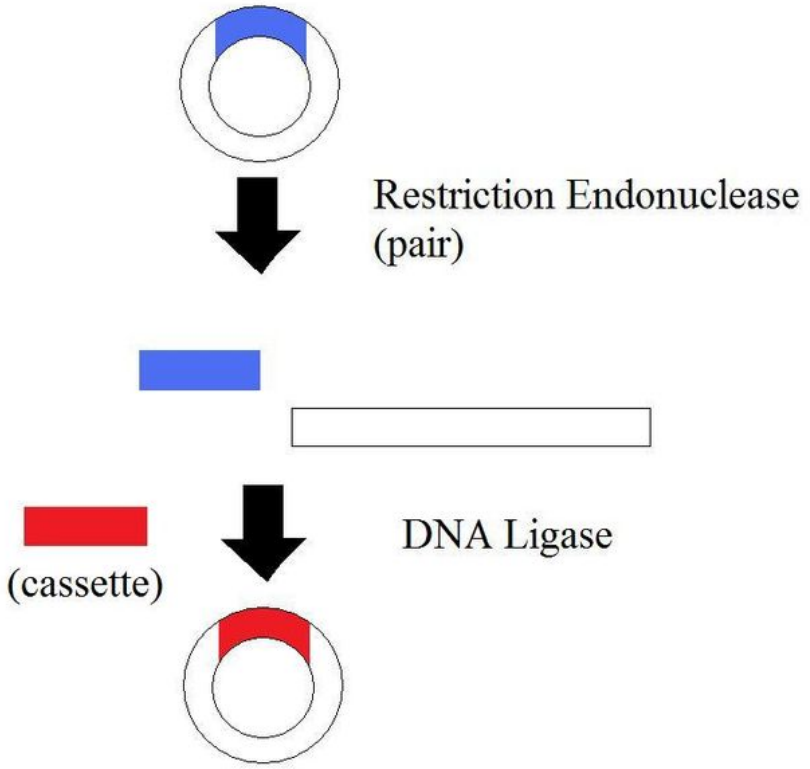
Rekombinatif olmayan metodlar

Rekombinatif olmayan metodlarda gen değişikliliği /çeşitliliği nokta mutasyonlar aracılığı ile gerçekleştirir.

Tek bir amino asidin doğrudan değiştirilmesi,

Birden daha fazla amino asidin eklenmesi ya da çıkarılması (casette mutagenesis) ve

Ttüm gene rastgele mutasyon uygulanmasını içerir.



casette mutagenesis

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

Gerçekleştirilmek istenilen mutasyonun genişliğine bağlı olarak çeşitli teknikler mevcuttur.

Hedef proteinin yüksek çözünürlükte bir 3 boyutlu yapı bilgisi varsa substratya da inhibitör bağlanma bölgeleri biliniyorsa, substrat ile bağlantılı olan residular tanımlanır ve

bu amino asitlerin geri kalan diğer tüm 21 amino asit ile değiştirilmesi (site **saturation mutagenesis –SM**) genellikle değişmiş substrat spesifitesi ile sonuçlanmaktadır.

SM yönteminde aynı zamanda yapısal bilgiden ve modelllerden yararlanıldığı için Yarı-rasyonel protein mühendisliği yöntemi olarak da geçmektedir ki bu yöntemi bu başlık altında daha sonra göreceğiz.

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

Yönlendirmiş evrim deneyleri genellikle aktif bölgede olmayan mutasyonlar üretir.

Örneğin baska bir yönlendirilmiş evrim metodu olan **EP-PCR** ile *Pseudomonas* lipazının enentio seçiciliği üzerinde yapılan çalışmada seçicilik 1.1 den 26 ya yükseltilmiştir.

Ancak bu değişikliği yapan mutasyonların hiçbiri substrat bağlanma bölgesinde değildir.
Daha sonradan bu mutantlarım modelleri yapıldığında aktif bölgeden uzak bu residuların doğal olmayan enantiomer için yeni bir bağlanma bölgesi yarattığı ve

yeni stabilize edici H bağları oluştuğu sonucuna varılmıştır.

Bununla birlikte bu modelleme her çalışma için mümkün olmamaktadır.

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

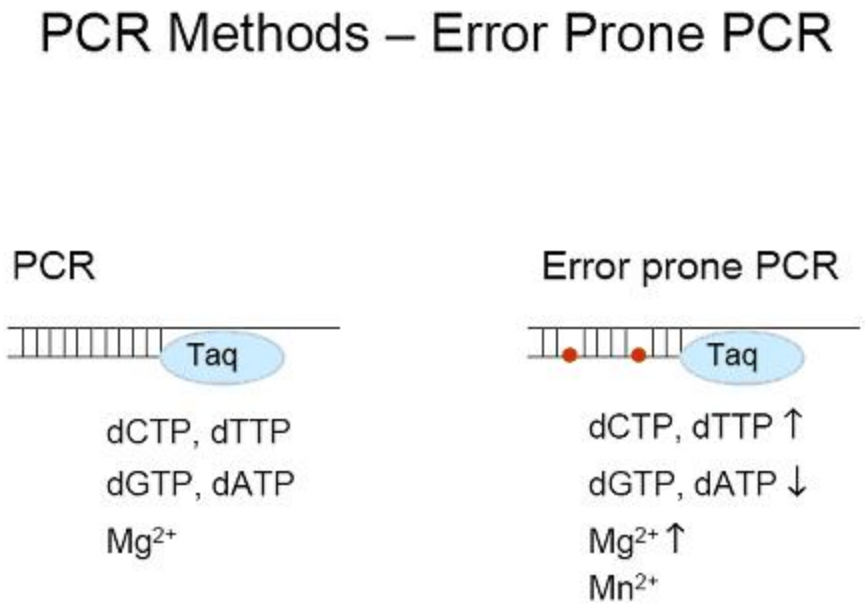
Error Prone- PCR (EP-PCR)

En basit ve popüler non-recombinative metod Error Prone- PCR (EP-PCR) dır.

Mutasyon oranı ayarlanabilmektedir.

Genellikle gen ürünü başına ortalama 1-2 amino asit mutasyonu sokulabilmektedir.

Random mutasyonların çoğu ya nötral ya da zararlı olduğundan düşük mutasyon oranı yararlı mutasyon bulunması olasılığını arttırdığı kabul edilmektedir



Error- Prone PCR standart PCR protokolünün değiştirilmiş bir çeşididir.

Polimeraz enziminin doğal olarak hata yapmaya eğilimli olmasından yararlannılarak **hata oranını yükseltme üzerine** dizayn edilmiştir.

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

Doğal hata oranı yüksek olduğundan dolayı EP-PCR'da yaygın olarak poliperaz olarak *Taq* DNA polimeaz kullanılır.

EP-PCR reaksiyonu standart PCRda kullanılana oranla tipik olarak yüksek konsantrasyonda $MgCl_2$ içerir (EP-PCR 7mM, standart PCR 1.5 mM).

$MnCl_2$ hata oranını yükseklmek için reaksiyona eklenir.

Mutasyon oranını değiştirmek için bir diğer yol reaksiyon içindeki nükleotidlerin oranını değiştirmek ya da

8-oxo-dGTP /dITP gibi nükleotid analogları eklemektir.

Siklus sayısı ile oynamak ya da

kalıp DNA konsantrasyonunu değiştirmek de mutasyon oranını değiştiren diğer faktörlerdir.

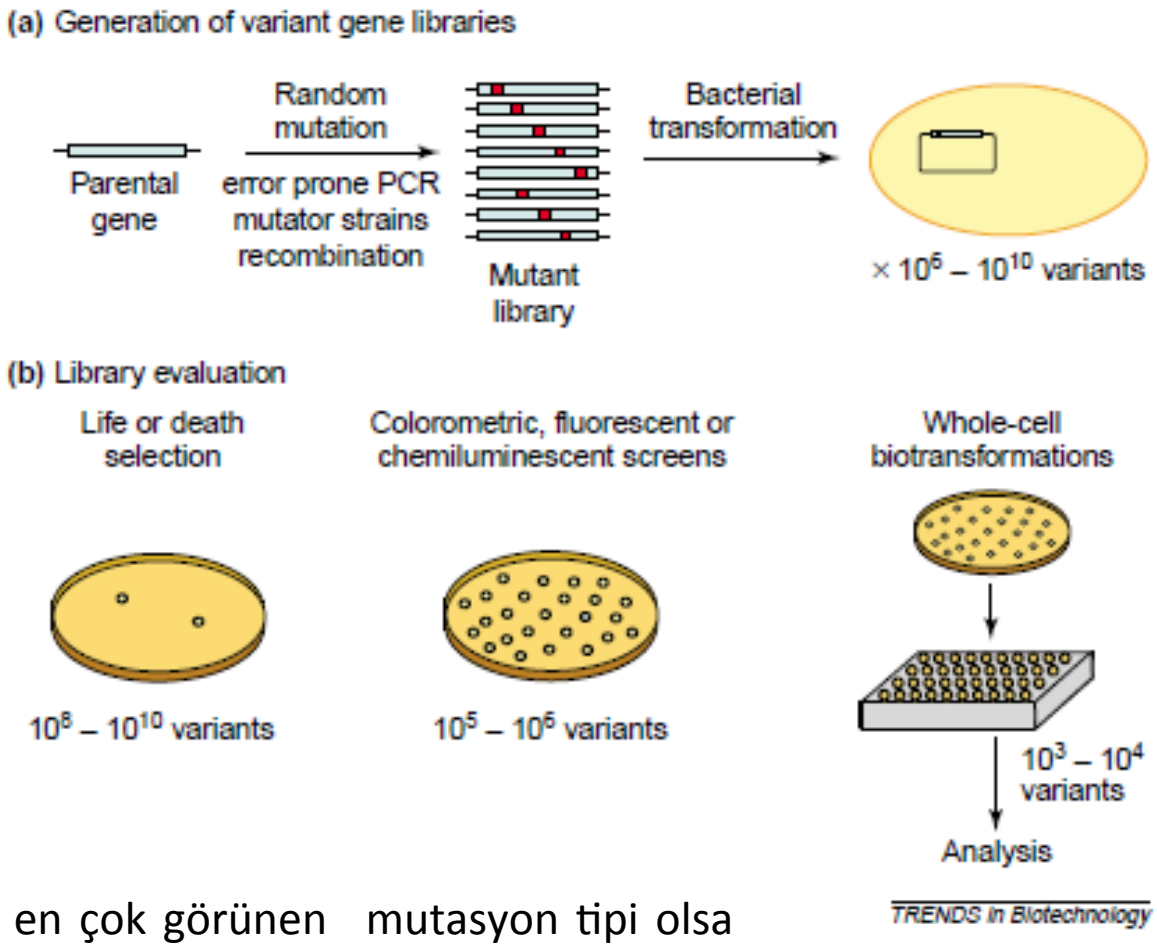
Aynı EP-PCR şartlarında farklı 2 gen kalıp DNAnın kompozisyonuna ve uzunluğuna bağlı olarak farklı mutasyon frekansı gösterecektir.

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

EP-PCR a PCR'ın özensiz (sloppy version) da denilmektedir.

Amplifikasyondan sonra mutant kodlayan diziler uygun bir plasmide klonlanır.

Bu yöntemin kısıtlılığı kütüphane genişliğinin klonalama aşamasının etkinliği ile sınırlı olmasıdır.



Nokta mutasyonları EP_PCRda en çok görünen mutasyon tipi olsa da delesyonlar ve çerçeve kaymaları da mümkündür.

Protein Mühendisliği

Rekombinatif Metodlar

Farklı kaynaklardan homolog/benzer enzimlerin gen fragmentlerinin rekombinasyonu yoluyla gerçekleştirilir.
Aynı atadan evrimleşmiş homolog enzimleri kodlayan genlerin rekombinasyonu önemli bi rçeşitlilik ve yüksek oranda yeni ve fonksiyonel enzimin elde edilmesini sağlamaktadır.

- **DNA Shuffling,**
- **Family DNA Shuffling,**
- **StEP,**
- **RACHITT**
- **ITCHY,**
- **ADO**
- **SCHEMA**

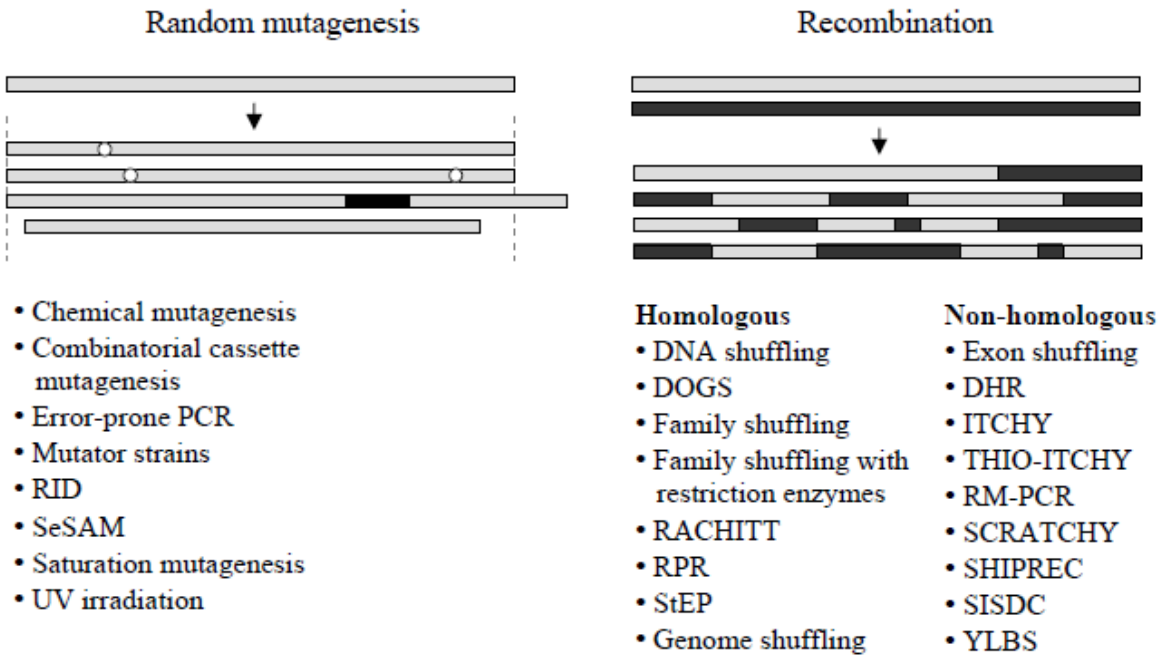


Fig. 1. Comparison of (a) random mutagenesis and (b) recombination strategies.

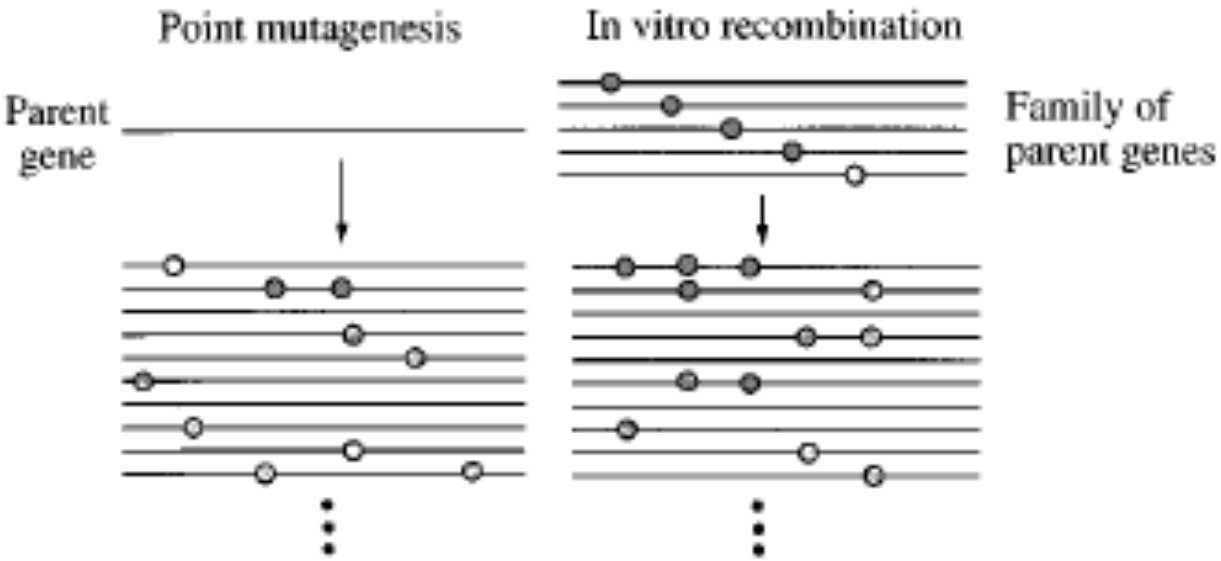
Protein Mühendisliği

Rekombinatif Metodlar

Non rekombinatif metodlar tek bir diziden başlayan nokta mutasyonları içeren gen kütüphanesi oluşturur.

Rekombinatif metodlar ise bir gen dizisi havuzundan farklı mutasyon kombinasyonlarının olduğu gen kütüphaneleri oluşturmaktadır.

Havuzdaki genler daha önceki bir mutasyon raksiyondan elde edilmiş farklı özellikler gösteren pozitif mutantlar ya da birbirleriyle homoloji göstren doğal genler de olabilir.



Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

DNA SHUFLING/FAMILY DNA SHUFFLING

DNA shuffling rekombinatif metodlar arasında en popular olanıdır.

FAMILY DNA SHUFFLING: farklı kaynaklardan homolog genlerin rekombinasyonu

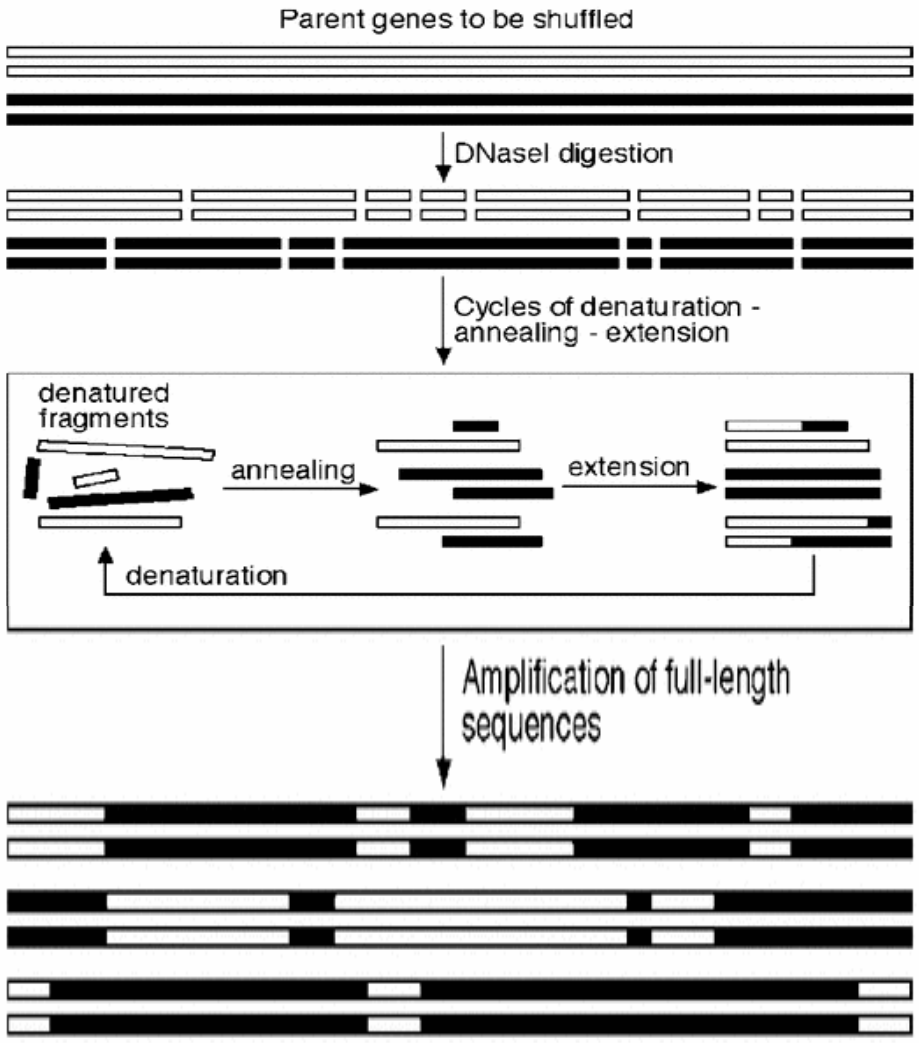
DNA SHUFFLING : nokta mutasyonlarının rekombinasyonu

Gen dizileri ne kadar benzerse o oranda crossing-over oluşur.”

Deneysel İşlem

1. DNAase I enzimi kullanılarak kaynak DNA’nın kontrollü fragmentasyonu

2. Uygun büyüklükte genler agaroz jelden izole edilir, saflaştırılır.



Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

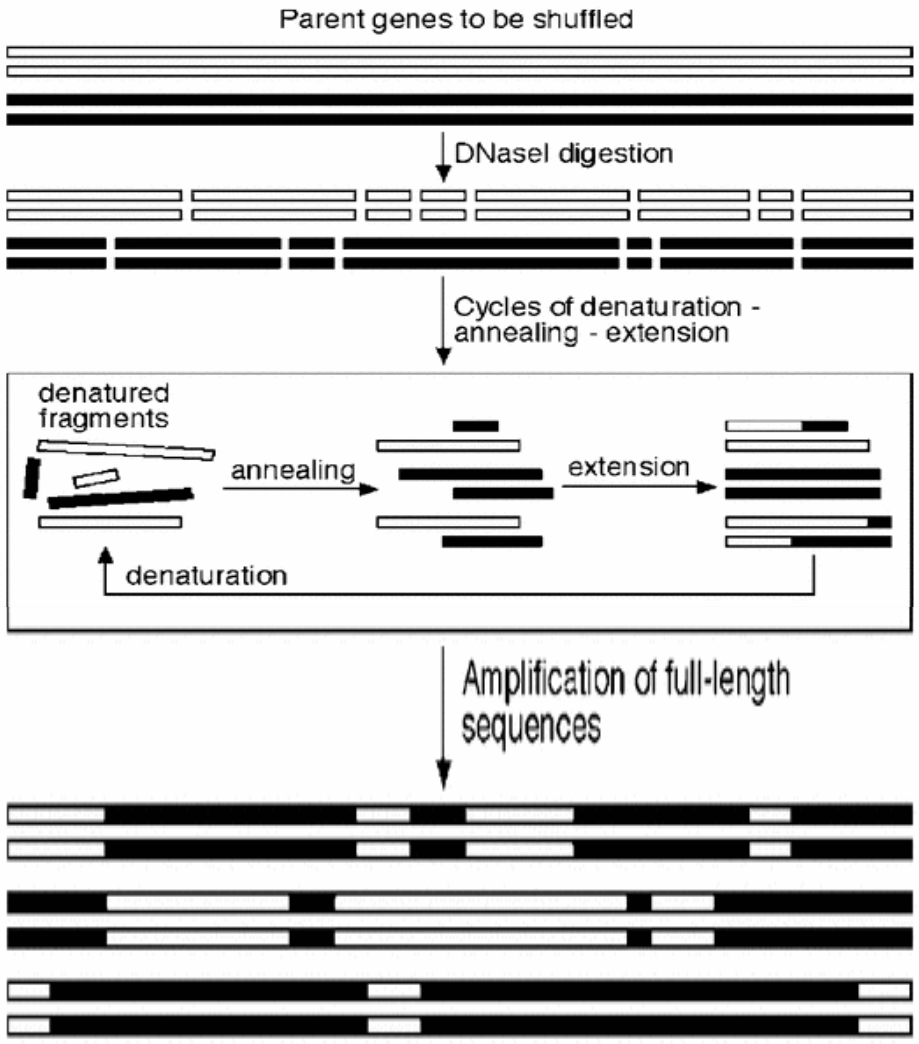
DNA SHUFLING/FAMILY DNA SHUFFLING

3. Bu fragmentler denaturasyon, yapışma ve uzama aşamlarını içeren primersiz bir PCR reaksiyonu ile yeniden birleştirilir. Full-length rekombine edilmiş dizileri üreteilir

Farklı genlerden fragmentlerin yüksek dizi benzerliği gösterdikleri bölgede birleştiğinde rekombinasyon oluşur.

4. Yeniden birleşme aşamasını takiben bu reaksiyonda bulunan küçük miktardaki full-lenght gen terminal primerlerin kullanıldığı standart bir PCR reaksiyonu ile çoğaltılarak full-lenght kimerik genler elde edilir .

5. Uygun bir klonlama vektörüne klonlanır.

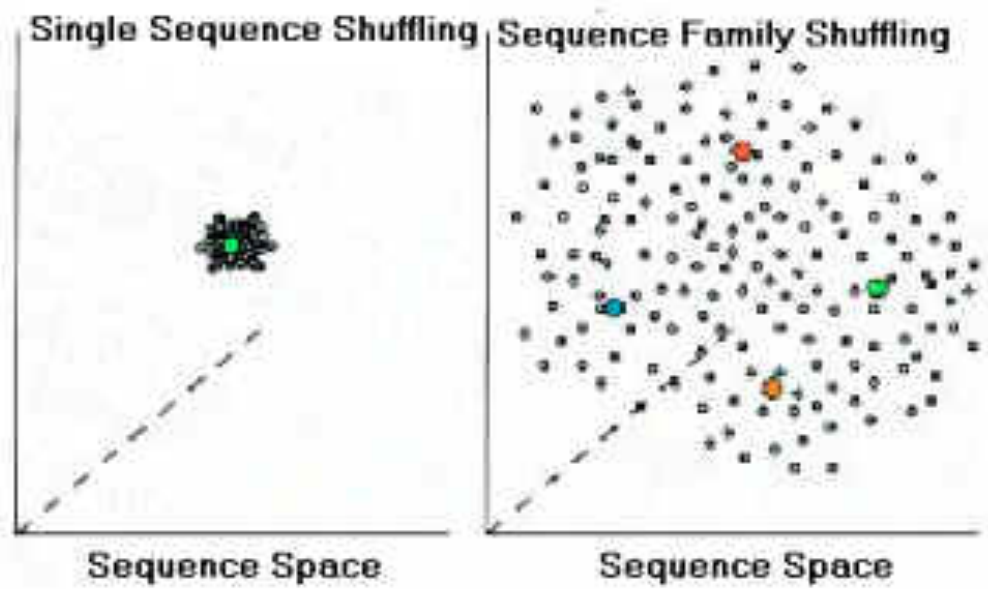


Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

DNA SHUFLING/FAMILY DNA SHUFFLING

Tek bir dizinin “shuffling”i ile family shuffling”i karşılaştırdığımızda tek gen shuffling”inin birkaç nokta mutasyonu içeren klonlar oluşturur ve kütüphanedeki mutantların %97 si aynıdır.

Family shuffling” ise dizi bloklarının değişimini sağlayarak daha geniş bir çeşitlilik içeren genler oluşur. Eşit bir kütüphane büyüklüğünde familiy shuffling”in örnekleme alanı tek gen shufflig”ine göre çok daha büyüktür.



DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. Willem P.C. Stemmer etal. Nature 1998,391:288-291.

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

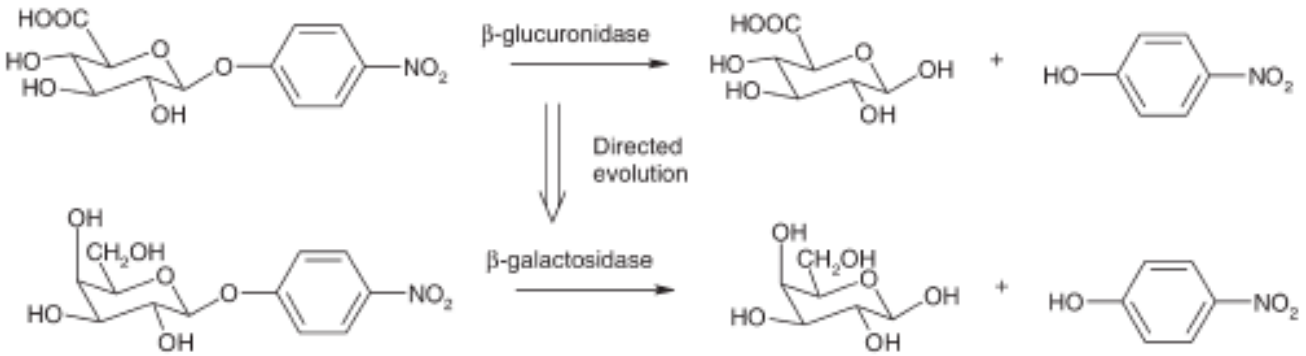
DNA SHUFLING/FAMILY DNA SHUFFLING

Örnek:

E.coli b-glucuronidase geni birkaç tur DNA shuffling ve tarama deneylerine tabi tutularak Beta-galaktozidin hidrolizini wild type enzimden **500 kez daha etkili** katalizleyen bir mutant enzime ulaşılmıştır (

En azından 2 homolog gen dizisinin DNA shuffling i yeni enzim özellikleri geliştirmek için etkili bir yöntemdir.

Yüksek homolog gösteren 2 triazin hidrolaz geni (sadece 9 amino asit açısından farklı) rekombine edilmiş ve kütüphane içinden yaklaşık 1600 varyasyon tarandığında **150 kat yüksek aktivite** gösteren mutan enzim elde edilmiştir (



Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

En popüler ve basit bir teknik olan DNA shuffling metodunun yanısıra rekombinasyona dayanan farklı teknikler de mevcuttur.

Random chimeragenesis on transient templates (RACHITT)

DNA shuffling yöntemine benzer fakat daha fazla deneysel aşama içerir, DNA shuffling e göre daha fazla crossover meydana gelir.

Staggered extension process (StEP)

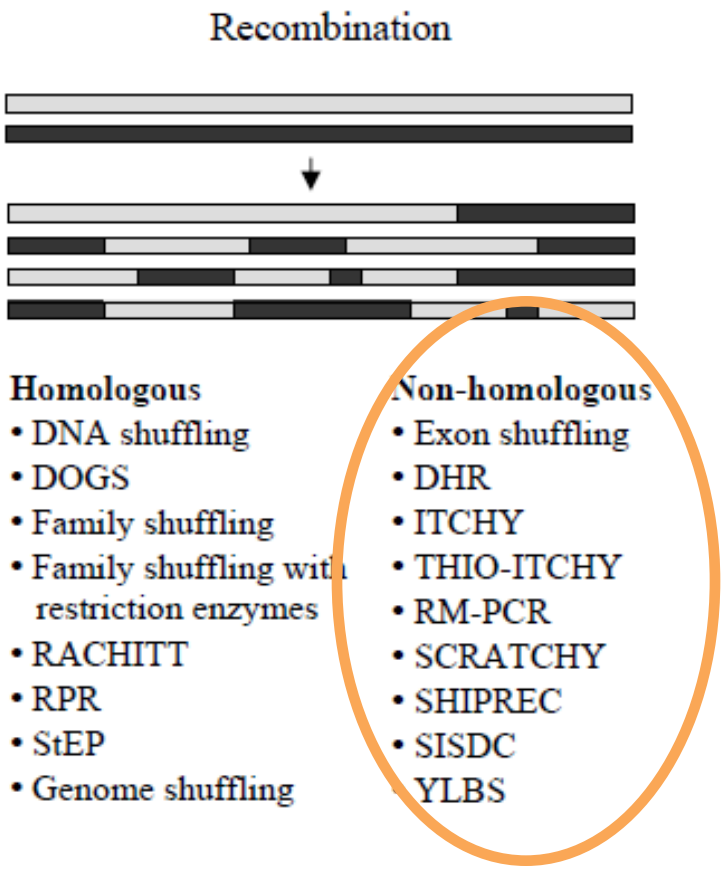
çok kısa bir uzama süresi olan basit bir PCR reaksiyonu ile yapılır, kısmen uzamış DNA zincirleri ayrılır ve yeni bir kalıp DNA'ya yapıştırılarak crossover oluşturulur, böylece rekombinasyon meydana getirilir.

Synthetic Shuffling ve Assembly of Designed Oligonucleotides (ADO)

tamamen sentetik oligonükleotidler kullanılarak rekombinasyon yapılan iki metodtur. her iki teknik de rekombinasyon sıklığını önemli derecede arttırmaktadır.

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

Başka bir grup rekombinatif directed evolution tekniği ise yukarıdaki tekniklerden farklı olarak homolog olmayan genler arasında gerçekleştirilir.



l (b) recombination strategies.

Incremental Truncation for the Creation of HYbrid enzymes (ITCHY) tekniği

uçları kesilmiş iki genin N-terminal ve C-terminal fragmentlerinin ligasyonu ile yapılır.

Genler arasında homoloji aranmaz.

Crossover rastgele pozisyonlarda oluşmaktadır ve başlangıç ürünü sadece tek bir crossover içerir.

ITCHY ürünlerinin DNA shuffling'i çoklu crossover içeren ürünler meydana getirebilir.

Sadece gen çerçevesi içinde kalan ligasyon ürünlerini seçmek için plasmid sistemleri mevcuttur.

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

SCHEMA

Bir hesaplamalı algoritma olan (SCHEMA) tekniği de yapısal bilgiyi kullanarak optimal crossover noktalarını tanımlar.

Bu algoritmanın ardından belirlenmiş bölgelerin shufflinginin yapıldığı çalışmalar yüksek hibridizasyon ve kimerik genlerin oluşturğunu göstermektedir.

Tüm sayılan bu yöntemler şüphesiz ki birçok çalışmada başarıyla kullanılmaktadır.

Ancak yine de basitliği ve kolay uygulabilirliği ile DNA shuffling ve Error prone PCR en yaygun metodlar olarak literatürde karşımıza çıkmakatdır.

Hangi tekniği seçeceğiniz sonuç olarak ne kadar büyüklükte bir kütüpahne oluşturmak istediğiniz ve zamanınızla ilgilidir.

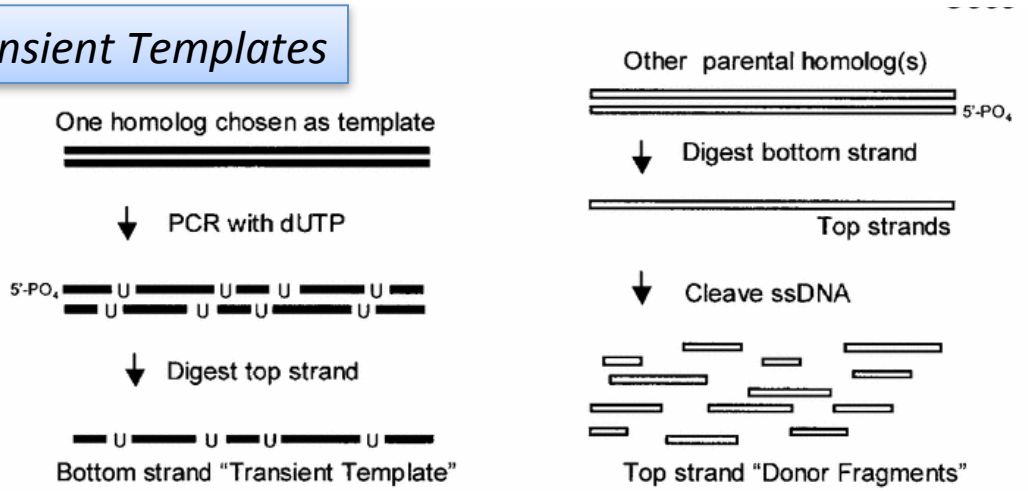
Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

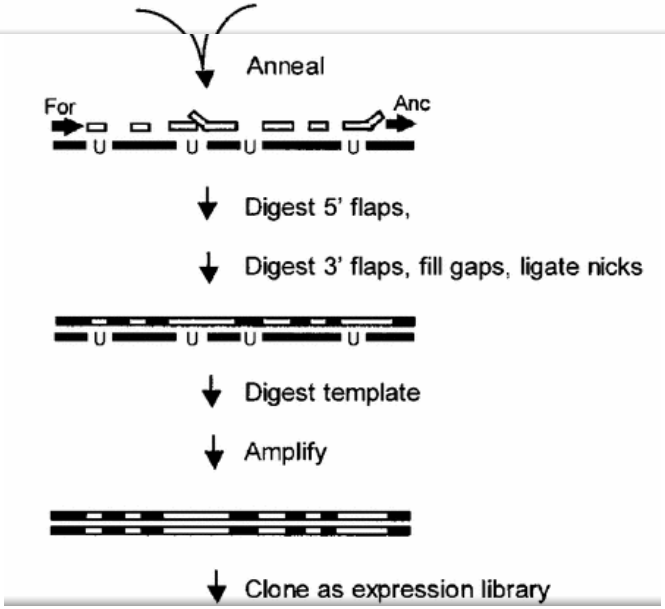
RACHITT/*Random Chimeragenesis on Transient Templates*

RACHITT metodu nda diğer metodların aksine primer uzaması gibi aşamaları kullanılmamaktadır.

Deneysel İşlem

1. Bunların yerine Urasil içeren bir donor gen diğer homolog donor gen fragmentlerinin zincirlerini düzenlemek için bir iskelet olarak kullanılmak üzere tek zincirli hale geririlir.





Screen/select improved phenotypes

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

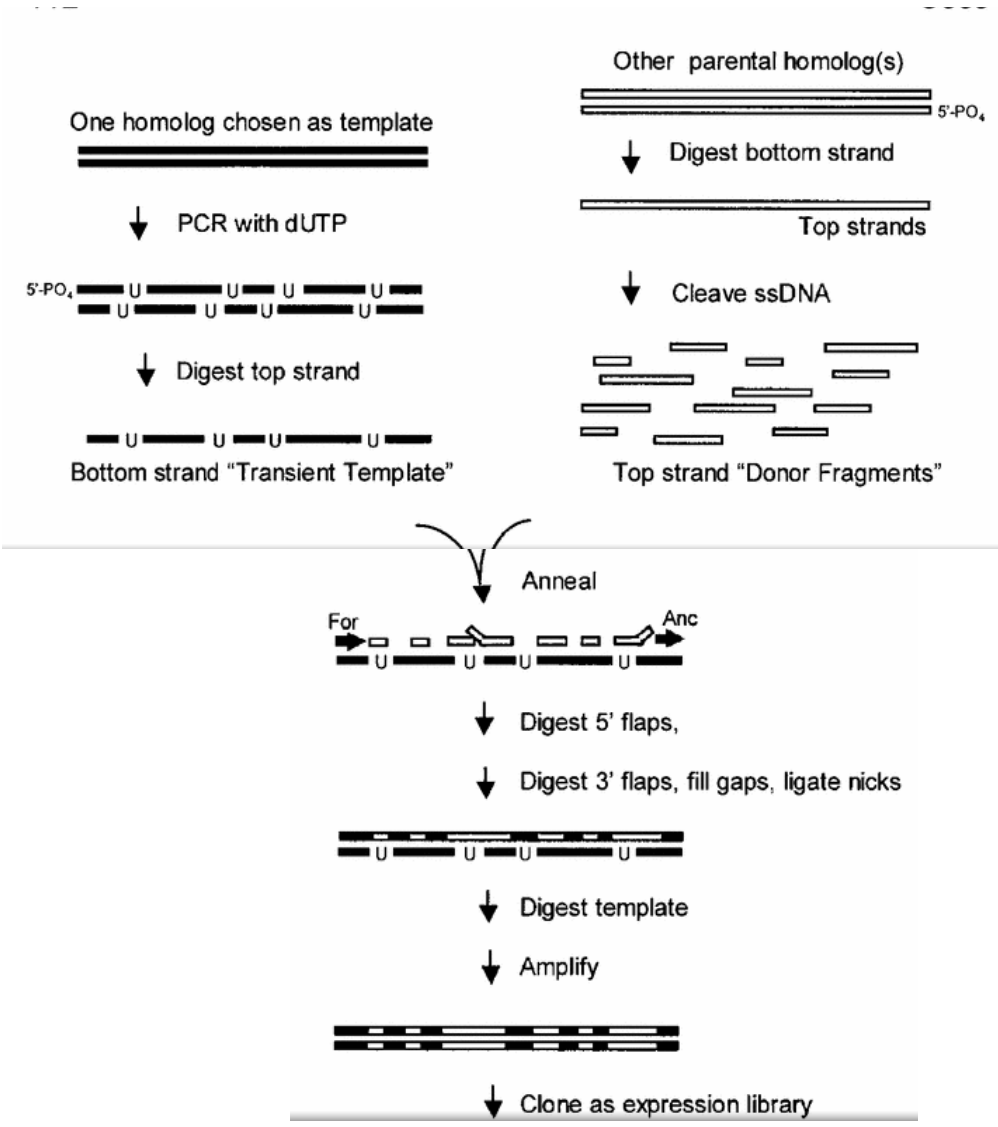
RACHITT

2. Diğer donor genler fragmentlere ayrılır.

Farklı donor genler iskelet gene hibridize olduğunda rekombinasyon oluşur.

3. *Pfu DNA polymerase 3'-5' exonuclease aktivitesi fragment yapışması sırasında oluşan hibridize olmamış* 5' ya da 3' "overhanging flaps" (sarkan bölgeler) çıkartır

4. *Pfu DNA polymerase* kalıp olan iskelet ve yapışan DNA fragmentleir arasında kalan bölgeleri doldurur.



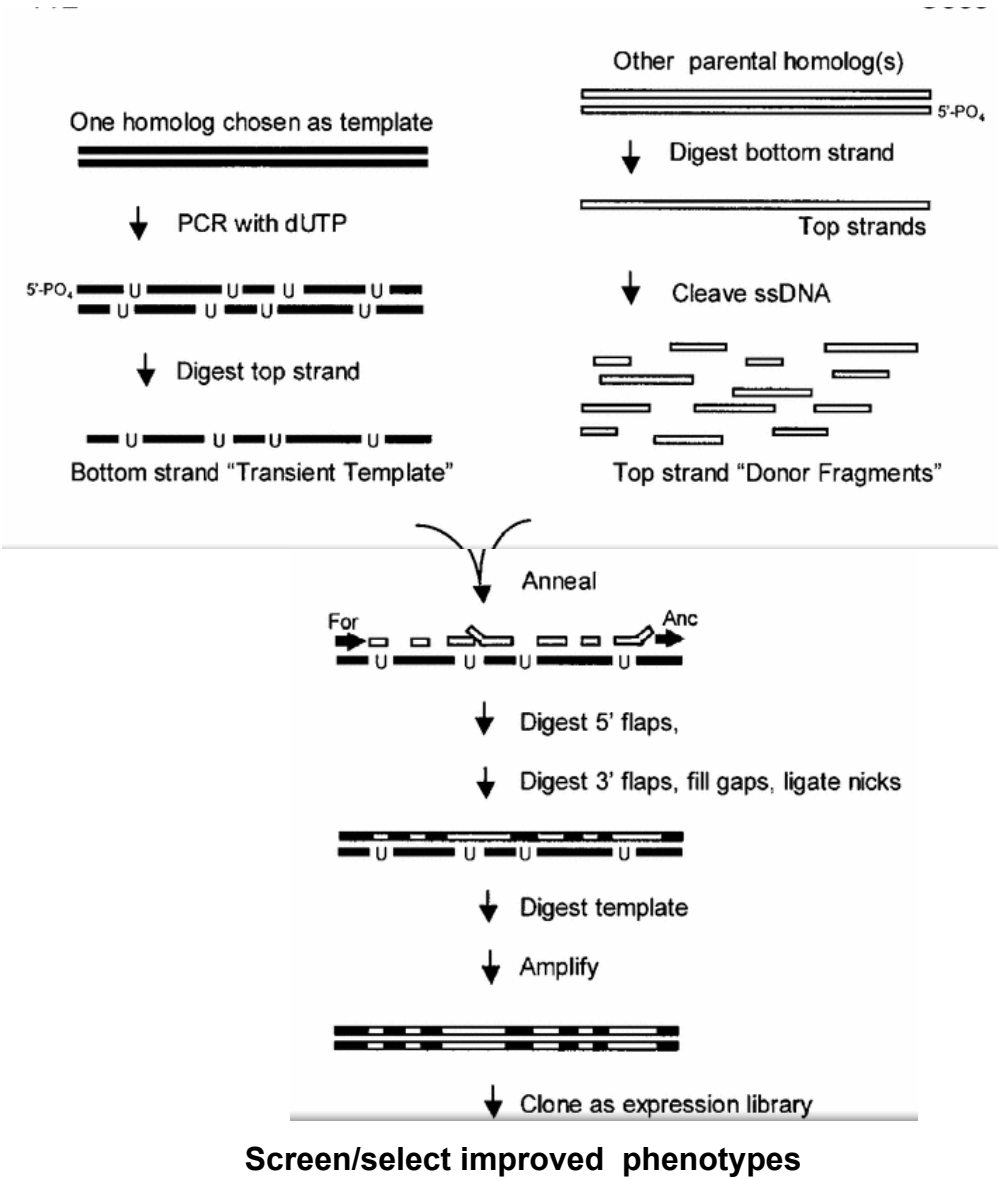
Screen/select improved phenotypes

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

RACHITT

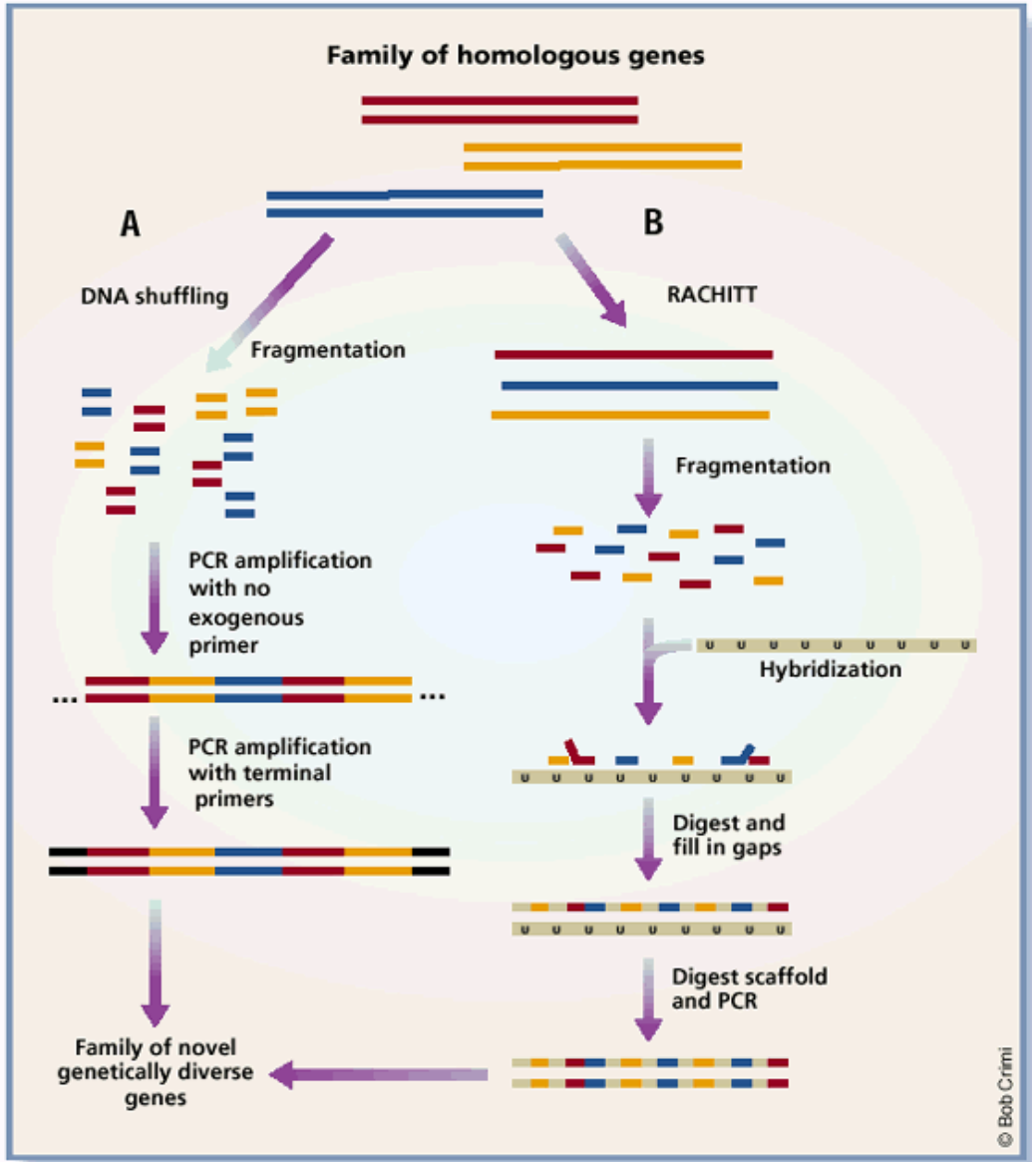
5. Kalıp zincir daha sonra, kalıp-kimera hibridinin PCR reaksiyonundan önce **uracil-DNA-glycosylase muamelesi** ile elimine edilir.

Sonuçta çift zincirli homodupleks kimerik genl dizileri elde edilir.



Screen/select improved phenotypes

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

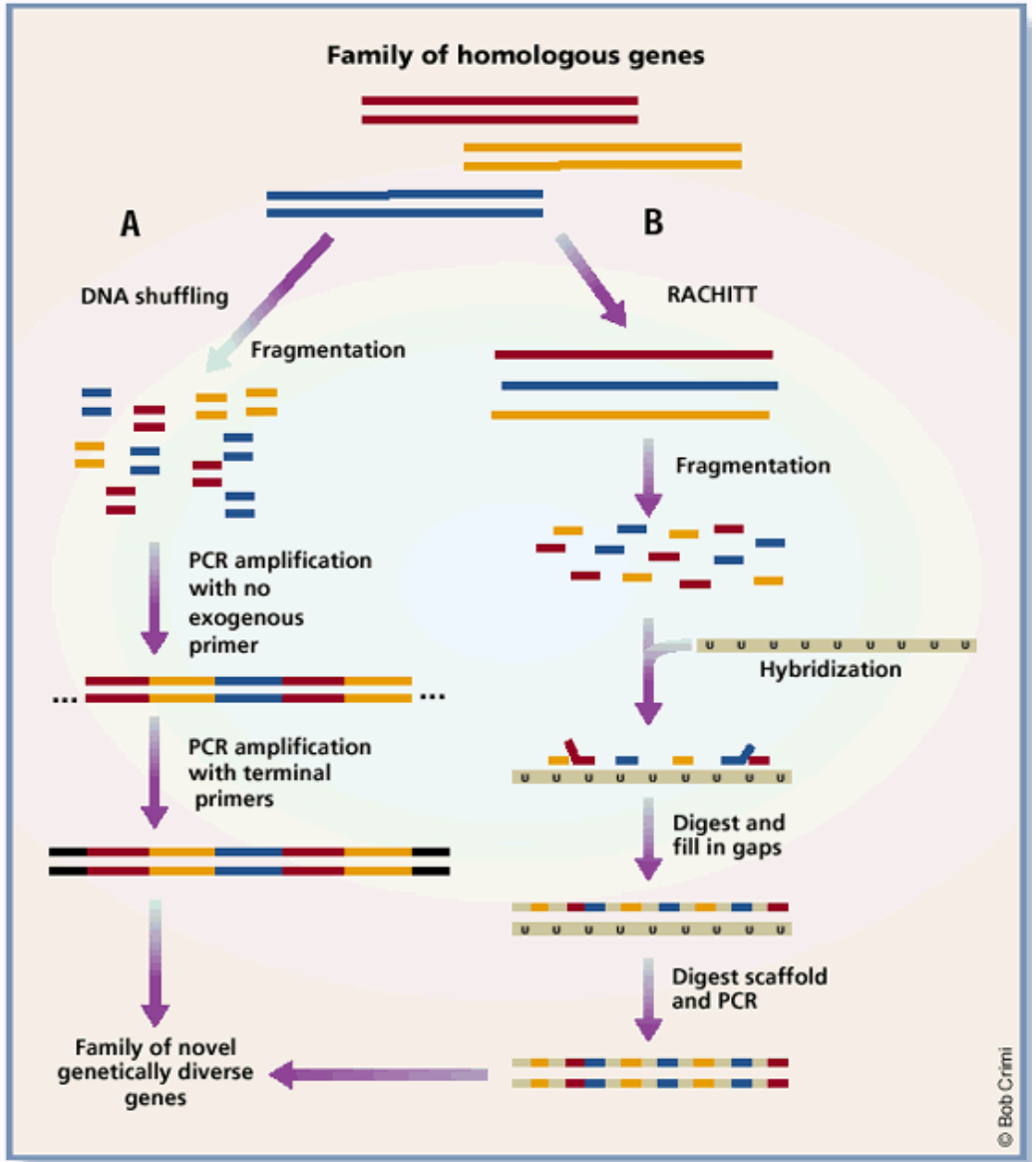


Klasik DNA Shuffling metodu Dnase I kullanılarak çift zincirli donor genlerin fragmentlere bölünmesi ile başlar.

Boyut ayırma ile küçük fragmentlerin işlem için seçilmesi çoklu rekombinasyon olasılığını arttırır.

Son olarak full-length mutant ürünler terminal primerlerin kullanıldığı PCR reaksiyonu ile elde edilir.

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim



RACHITT metodu ise çift zincirli donor DNAlar önce tek zincirli hale getirlir

Daha sonra yine Dnase I ile fragmentlere ayrılır.

Komplementer tek zincirli iskelet (kalıp) DNA ile hibridizasyon sağlanır.

Hibridize olmayan kısımlar kesilir ve boşluklar doldurulur.

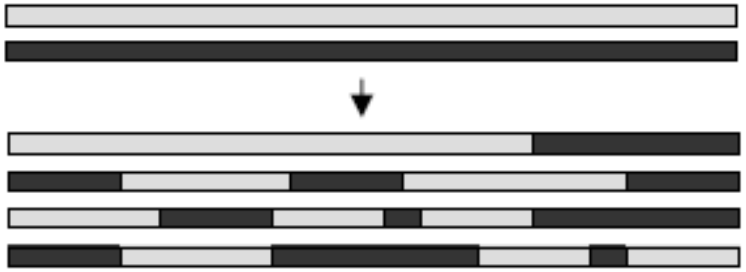
İşaretli kalıp DNA elimine edilir ve en son olarak PCR ile mutant zincire komplementer yeni zincirler sentez edilir.

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

ITCHY *Incremental truncation methods*

Rekombinatif directed evolution teknikleri arasında **homolog olmayan genler arasında yapılan rekombinasyon** temeline dayanan bir tekniktir.

Recombination



Homologous	Non-homologous
• DNA shuffling	• Exon shuffling
• DOGS	• DHR
• Family shuffling	• ITCHY
• Family shuffling with restriction enzymes	• THIO-ITCHY
• RACHITT	• RM-PCR
• RPR	• SCRATCHY
• StEP	• SHIPREC
• Genome shuffling	• SISDC
	• YLBS

l (b) recombination strategies.

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

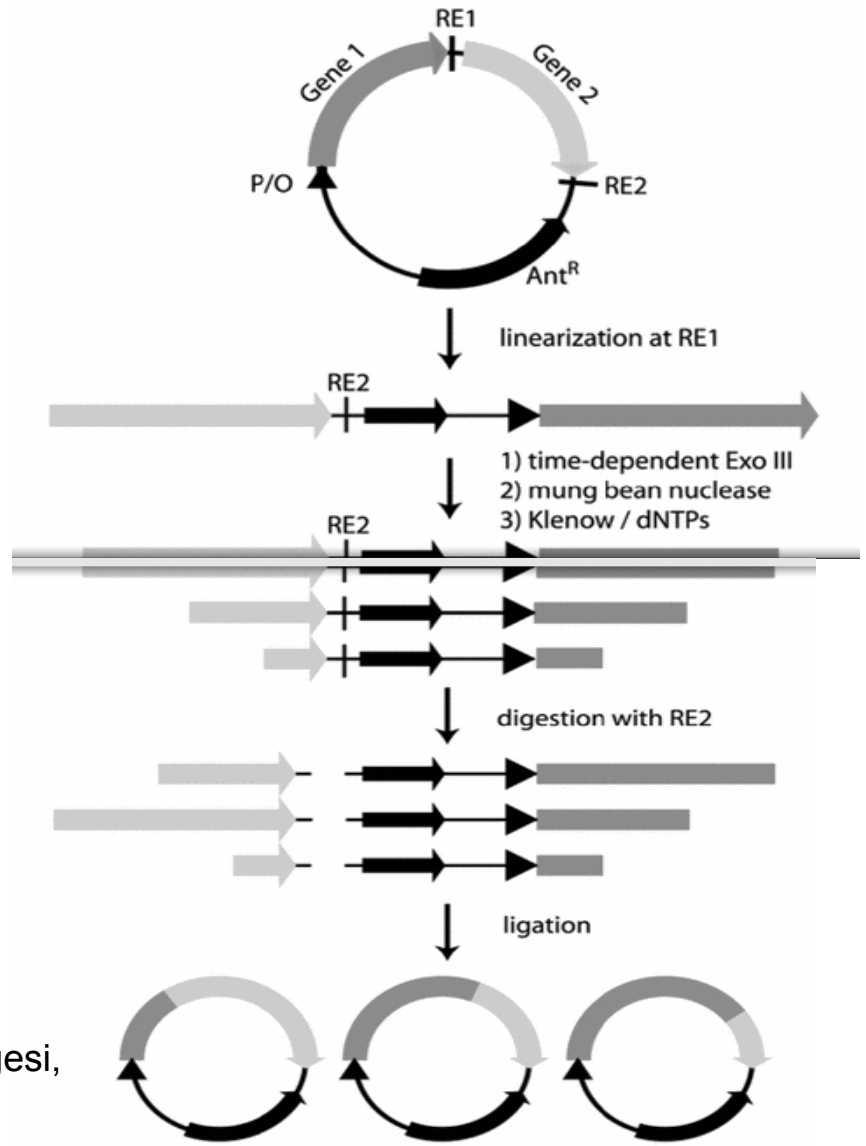
ITCHY *Incremental truncation methods*

Ostermeier ve arkadaşları tarafından ortaya konulan bu teknikte iki donor enzimden domainler rastgele füzyon ile yeni kimeralar oluşturmak için kullanılır.

Maksimum başarı ve yeni bir aktivit elde etmek için iki protein domainlerinin hangi bölgelerinin füsyona uğratılması gerektiğini belirlemek oldukça zordur.

Bu zorluk DNA'nın eksonükleaz III ile kontrollü kesimi sayesinde aşılır.

Böylece donor genlerin mümkün tüm fragmentasyonu toplanır ve hibrid proteinler oluşturmak için blunt-end ligasyon yapılır.



RE1 ve RE2 resktrissiyon endonükleaz kesim böllgesi, P/O promoter, ANtR antibyotik dayanıklılık geni

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

ITCHY *Incremental truncation methods*

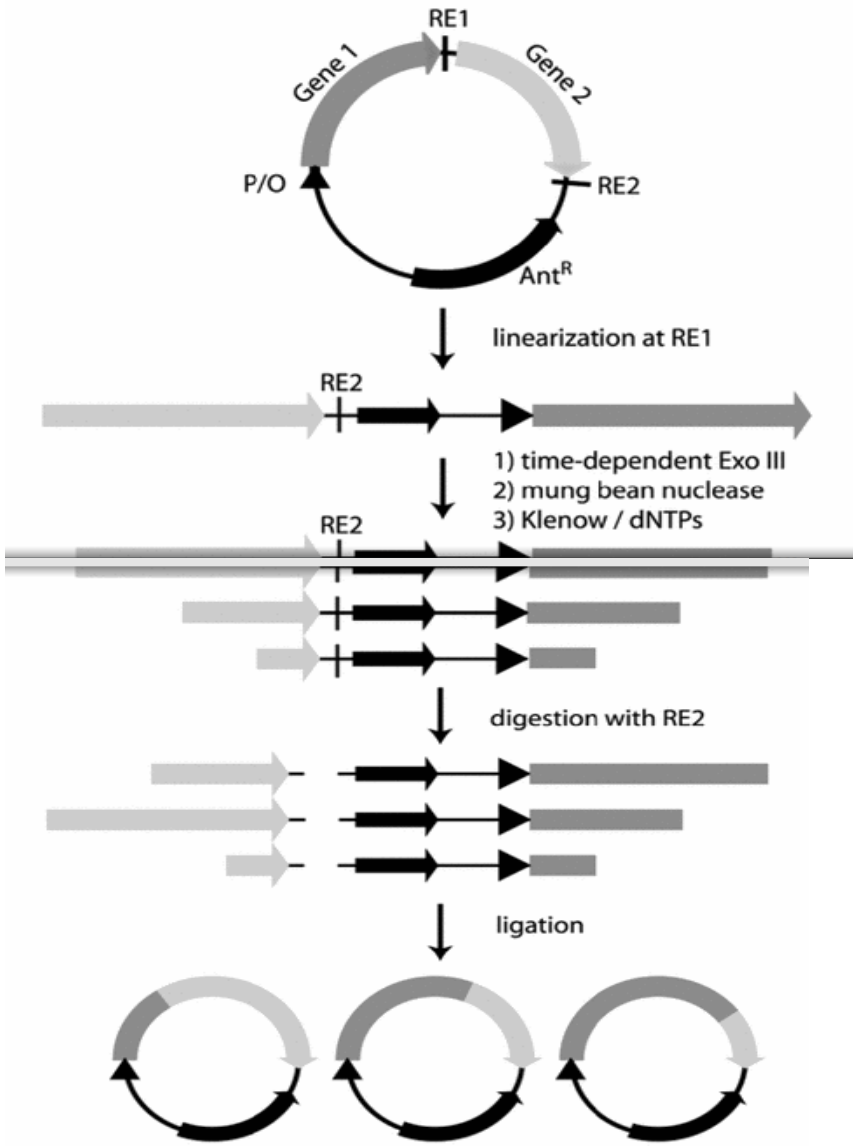
Yine de ITCHY zaman alıcı ve emek gerektiren bir metodtur.

Diğer kısıtlayıcı faktörler:

•Sadece iki donor DNA kullanılabilir

•Fragmentlerin rastgele füzyonu nedeniyle gen uzunluğu korunamamaktadır.

•Rekombinasyon çoğunlukla yapısal olarak bağlantılı olmayan bölgelerde oluşur.



Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

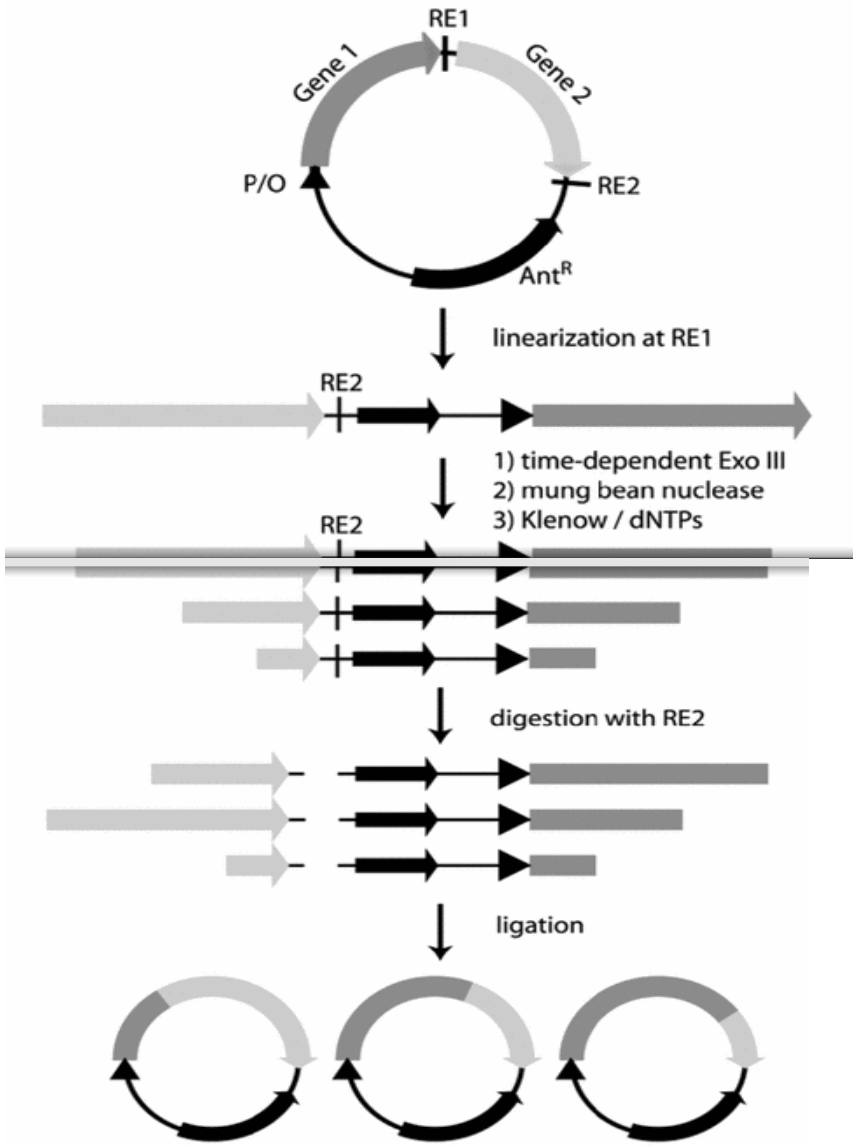
THIO-ITCHY / SCRATCHY

Modifiye edilmiş incremental truncation method THIO-ITCHY donor gelerden frgament kütüphaneleri oluşturmak için basit bir prosedür ortaya koymaktadır.

THIO-ITCHY donor genlerdeki α-fosfotiyat nükleotid analoglarının rastgele, düşük frekanslı birleşmesi ile gerçekleşir.

α-fosfotiyat nükleotidleri DNA'ları eksonükleaz aktivitesinden korur ve kesim alikotlarından hedef uzunluktaki fragmenlerin çıkarılmasını garantiye alarak zaman kaybını önler

Daha fazla çeşitlilik iki ITCHY kütüphanesinin shufflingi ile sağlanabilir. Bu yöntem is e SCRATCHY adını almaktadır.



Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

EXON SHUFFLING

Kolkman ve Stemmer tarafından tanımlanan bir metodtur.

Bir protein domainini kodlayan ekson bölgeleri ya da ekson komibansyonları içeren DNA fragmentlerinin meydana getirlimesini gerektirir.

Ekson fragmentleri sentetik kimerik oligonükleotidlerle çoğaltılır. Böylece fragmentler rastgele biçimde birbiriyle birleştirilir.

Birleştirilmiş primerler daha sonra full-lenght bir gen oluşturmak için primersiz bir PCR ile biraraya getirilir.

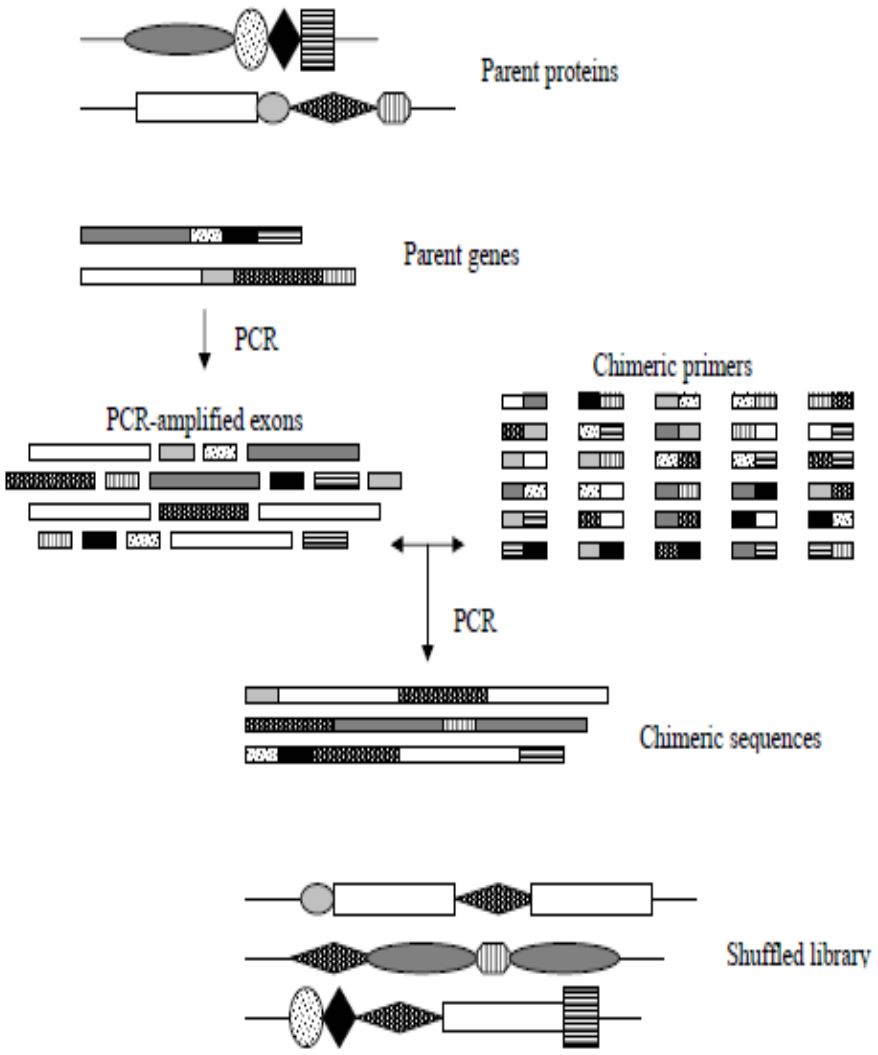


Fig. 3. Method of non-homologous recombination by exon shuffling.

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

EXON SHUFFLING

Kimerik oligonükleotidler bir donor genin eksonunu ikinci farklı bir gen eksonuna bağladığında rekombinasyon oluşmaktadır.

Ekson shuffling kütüphanesinin çeşitliliği rekombine edilen modüllerin ve homolog domainlerin sayısı ile kontrol edilmektedir.

Bu yöntemde çeşitliliğin kontrol edilebileceği bir başka etken domainleri bağlayan kimerik oligonükleotidlerdir.

Daha fazla çeşitlilik istendiğinde yine diğer metodlarda olduğu gibi rastgele mutasyonlar, insersiyonlar ve delesyonlar ile sokulabilir.

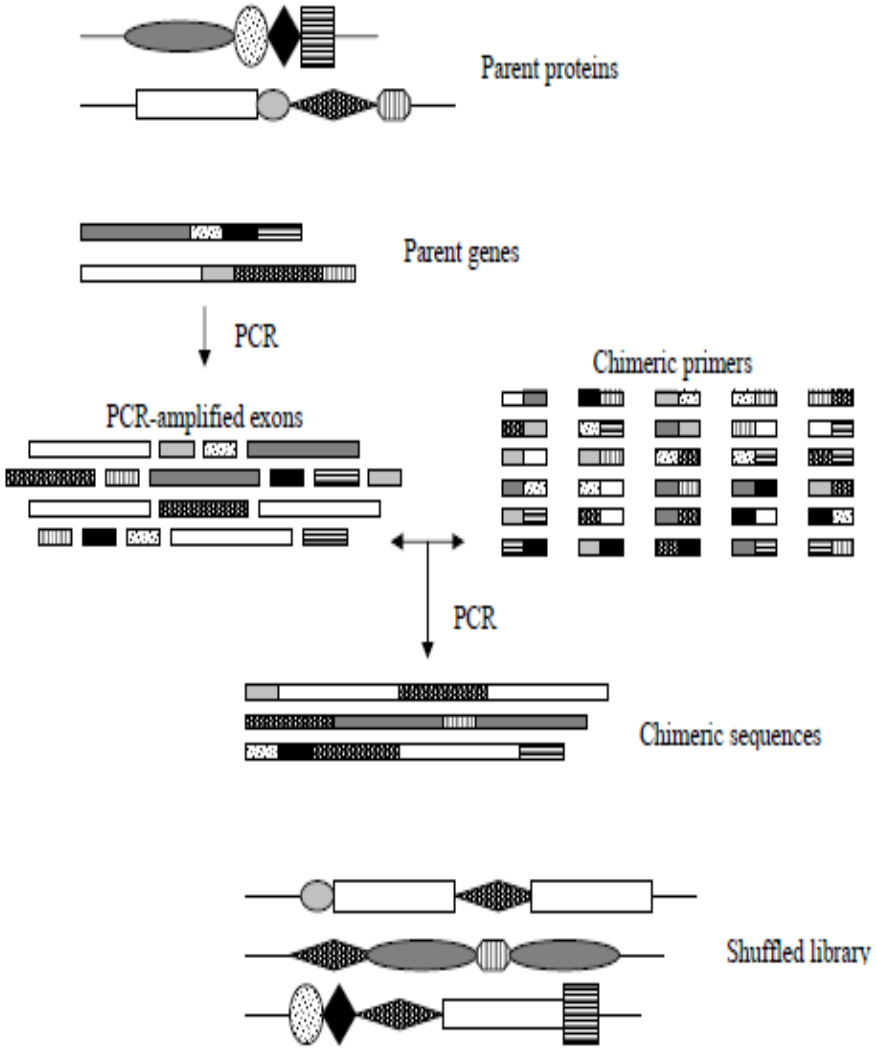


Fig. 3. Method of non-homologous recombination by exon shuffling.

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

Diğer kaynaklar

Strategy and success for the directed evolution of enzymes Paul A Dalby
Current Opinion in Structural Biology
Volume 21, Issue 4, August 2011, Pages 473–480

Generating Mutant Libraries Using Error-Prone PCR Patrick C. Cirino
Directed Evolution Library Creation
Methods in Molecular Biology™Volume 231, 2003, pp 3-9

Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis
Julia Reikofski, Biochemical and Food Process Engineering

Site-Directed Mutagenesis Patricia E. Carrigan
Methods in Molecular BiologyVolume 700, 2011, pp 107-124

Protein engineering of microbial enzymes
•Dominique Böttcher, Uwe T Bornscheuer Methods Mol Biol. 2003;231:111-27.

•**RACHITT: Gene family shuffling by Random Chimeragenesis on Transient Templates.**Coco WM.

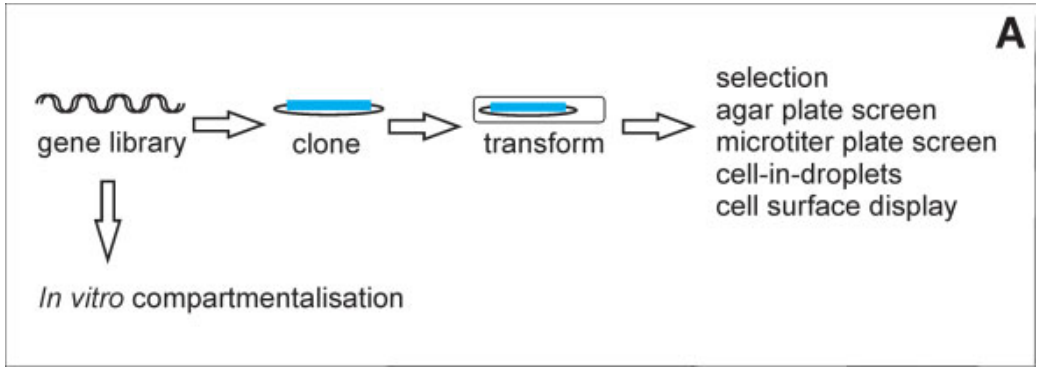
Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

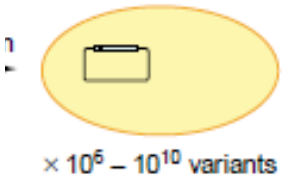
YÖNLENDİRİLMİŞ EVRİM /TARAMA VE SEÇME YÖNTEMLERİ

Yönlendirilmiş Evrim 2 aşamalı bir yaklaşımdır.

1.Rastgele Mutasyonlar (random mutagenesis) ya da in vitro rekombinasyon ile genetik çeşitliliğin oluşturulması

2.Tarama ya da seçme (screening or selection) teknikleri ile istenilen hedefe göre geliştirilmiş mutant fenotiplerin kütüphane içinde tanımlanması





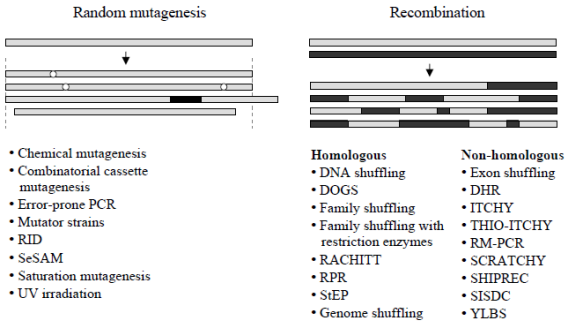
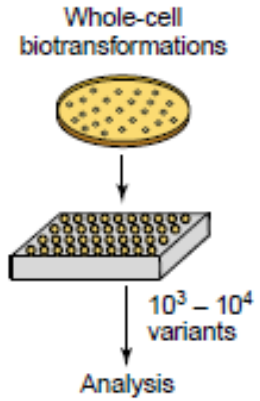


Fig. 1. Comparison of (a) random mutagenesis and (b) recombination strategies.



Protein Mühendisliği

Semirational Design-Site Saturation Mutagenesis

Kısmen ya da tam 3 boyutlu yapı bilgisi ve amino asit dizi bilgisi gerektirir.

Elde edilen "smart library" içinden seçim yapılabilmesi için tarama ve seçme tekniklerinin kullanımını gerektirir

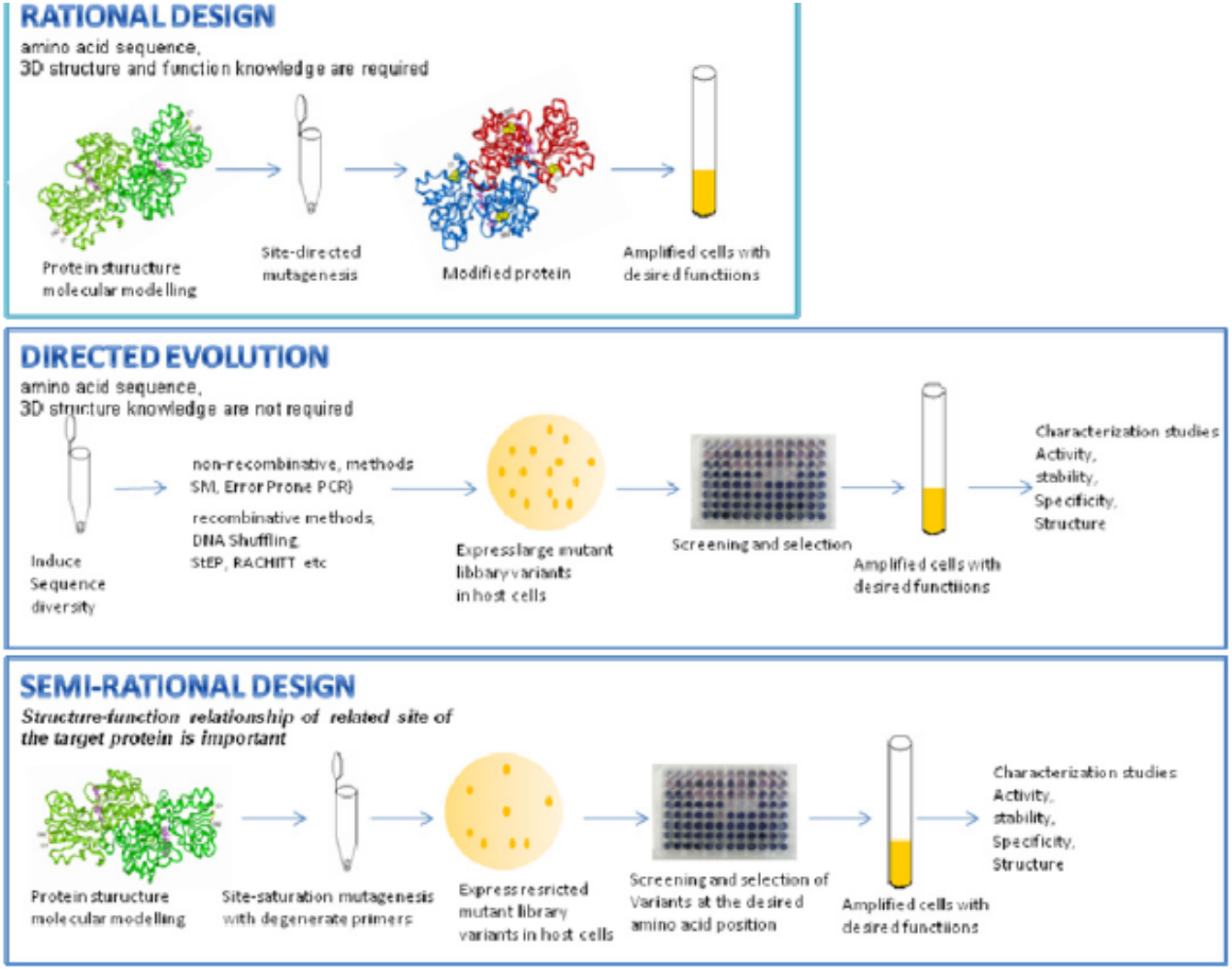
Yönlendirilmiş evrim yönteminin çok zaman alıcı ve emek gerektiren tarama ve seçme metodlarını kolaylaştırmak

Rasyonel dizayn için gereken modelleme çalışmalarını indirgeme arayışlarından dolayı yeni bir yaklaşıma ihtiyaç duymuşlardır.

Böylelikle protein fonksiyon ve özelliklerinin araştırılması ve geliştirilmesi amacıyla her iki stratejinin bir kombinasyonu olan yarı-rasyonel mutagenesis /site saturation mutagenesis tekniğini kullanılmaya başlanmıştır.

Protein Mühendisliği

Semirational Design-Site Saturation Mutagenesis



Protein Mühendisliği

Semirational Design-Site Saturation Mutagenesis

Site Saturation Mutagenesis diğer yönlendirilmiş evrim teknikleri ile karşılaştırıldığında bazı avantajlara sahiptir.

DNA Shuffling ya da EP_PCR gibi metodlarda rastgele ya da rekombinatif mutasyonlar proteini kodlayan tüm DNA dizisine uygulanır ve çok geniş kütüphaneler oluşur.

Bu kütüphanaler içinden aradığımız fenotipi sağlayanların tanımlanması oldukça emek ve zaman gerektirmektedir.

Saturation mutagenesisde ise gen üzerinde daha önceden belirlenmiş hedef pozisyonlarda bir ya da daha fazla amino asit dizisi tüm mümkün (22 farklı amino asit) ile değiştirilerek kütüphane büyüklüğünü daha rasyonel ve daha küçük hale getirir.

Protein Mühendisliği

Semirational Design-Site Saturation Mutagenesis

Hedeflenen değişiklikten sorumlu olduğu düşünülen pozisyon proteinin 3 boyutlu yapı bilgisi ile elde edilmektedir.

Mutasyon bölgelerinin rasyonel bir yaklaşımla belirlenmesi etkili bir tarama metodu ile birleştiğinde site saturation mutagenesis birçok protein özelliğini geliştimede başarı ile kullanılmıştır.

Degenere primers contain mutant codon on both

forwad (5'- CATATGCATGCGGGAGCTCAA**NNK**AAGATCGTTTTAG-3')

reverse 5'-(CTAAAACGATCTT**MNN**TTGAGCTCCCGCATGCATATG-3')

Base changes are in boldface. N is A, T, G or C; K is G or T; M is A or C.

Protein Mühendisliği

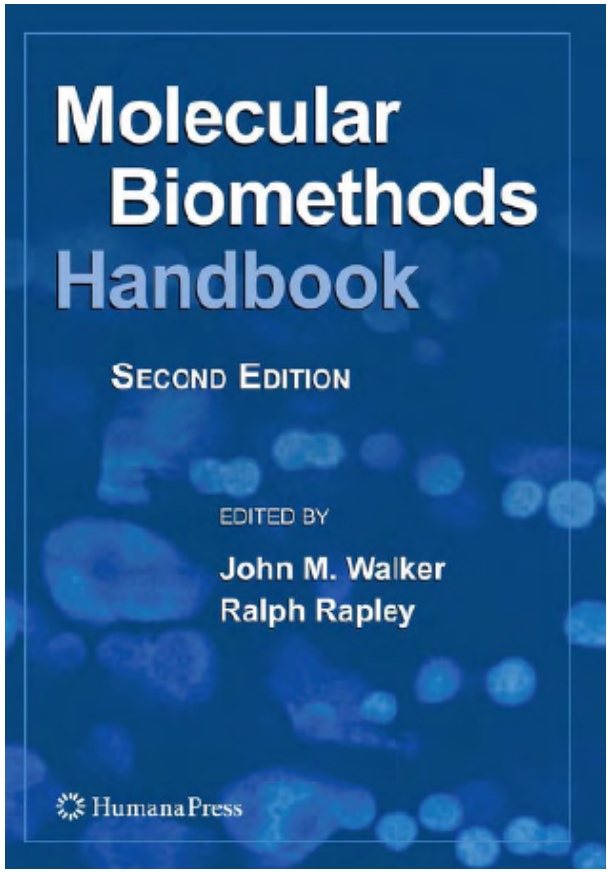
Semirational Design-Site Saturation Mutagenesis

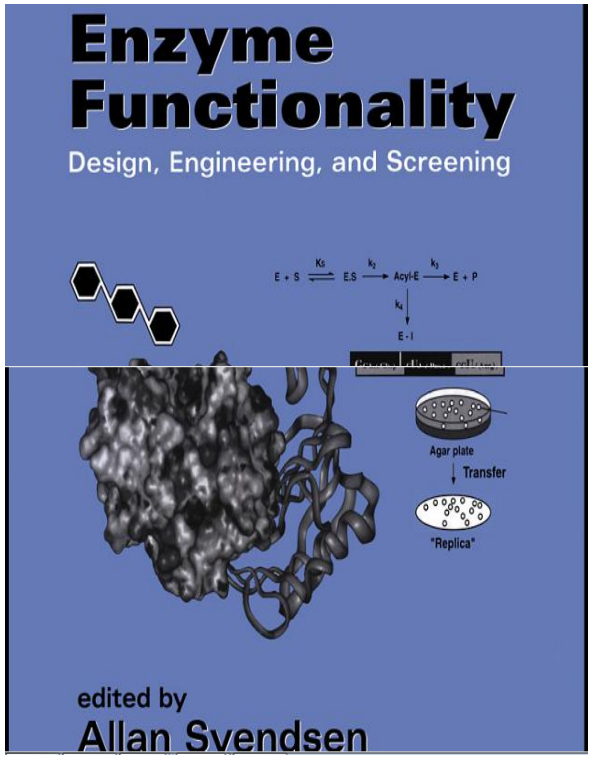
Bu yöntemle lipaz enziminin termostabilitesi 48 C den 93 C’ ye kadar çıkartılabilmiştir (Reetz *et al.*, 2006).

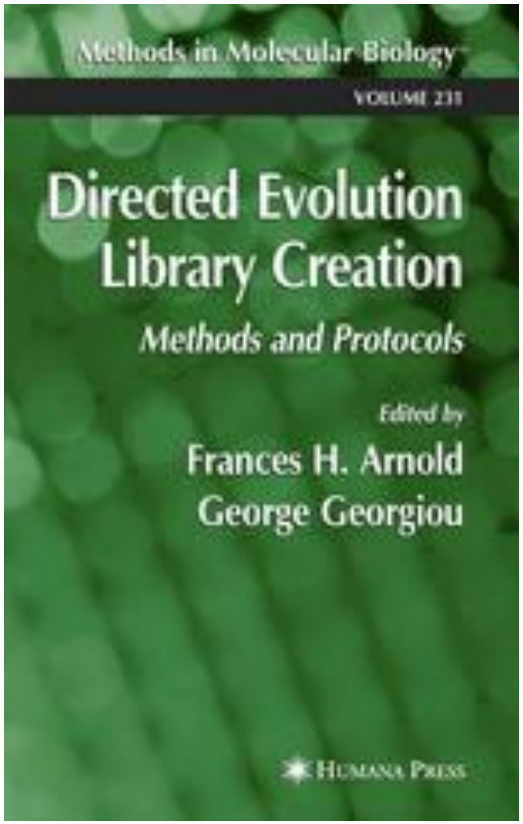
Cantor ve ark da 2011 yılında bu yöntemi löseminin tedavisinde önemli olan T – hücrelerinin araştırılmasında başarıyla kullanmıştır

Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

kaynaklar







Protein Mühendisliği/ Yönlendirilmiş Evrim

Diğer kaynaklar

Strategy and success for the directed evolution of enzymes Paul A Dalby
Current Opinion in Structural Biology
Volume 21, Issue 4, August 2011, Pages 473–480

Generating Mutant Libraries Using Error-Prone PCR Patrick C. Cirino
Directed Evolution Library Creation
Methods in Molecular Biology™Volume 231, 2003, pp 3-9

Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis
Julia Reikofski, Biochemical and Food Process Engineering

Site-Directed Mutagenesis Patricia E. Carrigan
Methods in Molecular BiologyVolume 700, 2011, pp 107-124

Protein engineering of microbial enzymes
•Dominique Böttcher, Uwe T Bornscheuer Methods Mol Biol. 2003;231:111-27.

•**RACHITT: Gene family shuffling by Random Chimeragenesis on Transient Templates.**Coco WM.