

Вычислительный дизайн ферментов

Дизайн белков, НТУ Сириус

Злобин А.С.^{1 2} Головин А.В.^{1 2}

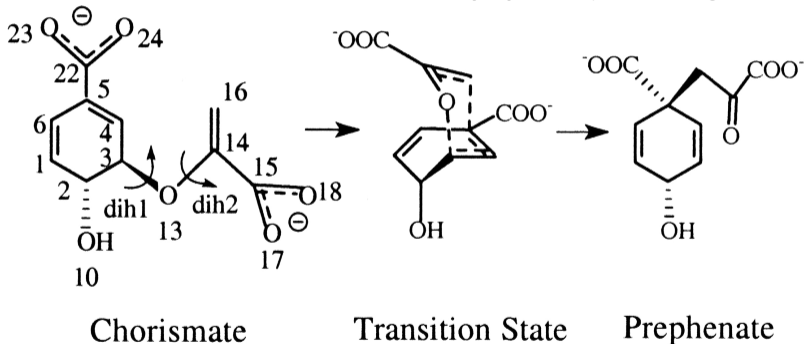
¹НТУ Сириус, ЦИИиИТ

²МГУ им М.В. Ломоносова, Факультет Биоинженерии и Биоинформатики

Сириус, 2022

Ферменты это биокатализаторы

Катализатор – вещество, ускоряющее химическую реакцию. Биокатализатор – такое вещество биологической природы (белок, нуклеиновая кислота).



Фермент хоризмат мутаза ускоряет эту реакцию в 10^6 раз

Биокатализаторы в промышленности и медицине

Пищевая индустрия:

- Ферментация чего угодно
- Разрушение глютена
- Осветление напитков
- Безлактозное молоко
- Синтез ароматизаторов
- Удаление неприятных ароматов

Не пищевая индустрия:

- Производство биотоплива
- Деградация пластиков
- Очистка сточных вод
- Улучшение тканей
- Стиральные порошки
- Зубные пасты
- Производство бумаги
- Производство чистых аминокислот

Медицина:

- Синтез полусинтетических препаратов
- Синтез прекурсоров
- Терапевтические ферменты

Factors that enable biocatalysis

- **Reaction design**

Manual, automatic

- **Choice of biocatalyst**

Genomic database, de novo design

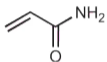
- **Biocatalyst optimization**

Rational engineering, directed evolution

- **Bioprocess development**



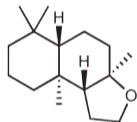
Materials
and polymers



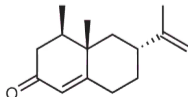
Acrylamide



Fragrances
and flavours



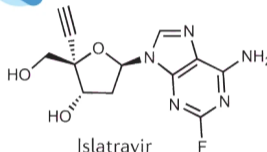
(-)-Ambrox
(fragrance
intermediate)



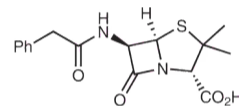
Nootkatone



Pharmaceuticals



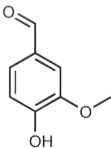
Islatravir



Penicillin G



Fine
chemicals



Vanillin



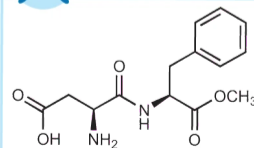
Biopharmaceuticals/
new modalities



Antibody–drug
conjugates

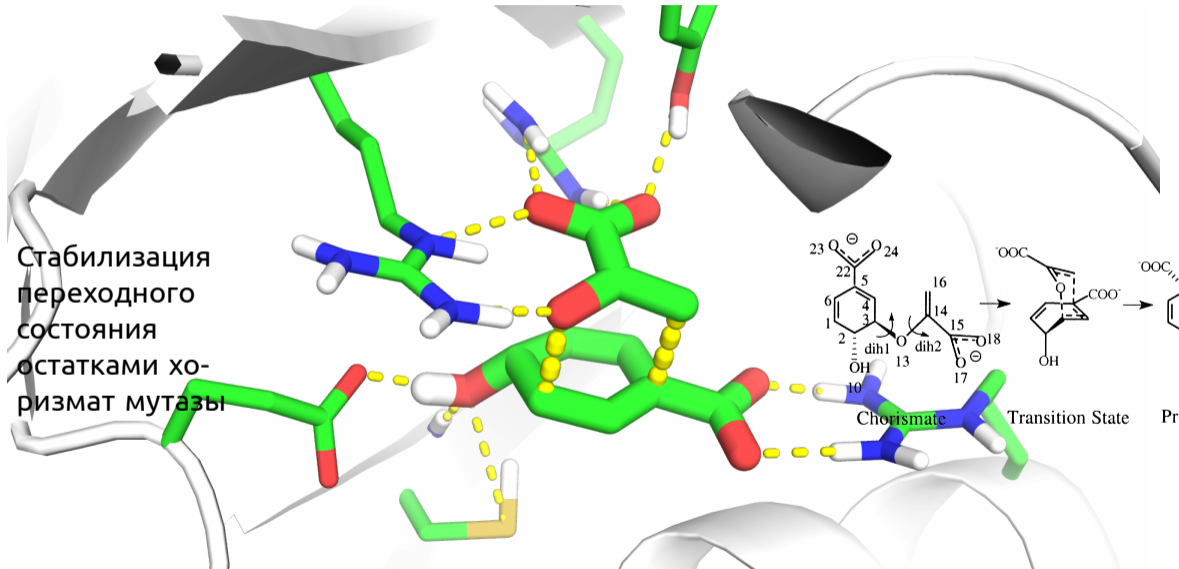


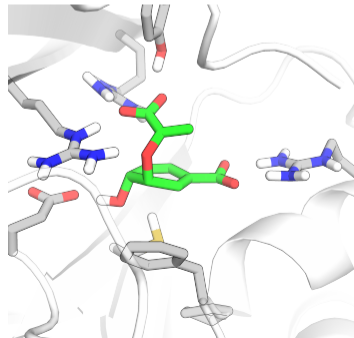
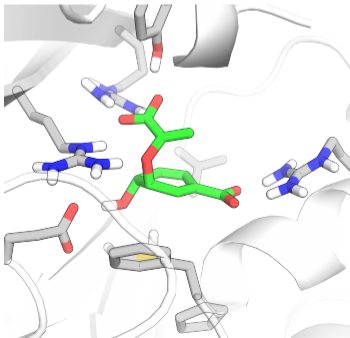
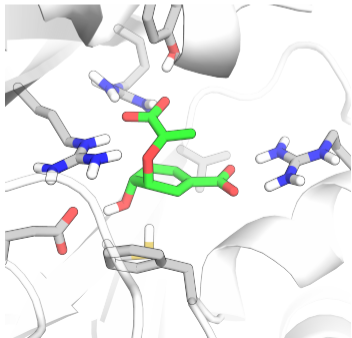
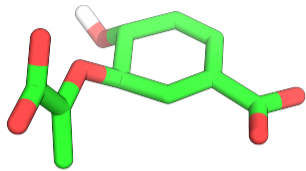
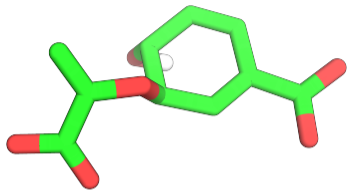
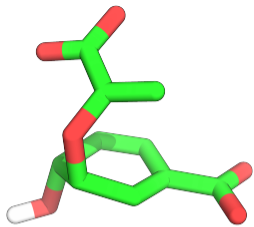
Food



Aspartame

Как они это делают



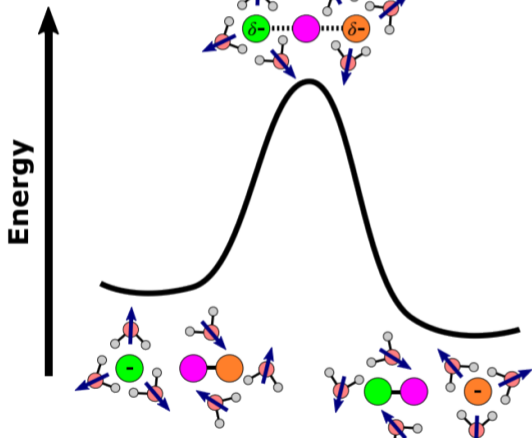


Как они это делают

Reaction in Solvent

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

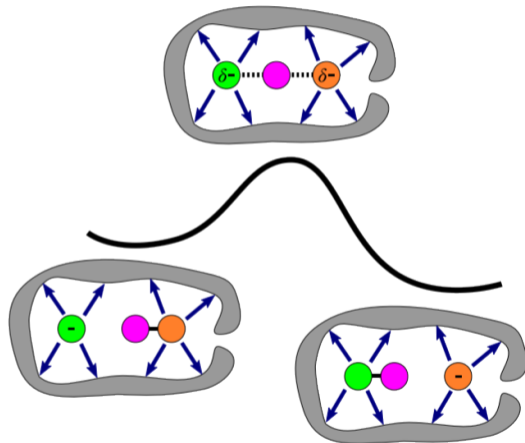
large



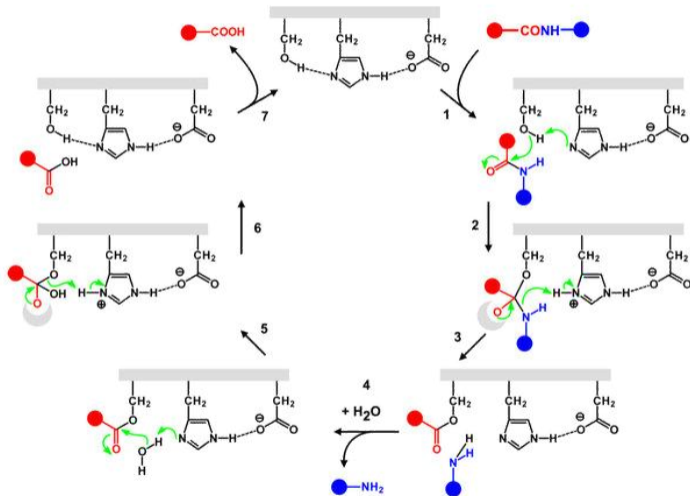
Reaction in Enzyme

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

small small

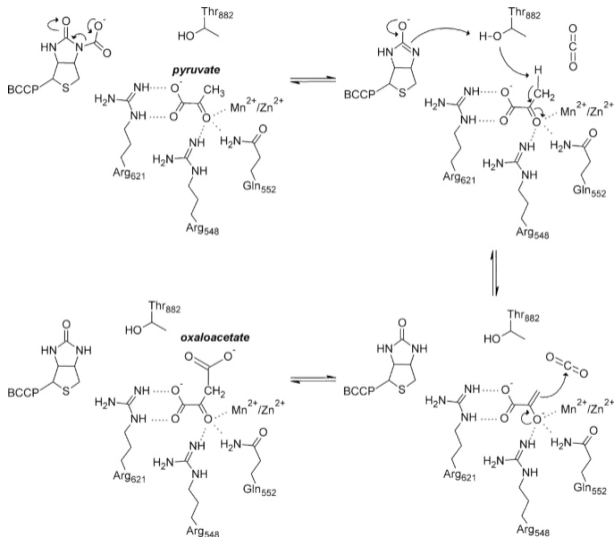


Чаще всего все сложнее



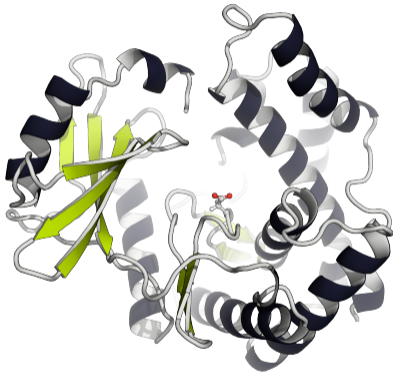
Многостадийный
катализ сериновой
протеазы с
ковалентными
конъюгатами
субстрат-фермент

Чаще всего все сложнее



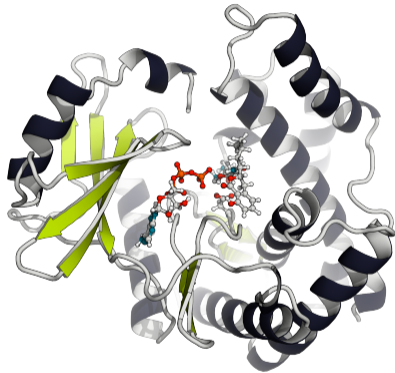
Многостадийный
катализ пируват
карбоксилазы с
кофактором-катионом
металла и
коферментом-биотином

Структурные особенности



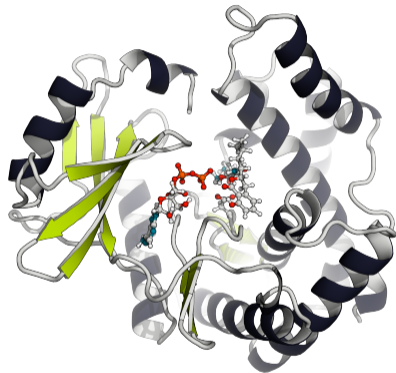
Непосредственно в реакцию вовлечены только 1-3 остатка. Они называются активным центром фермента. Конкретно в этом ферменте в реакции участвует только этот аспарат

Структурные особенности



Остатки активного центра
непосредственно участвуют в реакции с
реагентами

Структурные особенности



Остатки активного центра
непосредственно участвуют в реакции с
реагентами
Зачем нужен весь остальной белок?

Для начала реакции нам надо поймать и
зафиксировать реагенты в правильном
положении
Остатки, которые это делают - это
карман связывания

Активный центр и карманы связывания протеазы



Без триады не будет реакции Какой именно пептид будет разрезан, определяют структуры карманов P1-P3, P1'-P3'

Структурные особенности

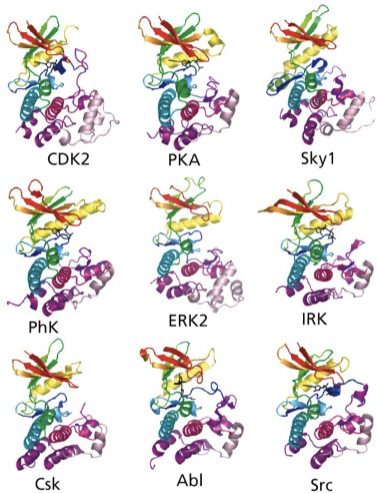


Figure 16.12a The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Модульность: 9 эукариотических киназ (мутации всех замешаны в онкологии).

- Активные сайты одинаковые
- Карманы связывания АТФ одинаковые
- Открытие/закрытие одинаковое
- Карманы связывания субстратов разные

Дизайн и его валидация

Дизайн – создание объекта с заданными функциями

- Создание белка
- Создание гена
- Создание сиквенса

Инструменты дизайна – то, что делает создание сиквенса не случайным

Имеем сиквенс, выполняет ли соответствующий объект функцию?

- Сразу в экспериментальный assay
- Имитация эксперимента – молекулярное моделирование/ML

Инструмент валидации – то, что сопоставляет дизайну оценку его функции (с некоторой ошибкой)

Дизайн и его валидация

Тривиальный вычислительный дизайн

Генерация случайных гипотез и их вычислительная валидация

- Вычислительная валидация хоть и дешевле экспериментальной, но тоже трудозатратна (при отлаженном и предсказуемом пайплайне валидация процессивности одного варианта фермента – неделя на современной рабочей станции)
- Нужно генерировать гипотезы не случайно и иметь многоуровневый процесс валидации от дешевого и неточного этапа до дорогого и точного Создание белка

Задачи дизайна ферментов

(До)-дизайн (тюнинг)

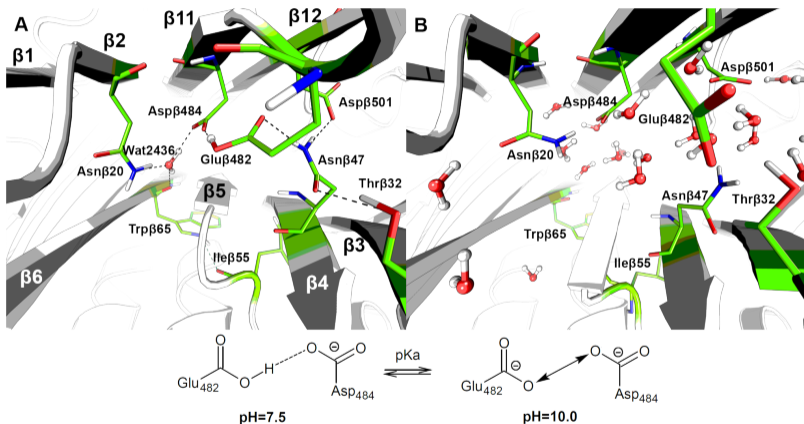
Уже есть стартовый вариант, он качественно делает то, что нужно. Хотим количественного улучшения

- **Редизайн** : Есть стартовый вариант, он делает что-то похожее, но не совсем то, что нужно
- **Де-ново дизайн** Нет никакого стартового варианта

Тюнинг

- Стабильность
- Растворимость
- pH-зависимость стабильности
- pH-оптимум активности
- Улучшение аффинности связывания
- Улучшение константы реакции

pH-зависимость стабильности

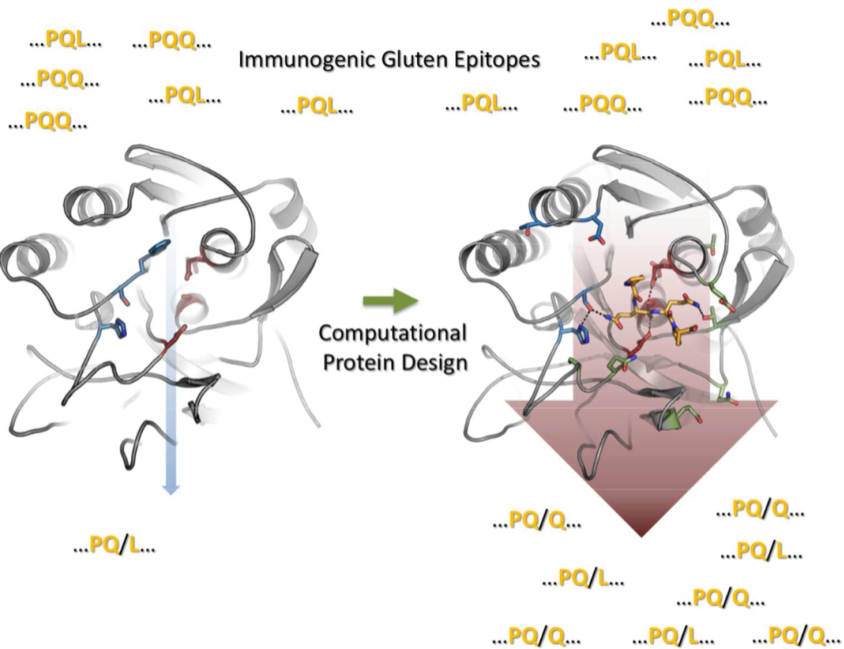


В пенициллин ацилазе в щелочных условиях разрушается водородная связь между E482 и D484. Замена D484N повысила стабильность в щелочной среде в 9 раз.

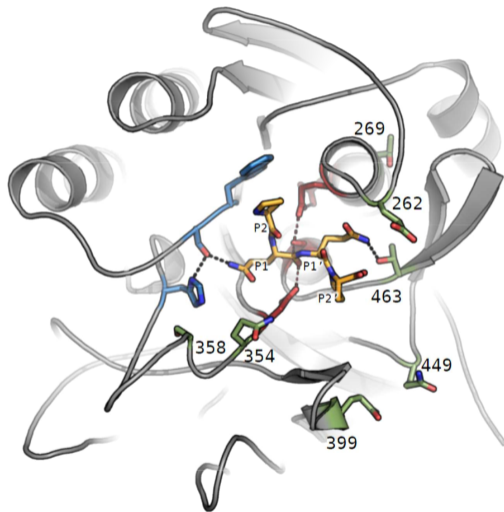
Аффинность

Задача ничем не отличается от улучшения неферментативного кармана связывания (за исключением строгой немутабельности каталитических остатков).

- **Как решаем:** MC перебор с помощью Rosetta
- **Нюанс:** Для ферментов такая задача ставится редко. Гораздо выгоднее понизить барьер активации.



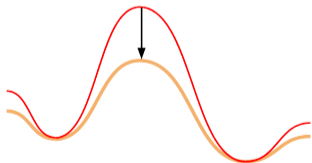
Оптимизация кумамолизина



Стартовая идея о том, как должен располагаться нужный субстрат. Раунды МС перебора остатков фермента вокруг. Допуск небольшой подвижности остова улучшает результаты, но сильно дороже вычислительно.

Константа

- Стабилизация переходного состояния – дизайн непосредственно контактирующих остатков
- Оптимизация путей перераспределения заряда – дизайн электростатического поля, может достигаться заменами в остатках на удалении от субстрата
- Тривиальный дизайн с быстрой валидацией (замена вносится в состояние реагентов, моделируется реакция с оценкой барьера)



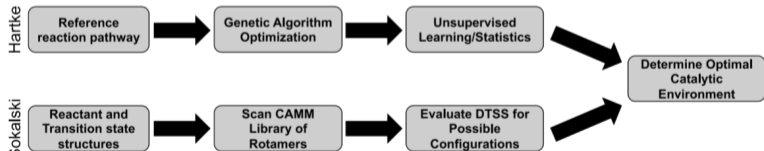
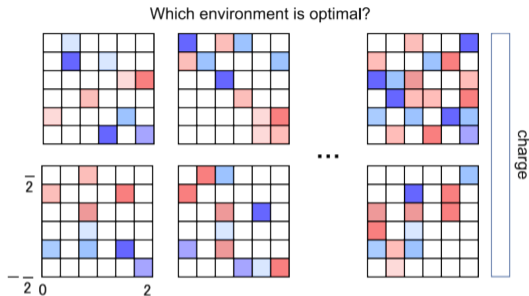
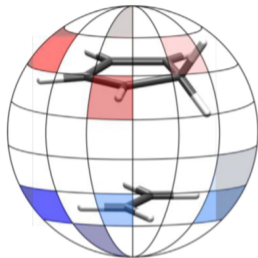
Стратегия 1

Стратегия 1 крайне редко используется для тюнинга

- природные сайты уже максимально оптимизированы эволюционно
- даже если есть теоретическая возможность улучшения, ее размер меньше типичной ошибки силового поля Rosetta

Где используется – редизайн и де-ново дизайн (обсудим дальше).

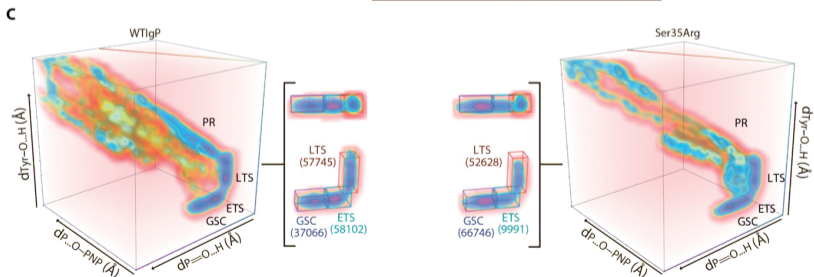
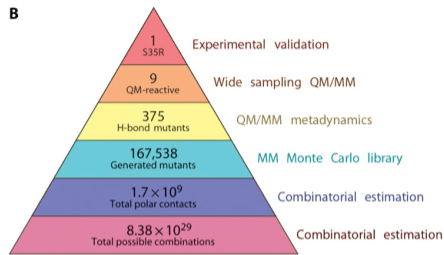
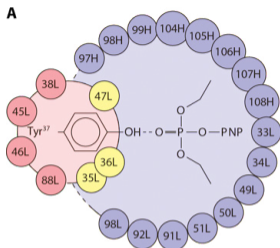
Стратегия 2



Current Opinion in Structural Biology

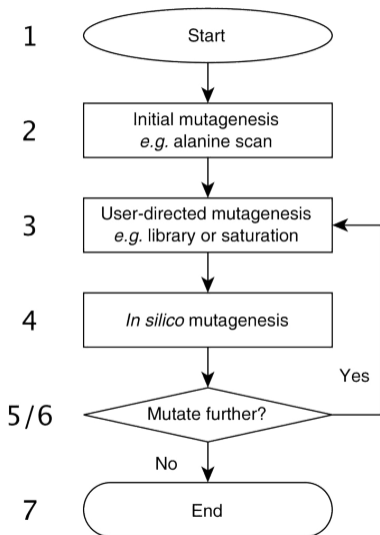
Стратегия “снизу-вверх”. Попытка реконструировать необходимое поле от структуры переходного состояния или от пути реакции. Предложена недавно, показала применимость на модельных системах. Однако пока не применялась для создания нового продукта.

Стратегия 3



Гипотезы о вариантах:
рациональный ручной
выбор
Валидация: QM/MM
метадинамика

Стратегия 3: CADEE

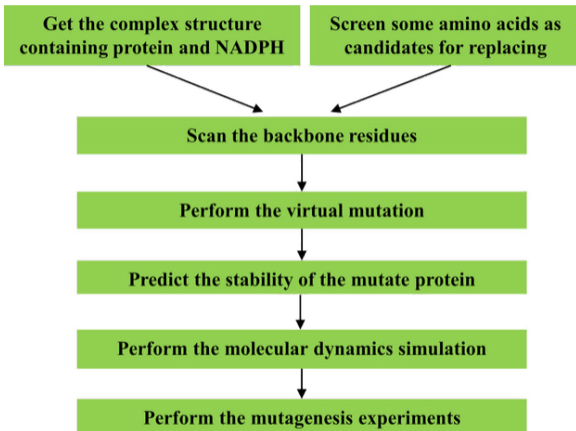


Гипотезы о вариантах:
Ala-сканирование для выявления хотспотов с вычислением барьера с помощью EVB, мутация на все, снова вычисление барьера с помощью EVB
Валидация: вшита в генерацию гипотез (EVB)

Редизайн

- **Как решаем:** Кофакторная специфичность
- **Как решаем:** Субстратная специфичность
- **Как решаем:** Предпочтительный механизм

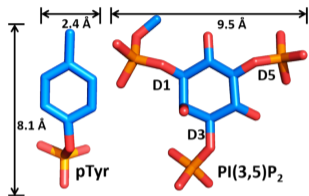
Кофакторная специфичность



Концептуально то же самое, что дизайн кармана связывания
Кейс: фермент работает с НАДФ, а мы хотим заставить работать с НАД, так как в клетке его больше. Или наоборот.
По меньшей мере 33 успешные работы к данному моменту для пары НАД/НАДФ.
Для чего-то еще – исчезающие количества.

Субстратная специфичность

A

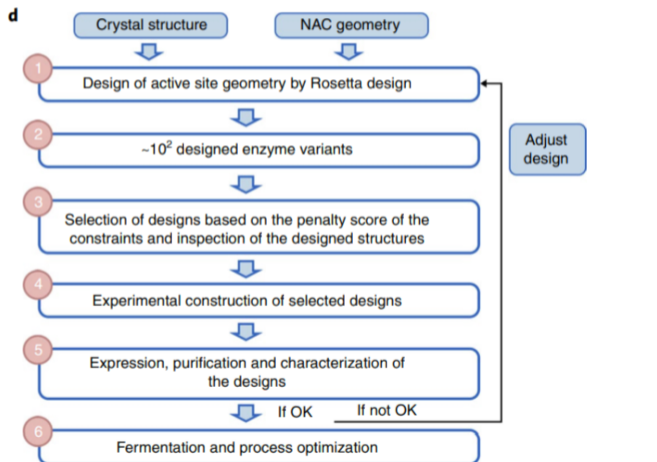
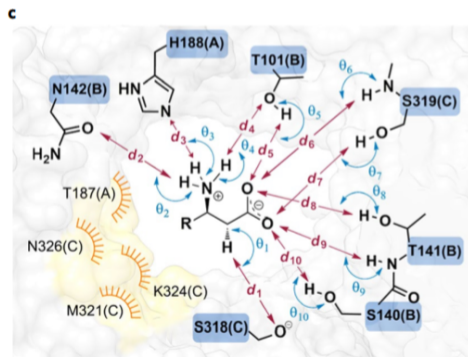
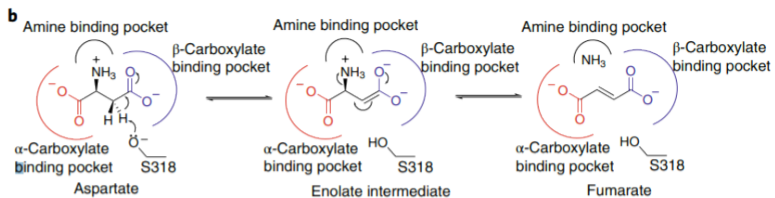
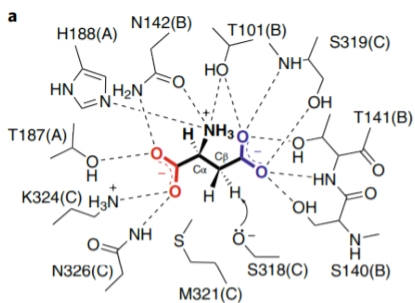


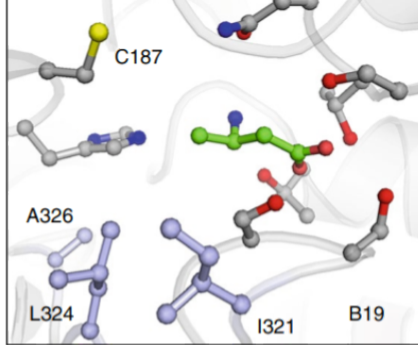
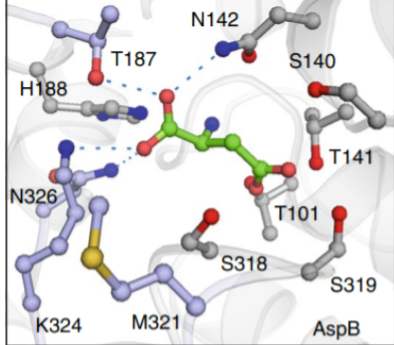
Кейс: тирозин-фосфатаза снимает фосфат с тирозина.

Хотим, чтобы снимала с инозитол-фосфата. Реакция одна и та же – нужно добиться хорошего позиционирования нового субстрата.

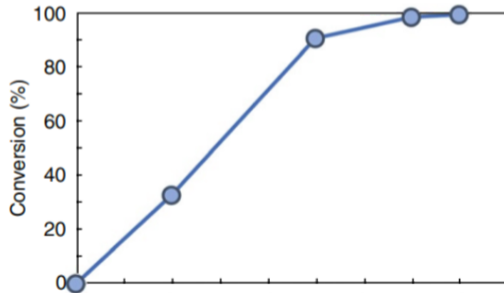
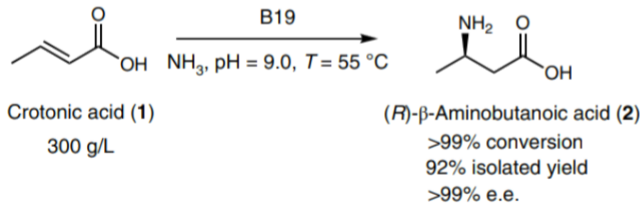
Что делали: Rosetta

Что получили: дизайны с k_{cat}/K_m на 1 порядок хуже, чем для пары дикий тип-фосфотирозин (K_m при этом лучше, k_{cat} сильно хуже), что в целом вин

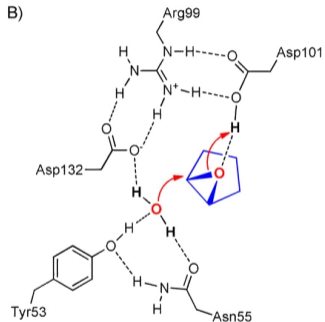




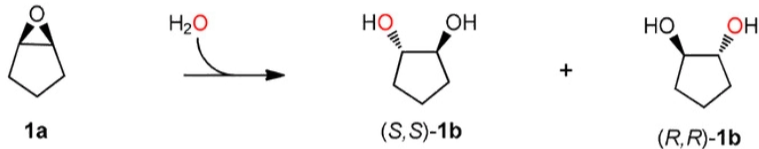
d



Региоспецифичность



Кейс: энантиоселективные варианты эпексид гидролазы



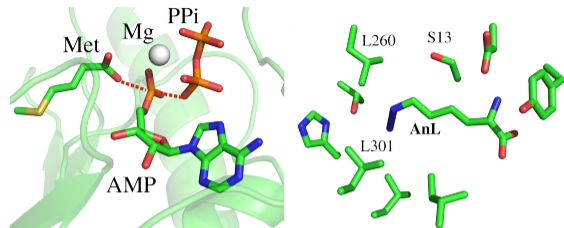
Для каждого варианта нужно обеспечить связывание, приводящее к предпочтительной атаке по нужному атому углерода. Положение атакующей воды лучше не менять, ибо оно уже оптимизировано для низких барьеров.

Как: Rosetta + валидация дизайнов короткими MD

Дизайн субстратной специфичности от структуры TS

Можем заглянуть немного в будущее и оптимизировать непосредственно связывание переходного состояния под версию субстрата.

Кейс: заставить метионил-тРНК синтетазу пришивать вместо метионина что-то другое. Зачем: расширение генетического кода.
Как: Proteus (Wang-Landau MC).



В MC мы ориентируемся на скор, если он улучшается, мы принимаем изменение. Положительное изменение скор не обязательно значит образование взаимодействий с лигандом/TS. Можем сделать предварительный MC скан на аро-ферменте и сконструировать поправку к скору, делающую все замены равнозначными, чтобы отбирать только те замены, которые повышают скор исключительно благодаря взаимодействиям с лигандом/TS.

Де-ново дизайн

Новая молекула с заданной ферментативной функцией

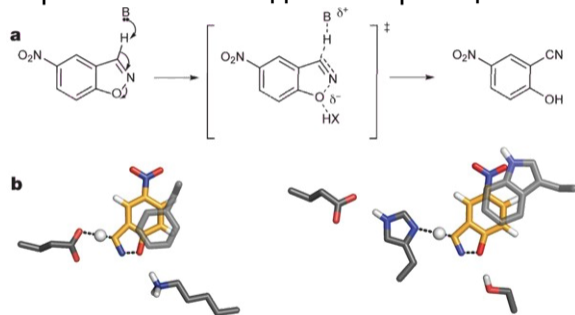
Переходное состояние как лиганд

Допустим, мы уже умеем дизайннить карманы связывания под малые молекулы. Нам нужно

- Описать переходное состояние субстрата как малую молекулу
- Зафиксировать непосредственно участвующие в реакции остатки
- Остатки + переходное состояние = теозим

Задача сводится к поиску места для размещения такого теозима в т.н. структурных матрицах (скэффолдах)

Варианты теозима для этой реакции:

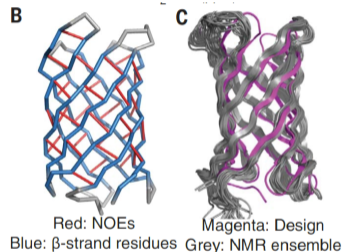


Откуда брать скэффолды?

Допустим, мы уже умеем дизайннить карманы связывания под малые молекулы. Нам нужно

- Весь PDB
- Весь метапротеом + AlphaFold2
- Искусственные скэффолды
Пока умеем делать что-то простое: фолды из элементов надвторичной структуры, простые альфа-пучки, бета-бочонки
- Предковая реконструкция
Идея: современные ферменты – оптимизированные специалисты. Если начнем что-то менять, скорее всего сломаем. Но они произошли от предка-генералиста. Попробуем предсказать его последовательность, получим структуру и возьмем ее за старт наших дизайнов. Описать переходное состояние субстрата как малую молекулу

Хотелось бы воображать скэффолд под конкретный активный центр, но этого пока даже близко нет



Дизайн ферментов: стабилизация TS

Удалось сделать несколько де-ново ферментов (для реакций, не имеющих своего фермента в природе): Кемп-Элиминаза, Дильс-Альдераза

- Только 1 стадия
- Любое число > 0 = успех
- Структура TS получена из KM моделирования Весь PDB

Не известны работы по успешному де-ново дизайну ферментов для сложных реакций (больше 1 стадии, наличие кофакторов/коферментов)

Не удастся улучшить уже имеющиеся ферменты

- Ошибка в вычислении скоры выше, чем ожидаемый результат
- Имеющиеся ферменты это уже итог долгой эволюции – простые решения (например, единичные замены) исчерпаны. Требуется масштабный редизайн
- Очень просто сломать



Стабильность и растворимость

Субстратная специфичность

Региоспецифичность

Де-ново

pH

Улучшение кинетики

Внедрение регуляции