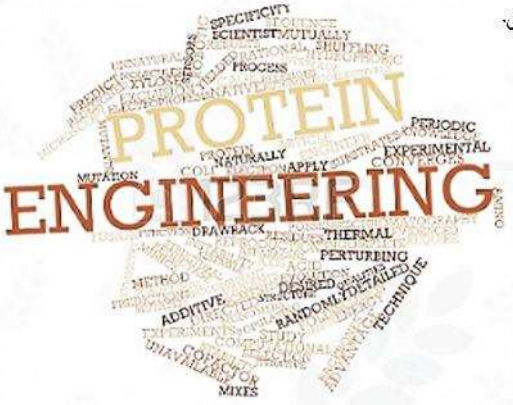
مهندسی پروتئین

هدی سادات کیانی
دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی
پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، تهران

چکیده

پروتئین‌ها صرف این‌که گروه‌های بزرگی از ترکیبات نیتروژونی با وزن مولکولی بالا هستند پایه و اساس بیوتکنولوژی مدرن نیز می‌باشند چراکه آن‌ها قادرند به صورت اختصاصی عمل نمایند که این ویژگی آن‌ها را برای پاسخ‌های بیوتکنولوژی و عملکردی ایده‌آل ساخته‌است. این مواد نقشی حیاتی و مهم در فرآیندهای فیزیولوژیکی بدن دارند. هر پروتئین عملکرد کاملاً دقیق و مشخصی دارد که برای تنظیم، عمل کردن و ساختاریابی بافت‌ها و اندام‌های سلولی بدن لازم و ضروری هستند. مهندسی پروتئین علمی است که به دانشمندان این امکان را می‌دهد تا با تغییر توالی اسیدهای آمینه و به تبع آن تغییر ساختار آن‌ها به عملکرد بسیار بهتری در مورد پروتئین‌های با ارزش و مفید به‌خصوص آنزیم‌ها با عملکرد بالا دست پیدا کنند. فرآیند مذکور متکی به استفاده از فناوری دی‌ان‌ای ترکیب (recombinant DNA technology) برای تغییر توالی آمینواسید است. از مهندسی پروتئین برای تولید آنزیم در مقیاس بزرگ، تولید ترکیبات زیستی و ساخت آنزیم ارشد (Superior enzyme) برای تسریع تولید مواد شیمیایی مشخص در حجم زیاد استفاده می‌شود.

کلمات کلیدی: تکامل جهت‌دار، طراحی پروتئین، مهندسی پروتئین.



مقدمه

تاریخچهٔ مهندسی پروتئین به حدود ۳۰ سال پیش به سمپوزیومی با موضوع evolving gene and protein در دانشگاه Reltger باز می‌گردد. در دهه‌ی ۱۹۷۰ Herbert Boyer و Stanly Cohen بیان نمودند که می‌توان پروتئین‌ها را به صورتی که قبلاً وجود نداشته‌اند تغییر داده و مهندسی نمود. Robert Swanson و Boyer بر اساس تکنولوژی مهندسی پروتئین در سال ۱۹۷۶ شرکت Genetech خود را تأسیس نمودند. از آن زمان تاکنون مهندسی پروتئین بسیار گسترش یافته و بازار اقتصادی گسترده‌ای را به‌دست آورده‌است، به‌طوری که در سال ۲۰۱۷ تخمین زده شد که ارزش این بازار حدود ۱۶۸ میلیارد دلار باشد. مهندسی پروتئین در زمینه‌های مختلفی مانند داروسازی، کشاورزی، محیط‌زیست و غیره کاربرد دارد.

هم‌اکنون روش‌های متفاوت مهندسی پروتئین در توسعه سریع علوم زیستی متداول است. برخی از روش‌های استفاده‌شده در مهندسی پروتئین طراحی منطقی دارند، از جمله فناوری نمایش سطح سلولی (Cell surface display technology)، دینامیک مولکولی و فناوری جهش‌زایی دی‌ان‌ای (DNA shuffling technology).

از فناوری جهش‌زایی برای بهبود یک خاصیت منحصربه‌فرد آنزیمی استفاده می شود. در ضمن، روش‌هایی که طراحی منطقی دارند، بیشتر همان روش‌های کلاسیک در مهندسی پروتئین هستند. مهندسی پروتئین کاربردهای زیادی دارد، از کاتالیست‌های زیستی در کاربردهای غذایی گرفته تا کاربردهای زیست‌محیطی، نانو و زیست‌فناوری و پزشکی. مهندسی پروتئین در صنایع شست‌وشو، صنایع‌غذایی، تولید پلیمرهای زیستی، آنزیم‌ها و پروتئین‌های اکسایش-کاهشی نیز کاربرد دارد. مهندسی پروتئین در کاربردهای پزشکی برای مطالعات درمان سرطان به‌کار می‌رود. آمریکای شمالی بازار کلی مهندسی پروتئین را در دست دارد، علت آن نیز رشد و شیوع سبک زندگی بیماری‌زا و افزایش سازگاری با داروهای پروتئینی در این منطقه است. انتظار می‌رود آسیا- اقیانوسیه نرخ رشد بالایی را در ۵ سال آینده در بازار مهندسی پروتئین داشته‌باشد. در این منطقه چین و هند سریع‌ترین رشد را دارند. علت اصلی رشد مهندسی پروتئین در کشورهای در حال توسعه، حضور جمعیت زیادی از بیماران است که سبب شده‌است سرمایه‌گذاری خصوصی و دولتی برای کشف دارو افزایش یابد.

کلیات طراحی پروتئین یا مهندسی پروتئین

طراحی پروتئین یا مهندسی پروتئین، اشاره به اصلاح توالی پروتئین با استفاده از روش‌های ژنتیکی دارد.

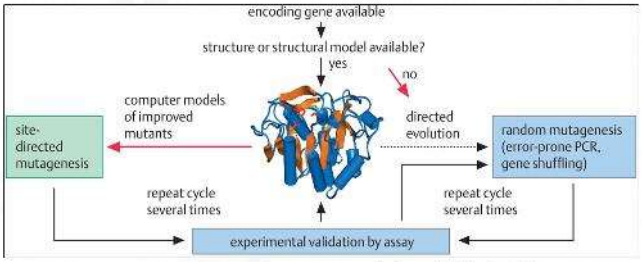
تکنیک‌های مهندسی پروتئین جهت

۱) شناسایی مکانیزم‌های آنزیم

۲) تغییر محل اتصال آنزیم یا آنتی بادی به‌صورت ارادی

۳) تغییر خواص کلی آنزیم، مانند پایداری آنزیم در برابر دمای بالا، pH شدید، پروتئازها، حلالیت آن یا خاصیت آنتی ژنی آن انجام می‌گیرد.

اگر یک ساختار پروتئینی شناخته شده به عنوان نقطه آغازگر استفاده شود و اسیدهای آمینه یا توالی‌های منحصربه‌فرد با محل‌های موتاژنز هدفمند اختصاصی جایگزین شوند، به آن پروتکل طراحی پروتئینی هوشمند گفته‌می‌شود. تبادل ژنتیکی اسید آمینه به‌طور تصادفی و انتخاب بازده توسط خواص بهبود یافته خود، تکامل هدایت شده خوانده می‌شود.



شکل ۱ کلیات طراحی پروتئین و مهندسی پروتئین

- دو استراتژی کلی برای مهندسی پروتئین وجود دارد:

۱- طراحی منطقی پروتئین و ۲- کامل جهت‌دار

محققان اغلب از هر دوی این روش‌ها استفاده می‌کنند. در آینده، شناخت جزئی‌تر ساختار و عملکرد پروتئین و پیشرفت در غربالگری ممکن است بتوانند تا حد زیادی توانایی مهندسی پروتئین را افزایش دهند. حتی ممکن است در نهایت امکان رمزگذاری اسیدآمینه‌های جدید و غیرطبیعی نیز ایجاد شود.

متدهای کلی طراحی پروتئین یا مهندسی پروتئین

هر دو طراحی پروتئین هوشمند و تکامل هدایت‌شده، نیاز به ژن کدگذاری پروتئین دارند. برای طراحی پروتئین هوشمند، اطلاعات ساختاری در مورد پروتئین مورد نیاز است؛ برای آن می‌توان از ساختار اشعهٔ ایکس، از داده‌های ساختاری NMR یا از یک مدل ساختاری حاصل از ساختار سوم پروتئین‌های مرتبط و هماهنگ با مدل‌سازی همولوگ استفاده کرد.

enzyme	method	mutation	effect
detergent protease	rational design	^{222}met→ala	oxidation stable
human insulin	rational design	^{22}lys→pro	slower degradation
tissue plasminogen activator (hTPA)	rational design	deletion of kringle 2	slower degradation
penicillin acylase	directed evolution	5 positions	better solvent stability
P450 fatty acid hydroxylase	directed evolution	4 positions	greatly modified substrate specificity

شکل ۲- مثال‌هایی از طراحی پروتئین یا مهندسی پروتئین

۱- طراحی منطقی پروتئین (Rational protein design)

۱-۱- طراحی منطقی پروتئین (Rational protein design) یا Knowledge based

در این طراحی از اطلاعات ساختاری و عملکردی پروتئین مورد نظر که از تحقیقات قبلی بدست آمده‌است جهت ایجاد تغییرات مطلوب در پروتئین مانند بهبود یا تغییر ساختار پروتئین یا خصوصیات عملکردی آن استفاده می‌گردد. به این روش protein redesign نیز گفته می‌شود.

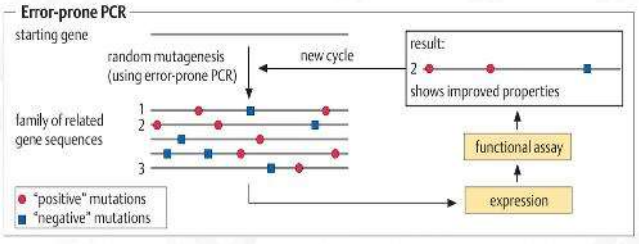
اولین پروتئین‌های طراحی شده به این روش، پروتئین‌های tyrosyl-transfer RNA synthetase (TyrRS) و بتالاکاتاماز در دهه ۱۹۷۰ و ۱۹۸۰ است. این روش از زمانی که روش site direction mutagenesis گسترش یافته‌است به تکنیکی ساده و ارزان قیمت تبدیل گردیده‌است. در هرحال عیب این روش این است که اغلب اطلاعات ساختاری زیادی در مورد بسیاری از پروتئین‌ها موجود نمی‌باشد و حتی اگر موجود باشد پیشگویی تأثیر موتاسیون‌های مختلف برروی ساختار یا عملکرد پروتئین بسیار سخت می‌باشد. توسعه علوم کامپیوتر و بالا رفتن قدرت محاسباتی کامپیوترها و پیشرفت ابرکامپیوترها و همچنین پیشرفت در الگوریتم‌های طراحی پروتئین، forcefield و بیوانفورماتیک ساختاری مانند کتابخانه‌های کنفورماسیون اسیدهای آمینه در دهه‌های ۱۹۹۰ باعث توسعه طراحی پروتئین به روش محاسباتی شد. این روش به‌طور کلی با ایجاد جهش در پروئین‌ها در شرایط in silico پروتئین‌های مختلفی را با رزولوشن بالا طراحی نموده و سپس پروتئین‌های طراحی شده از نظر انرژی جهت یافتن پروتئین‌های بهینه از نظر خواص فیزیکی و شیمیایی مورد نظر مانند پایداری، اختصاصیت یا فعالیت آنزیمی ارزیابی می‌کند.

پروتئین‌های بهینهٔ بدست آمده در شرایط in silico در شرایط آزمایشگاهی از نظر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مورد نظر نیز بررسی خواهند شد. به‌دلیل آن‌که روش طراحی پروتئین به صورت منطقی دارای فضای جستجو وسیع و محاسبات پیچیده‌ای

است که انجام این نوع محاسبات به‌صورت دستی غیرممکن می‌باشد به‌همین دلیل امروزه استفاده از طراحی محاسباتی پروتئین در زمینه طراحی پروتئین به امری ضروری تبدیل شده‌است و به‌عنوان اولین گام در طراحی منطقی پروتئین قرار دارد چراکه این روش باعث کاهش چشمگیر در حجم کارهای آزمایشگاهی و هزینه‌ها می‌گردد. مهم‌ترین چالش در زمینه طراحی محاسباتی پروتئین، دقت و سرعت آن است. امروزه الگوریتم‌های بسیاری موجود است که با دقت و سرعت قابل قبولی قادر به طراحی پروتئین می‌باشند.

موتاژنز طراحی پروتئین یا مهندسی پروتئین

در طراحی پروتئین‌های هوشمند، اسیدآمینه‌های منحصربه فرد، مبادله یا یک توالی آمینواسیدی اضافه یا حذف می شود. این فرآیند در سطح DNA و توسط PCR انجام می شود. پروتکل‌های متعددی در دسترس هستند که انجام این تغییرات را با روش‌های سریع، ساده و قابل اطمینان امکان پذیر می‌سازد. برای موتاژنز تصادفی، ژن را می‌توان در یک سلول میزبان E.coli کلون کرد که مکانیزم‌های اصلاح DNA آن مختل شده و تحت شرایط جهش‌زا کشت داده می‌شود. سپس یک پروتکل PCR به‌کار گرفته می‌شود که در آن با اضافه کردن یون‌های Mn^{2+} یا مواد دیگر باعث افزایش تعداد اشتباه های ساختگی در طول افزایش DNA می‌شود (۱ تا ۳٪). روش جابجایی ژن (Gene shuffling)، یکی دیگر از روش‌هایی است که بر اساس ایجاد یک کتابخانه قطعات DNA از ژن‌های مرتبط (تطابق توالی آن‌ها حدود ۸۰ درصد) و ترکیب مجدد قطعات با روش PCR، و سپس غربالگری با توان بالا برای خواص مطلوب انجام می گیرد.



شکل ۳- طراحی پروتئین از طریق موتاژنز تصادفی

۱-۲- طراحی پروتئین به روش De novo

از این روش طراحی پروتئین زمانی که تنها اطلاعات توالی پروتئین موجود باشد یا از ساختار پروتئین‌های شناخته شده به عنوان scaffold های طبیعی جهت ایجاد یک خصوصیت جدید در پروتئین مانند خصوصیت کاتالیستی، مهاری یا اتصال به فلزات استفاده می‌گردد. طراحی محاسباتی پروتئین نیز در این زمینه به‌منظور کاهش هزینه و زمان توسعه یافته‌است. اولین پروتئین موفقیت آمیز طراحی شده به‌روش de novo در سال ۱۹۹۷ توسط Stephen Mayo و همکاران انجام گردید. اندکی پس از آن اسکیم پتر و همکاران (Skim Pete et al., ۱۹۹۹)، دایمر، ترایمر و تترامری از یک کویل، کویل راست گرد غیرطبیعی را طراحی نمودند. در سال ۲۰۰۳ آزمایشگاه دیوید بیکر (David Baker) یک پروتئین را به‌صورت کامل فولد نموده که قبلاً در طبیعت مشابه آن وجود نداشته‌است. پس از آن در سال ۲۰۰۸ گروه بیکر آنزیم‌هایی را به‌صورت محاسباتی جهت دو واکنش متفاوت طراحی نمودند. در سال ۲۰۱۰ نیز یکی از مهم‌ترین آنتی بادی های خنثی کننده از سرم بیماران با استفاده از پروب‌های پروتئینی طراحی شده به‌روش محاسباتی جداسازی شد.

طراحی پروتئین هوشمند

ساختار سوم پروتئین معمولاً توسط کریستالوگرافی اشعه ایکس و گاهی توسط تکنیک‌های NMR سه بعدی از پروتئین‌های C 13- و N 15- حاصل می‌شود. از سال ۲۰۱۴، مختصات بیش از ۱۰۰۰۰۰ ساختار پروتئین در (ProteinDatabase (PDB موجود است که از طریق اینترنت به شکل بین المللی قابل دسترسی هستند. اگر توالی پروتئین مدنظر، بیش از ۳۰ درصد همولوژی با پروتئینی که مختصات آن دردسترس است نشان دهد، مدل‌سازی همولوژی از ساختمان ناشناخته‌ای که بر اساس مختصات شناخته‌شده انجام شده یک مدل ساختاری از پروتئین ناشناخته را فراهم می‌کند که برای آزمایشات جهش‌زایی به اندازه کافی دقیق است.

تاکنون، با توجه به قدرت محدود کامپیوتر، چنین شبیه‌سازی تنها در خلأ امکان‌پذیر بود. با ظهور ابرکامپیوترها و کامپیوترهای بسیار موازی، مدل‌سازی ساختار پروتئین، پروتئین‌های جهش یافته و اتصال آن‌ها به سوبسترا یا آنتی‌ژن‌ها می‌تواند در حلال انجام شود (برای این منظور ممکن است محاسبات مکانیک مولکولی (محاسبات نیروی میدان) از تعاملات چند ده تا هزاران اتم مورد نیاز باشد). با وجود پیشرفت، پیش‌بینی‌هایی که از این روش‌ها در روش‌های نرم افزاری حاصل می‌شود، بایستی معمولاً با چندین دوره شبیه‌سازی و آزمایش‌های ژنتیکی (چرخه های مهندسی پروتئین) بهینه شوند. طراحی پروتئین اغلب با جایگزینی همه اسیدهای‌آمینهٔ پروتئین‌زا در محل‌هایی همراه است که با جای خالی سوبسترا یا با توجه به بررسی‌های آنالوژی به عنوان

محل‌های مربوطه، برای اتصال یک سوبسترا (اشباع موتاژنز) انتخاب‌شده‌اند.

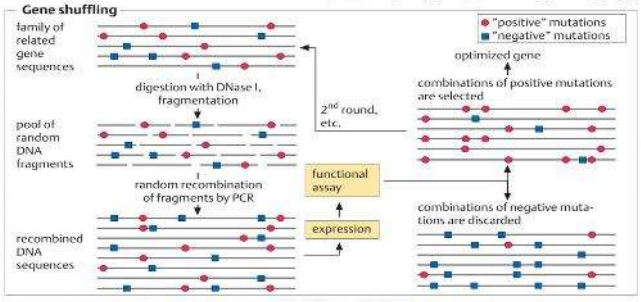
۲- طراحی پروتئین به‌روش directed evolution

این روش نیاز به داشتن اطلاعات کافی از ساختار و مکانیسم عمل پروتئین وجود ندارد. در روش directed evolution خصوصیات مطلوب در پروتئین از طریق موتاسیون‌های تصادفی یا ژن نوترکیب به‌دست می‌آید. سپس از میان کتابخانه براساس خصوصیت مورد نظر موتاسیون‌ها یا نوترکیب‌ها غربالگری و انتخاب می‌شوند. به صورت کلی این روش دارای کمبودهایی در مقایسه با روش محاسباتی de novo می‌باشد. به‌منظور کاهش فضای جستجو در این روش زراعی استراتژی‌های محاسباتی جهت انجام غربالگری یا انتخاب به‌روش in silico توسعه یافته است.

تکامل هدایت شده طراحی پروتئین یا مهندسی پروتئین

همان طور که گفته شد در این روش برخلاف طراحی پروتئین هوشمند، مدل‌های ساختاری برای این تکنیک ضروری نیستند. برای بهینه سازی اتصال آنتی‌بادی‌های انتخابی، تکنیک نمایش فاژ (phage display) به‌طور مؤثر مورد استفاده قرارگرفته‌است. این کار اجازه می‌دهد تا کتابخانه‌های بزرگ از آنتی‌بادی‌های جهش یافته (تا ۱۰۱۰) غربالگری شوند. در مورد آنزیم‌ها، ژن کدگذار تحت جهش‌زایی تصادفی قرار می‌گیرد، ژن‌های جهش یافته در یک کتابخانه جهش یافته بیان می‌شوند و جهش ها برای خصوصیات مدنظر مورد بررسی قرارمی‌گیرند.

با برنامه‌های جهش‌زایی اشباع مکرر، رویکردهای هدفمندتر برای بررسی توالی پروتئین بزرگ به‌سرعت در دسترس قرار می‌گیرد. بررسی کیفیت آنزیم از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است چرا که سرعت ایجاد و همچنین کیفیت جهش را تعیین می‌کند. در سال‌های اخیر، این روش نتایج خوبی برای توسعه آنزیم‌های صنعتی به ارمغان آورده‌است. برای مثال در تغییر سوبسترای اختصاصی آن‌ها یا ثبات ترمو و آلکالی آن‌ها، سیستم های رباتیک یا تجهیزات (flow-activated cell sorters) FACS برای این روش‌ها مورد استفاده قرار گرفته است.



شکل ۴- تکامل هدایت شده طراحی پروتئین

نتیجه‌گیری

افزایش سبک زندگی بیماری‌زا، سازگاری با داروهای پروتئینی را نسبت به داروهای غیرپروتئینی و سرمایه‌گذاری را در مهندسی پروتئین افزایش و هزینه کشف دارو را کاهش داده‌است. بنابراین ما شاهد رشد بازار مهندسی پروتئین در سطح جهان خواهیم بود. با این وجود، نیاز به ترمیم و مراقبت زیاد و هزینه بالای ابزارآلات در مهندسی پروتئین، نیاز به محققینی آموزش‌دیده و شایسته را دیکته می‌کند. فروش بالای داروهای زیستی در آینده نزدیک و جا افتادن پروتئین درمانی به جای ژن‌درمانی، دو عامل مهمی هستند که انتظار می‌رود بازاری پر رونق و جهانی برای مهندسی پروتئین بسازند.

منابع:

Fleishman, S. J., & Plückthun, A. 2015. Editorial overview: Protein design and evolution-new protein architectures, evolutionary fine-tuning and analysis.

Gainza, P., Nisonoff, H. M., & Donald, B. R. 2016. Algorithms for protein design. Current opinion in structural biology, 39, 16-26.

Höcker, B. 2014. Design of proteins from smaller fragments—learning from evolution. Current opinion in structural biology, 27, 56-62.

Höcker, B., & Midelfort, K. 2014. Designing protein function-macromolecular design. Journal of structural biology, 185(2), 135.

Koepnick, B., Flatten, J., Husain, T., Ford, A., Silva, D. A., Bick, M. J., Estep, R. D. 2019. De novo protein design by citizen scientists. Nature, 1.

Kumar, A., Ranbhor, R., Patel, K., Ramakrishnan, V., & Durani, S. 2017. Automated protein design: landmarks and operational principles. Progress in biophysics and molecular biology, 125, 24-35.

Linder, M. 2012. Computational Enzyme Design: Advances, hurdles and possible ways forward. Computational and structural biotechnology journal, 2(3), e201209009.

Liszewski, K., 2015. Speeding Up the Protein Assembly Line. Genetic Engineering & Biotechnology News, 35(04), pp.1-10.

Woolfson, D. N., Bartlett, G. J., Burton, A. J., Heal, J. W., Niitsu, A., Thomson, A. R., & Wood, C. W. 2015. De novo protein design: how do we expand into the universe of possible protein structures? Current opinion in structural biology, 33, 16-26.

نام فارسی: **جو پیازدار**
نام علمی: *Hordeum bulbosum*
نام انگلیسی: Bulby barley
خانواده: گندمیان (*Poaceae*)
چرخه زندگی: چند ساله
مسیر فتوسنتزی: سه کربنه (C۳)

زبانک: زبانک کوتاه و حالت پارگی دارد.
گره: محل گره نسبتاً برجسته
نحوه تکثیر: جنسی و غیر جنسی
گل آذین: سنبله و افراشته (Spike)
لما: به ریشک ختم شده و ریشک‌ها کوتاه
پیاز و قسمت پایینی ساقه: قرمز متمایل به قهوه‌ای

Photos taken by: Mahdi Ghafari (Ph.D student of weed science)

نام فارسی: **قیچ لوبیایی**
نام علمی: *Zygophyllum fabago*
نام انگلیسی: Syrian bean caper
خانواده: قیچیان (*Zygophyllaceae*)
چرخه زندگی: چند ساله

ساقه: بلند و نسبتاً خشبی
برگ: تقریباً بیضی شکل
گل: کوچک، ترکیبی از رنگ سفید و نارنجی
میوه: به شکل غلاف
بذر: لوبیایی شکل، نسبتاً تخت و به رنگ قهوه‌ای

Photos taken by: Mahdi Ghafari (Ph.D student of weed science)