سحر بویه فر،دانشکده علوم و فناوری های نوین دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی
دکتر طاهره ناجی،دانشکده علوم و فناوری های نوین دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی

پیشرفت های اخیر در زمینه روش های منطقی در مهندسی آنزیم

آنزیم ها جایگزین های جذابی در پیوندهای نامتوازن محسوب می شود. برای تامین نیازهای زیست فن اوری صنعتی و نیز در جهت معرفی کاربرد های جدید، آنزیم ها نیازمند ارتقا توسط مهندسی پروتئین هستند. در این مقاله به صورت تخصصی به مرور روش های منطقی برای مهندسی آنزیم و طراحی آنزیم de novo پرداخته می شود که شامل روش های ساختار محوری است که در سال های اخیر برای بهبود عملکرد آنزیم ها، گستره های توسعه یافته تری از اجزای مورد عمل و نیز خلق کاربرد های بدیع برای رسیدن به محصولاتی با ارزش افزوده بالا در کاربرد های صنعتی ارائه شده است.

پیوند ترکیبات کایرال چالشی در علم شیمی است. آنزیم ها با توجه به تاثیر گذاری، انانتیو گزینشی و نیز نداشتن تاثیرات مخرب بر محیط زیست، اغلب نسبت به کاتالیست های غیر آنزیمی برتری دارند. با وجود اینکه آنزیم های طبیعی زیست کاتالیست های چند کاره ای محسوب می شود که به کاتالیز کردن محدوده وسیعی از واکنش های شیمیایی می پردازد، با این حال در راستای نیاز های نقش طبیعی خود متحول شده اند. از این رو برای بسیاری از تبدیل ها و اجزای مورد عمل مرتبط با صنعت، در دسترس نیستند و همچنین نیازهای متعدد آنزیم های استفاده شده در بیوتکنولوژی صنعتی را بر آورده نمی کنند. آنزیم ها باید دارای اکتیویته بالا و نیز اختصاصی بودن و انانتیو گزینشی در جهت اجزای مورد عمل باشند. بعلاوه، آنها باید در طول مدت ذخیره ثابت مانده و نیز در برابر واکنش های سخت متعدد از قبیل دمای بالا، pH شدید، تراکم بالای اجزای مورد عمل/ محصول و حلال های ارگانیک مقاوم باشند. از این رو، برای رسیدن به این معیارها امروزه آنزیم ها به طور روتین به وسیله مهندسی آنزیم برای استفاده در ترکیبات ارگانیک ارتقا می یابد. نمونه های منتشر شده بی شمار بوده و علاقه مندان می توانند به مقالات عالی متعدد و کتب مختلف در مورد مهندسی پروتئین و کاربرد آنزیم های مهندسی شده در ترکیبات ارگانیک مراجعه کنند.

وضعیت فعلی مهندسی پروتئین

به طور کلی دو استراتژی مهم برای مهندسی پروتئین وجود دارد: تکامل جهت داده و طراحی منطقی که می توان آنها را ترکیب و به طراحی نیمه منطقی و یا تکامل جهت داده متمرکز تبدیل کرد. تکامل جهت داده از طریق دو روش عمده به دست می آید، بوسیله ترکیب مجدد مجموعه ای از رشته های مرتبط به صورت اتفاقی (بعنوان مثال آمیختن ژن) و یا به وسیله اعمال تغییرات اتفاقی به رشته های پروتئین منفرد (بعنوان مثال PCR در معرض خطا). مزیت تکامل جهت داده این است که هیچ گونه اطلاعات ساختاری مورد نیاز نیست و دیگر اینکه تغییرات را می توان در محل های غیر منتظره دور از سایت فعال اعمال کرد. با این وجود، معمولا تغییرات کوچک بود و لازم است چندین دوره از تکامل به کار برده شود و از این رو تعداد زیادی از متغیر ها باید غربال شود که این خود انرژی و زمان بر بوده و و نیازمند غربالگری های سریع، ارزان، مطمئن و با توان عملیاتی بالا است. با در دسترس بودن تعداد رو به رشد ساختارهای پروتئینی و یا مدل های مطمئن و نیز داده های بیوشیمی و روش های محاسباتی، مهندسی آنزیم در حال تحول و پیشرفت از روش های تصادفی (تکامل جهت داده) به طراحی منطقی یا نیمه منطقی(داده محور) است. در داده های بیوشیمی طراحی منطقی، ساختارهای پروتئینی و داده های مدلسازی مولکولی برای ارائه جهش یافتگی ها مورد ارزیابی قرار می گیرد که توسط جهش زایی مخصوص سایت اعمال

می شوند. یکی از مزیت های روش طراحی منطقی، احتمال بالای جهش های سودمند و کاهشی به خصوص در اندازه مخزن ژن و در نتیجه صرف انرژی و زمان کمتر برای غربالگری مخزن است. این مزیت در صورتی پر رنگ تر می شود که هیچ سیستم غربالگری با توان بالا موجود نباشد. طراحی نیمه منطقی مزیت های طراحی پروتئینی تصادفی و منطقی را ادغام کرده و موجب ایجاد مخزن های ژنی کوچک تر مبتنی بر دانش به دست آمده از داده های ساختاری و یا بیوشیمیایی می شود. نمونه ای برای روش نیمه منطقی CASTing است (تست ترکیبی اشباع ناحیه فعال)، که از اطلاعات به دست آمده از داده های ساختاری برای شناسایی آمینو اسید ها در نواحی جالب توجه (به عنوان مثال ناحیه فعال) استفاده می کند و سپس به صورت تصادفی و یا بوسیله موتانژ اشباع محل به صورت تک به تک و یا ترکیبی جهش پیدا می کنند. ترکیب تصادفی جهش ها و یا جهش های مرتبط در محل های هدف می تواند منجر به اثرگذاری های دوگانه شود که احتمالا در موتانژ مختص به محل منفرد دچار فقدان شده بود. با این وجود، این روش های ترکیبی به طور چشمگیری موجب افزایش در اندازه مخزن شده و روش های محاسباتی متعددی در سال های اخیر ارائه شده اند که به کاهش در اندازه مخزن از طریق غربال مخازن بالقوه و حذف جهش هایی که برای چین خوردگی پروتئین بنظر غیر سودمند می رسید کمک می کنند.

طراحی آنزیم de novo

آنزیم های جدید می تواند هم بوسیله ایجاد مجدد آنزیم های شناخته شده در پروتئین ها با چین خوردگی متفاوت و یا به وسیله اعمال فعالیت هایی که قبلا در آنزیم های طبیعی شناخته شده نبودند در یک داربست پروتئینی انتخابی طراحی شوند. بزرگ ترین چالش با وجود این، طراحی آنزیم های De novo است که بر مبنای توالی های طبیعی نیستند. از این رو باید پروتئین کامل از ابتدا طراحی شود. بسیاری از روش های طراحی آنزیم De novo وابسته به روش های محاسباتی است که در دو دهه گذشته رشد و ارتقا یافته است. در روش های تعریف شده در این مقاله، نیاز به دانشی دقیق از مکانیزم واکنش و وضعیت تبدیل برای پیش بینی این که چه آمینو اسید هایی در چه محل ها و یا چه فاصله ای برای شکل دهی یک محل عمل و نیز کاتالیز واکنش شیمیایی مطلوب لازم است، وجود دارد.

در روشی که توسط آزمایشگاه Baker ارائه شده است در اولین قدم مدل های ایده ال یک وضعیت تبدیل آنزیمی به وسیله استفاده از محاسبات مکانیکی کوانتوم یا theo-zymes ایجاد می شود که در قدم بعدی در داربست های پروتئینی گنجانده می شود و از مخزن چین خوردگی ها شناسایی شده و می توانند آمینو اسید های محل عمل را بدون برخورد تطبیق دهند. با این وجود معمولا هیچ تناسب کاملی وجود ندارد از این رو انحرافات نامتراکمی از هندسه theozyme را باید بپذیریم.

یک احتمال دیگر SABER (انتخاب محل های پیوند/ فعال برای بازطراحی آنزیم) را ارائه می دهد که روشی محاسباتی است و به وسیله آزمایشگاه Houlk ارائه شده و کاربرد آن جستجو برای ساختارهایی است که در آن اسید های ضروری وجود داشته و تنها نیاز به گنجانده شدن زیر بستر در هندسه وضعیت تبدیل خود دارد. در نهایت در هر دو روش زنجیره های جانبی احاطه کننده به منظور واکنش های مطلوب با مدل وضعیتی و ثبات چین خوردگی پروتئین بهینه سازی می شود.

Metalloenzymes های مصنوعی

Metalloenzymes های مصنوعی پلی بین بیوکاتالیز و مجموعه های تبدیل-فلز به وسیله یکپارچه سازی تبدیل فعال در داربست پروتئینی محسوب می شود که باعث انتخاب و فعالیت بالا می شود. روش های متعددی در مورد چگونگی دست یابی به آن وجود دارد که می توان آنها را به دو دسته مهم تقسیم کرد. استحکام غیر کوالانتی که در آن پیوستگی یک پروتئین برای فلز استفاده می شود و یا واکنش های پروتئینی زیر بستر دارای پیوستگی مورد استفاده قرار می گیرد و نیز تعدیل کووالانتی. محدوده یون های فلزی که می توانند در محل عمل یکپارچه شوند باعث افزایش محدوده تبدیلات شیمیایی کاتالیز شده به وسیله آنزیم می شود. برخی آنزیم ها از خود فعالیت های بی قاعده به دلیل یون های فلزی متفاوت موجود در محل عمل نشان می دهند. در برخی موارد یون های فلزی ذاتی در پروتین های فلزی طبیعی با موفقیت با یون های فلزی متفاوت تبادل شدند و در نتیجه واکنش به وسیله آنزیم تغییر پیدا کرد. آنهیدراز کربونیک II آنزیم فلزی روی با Zn^{2+} است که با سه باقی مانده His واکنش نشان می دهند. نقش فیزیولوژیک ان کاتالیز

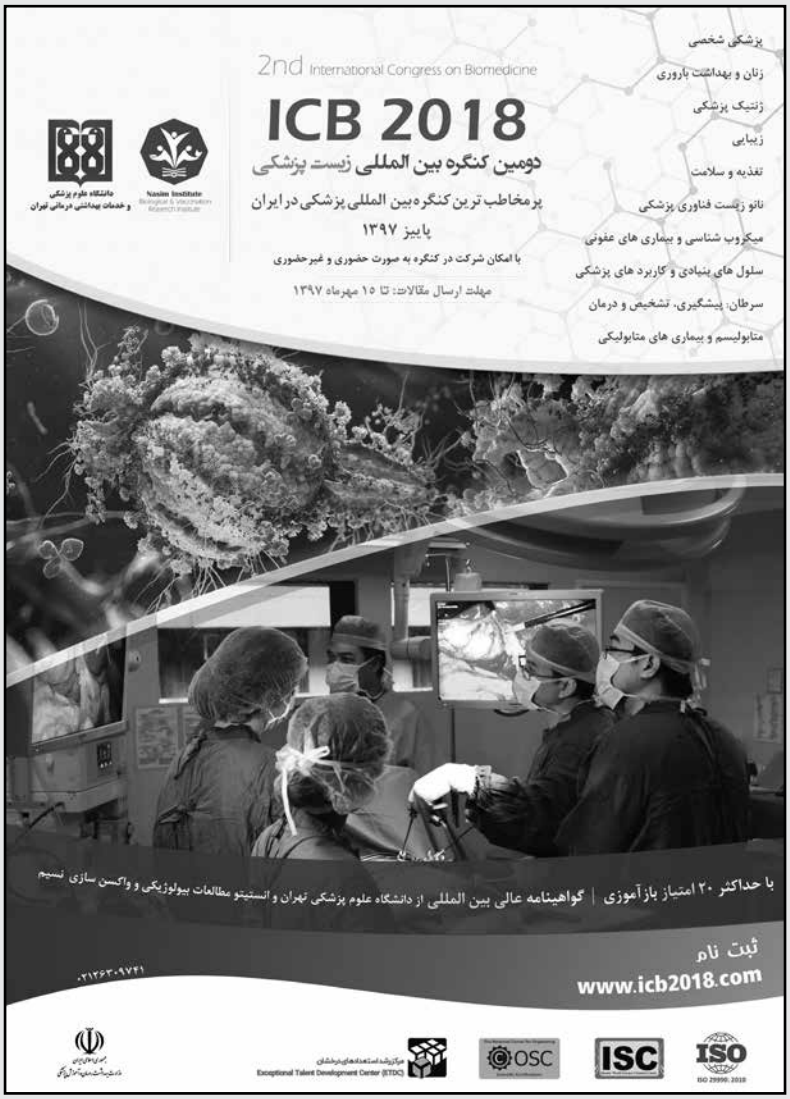
آب پوشی دی اکسید کربن برگشت پذیر با مقداری نزدیک به حد نفوذ است. با این وجود آنهیدراز کربونیکII همچنین نشان دهنده فعالیت استراز بی قاعده است. جابجایی روی در آنهیدرازکربونیک انسانی به وسیله Mn^{2+} منجر به پراکسیداز شد که اکسیداسیون odiantisidine با مقدار ۱,٤ در ۱۰ به توان ٦ را در حضور بی کربنات و پراکسید هیدروزن آنالیز می کند. همچنین اپوکسی داسیون اولفین ها با وجود تنها انانتیوگزینشی کم به متوسط را باعث می شود نشان داده شد که آنهیدراز کربونیک جایگزین شده با رودیوم، باعث القای هیدروژناسیون استریو گزینشی شد. همچنین باعث کاتالیز هیدروفرمولاسیون اولفین ها با ۸.٤ regioselectivity برای خطی شدن بر محصول الدهید می شود که این کار برعکس Rh غیر پیچیده است که نتیجه آن عمدتا محصول شاخه ای است. تبادل یون فلزی در Zn^{2+}-dependent β-lactamase از Stenotrophomonas به Cu^{2+} منجر به فعالیت لاکتاماز ۱۰ برابر کمتر و فعالیت جدید اکسیدازی بی قاعده در جهت catechol شد. این فعالیت اکسیدازی سپس به وسیله موتانژ مخصوص محل برای ثابت نگه داشتن پیوستگی یون Cu در محل دومین پیوند فلزی ارتقا پیدا کرد. گزینه دیگر ایجاد محل پیوند فلزی جدید در پروتئین میزبان به وسیله اعمال پیوستگی آمینو اسید ها در محل های مناسب هندسی پروتئین است. Reetz و همکارانش دو باقی مانده His در پروتئین با ثبات دمایی tHisF، زیر بخش سینتاز یک گلیسرول فسفات امیدازول از Thermotoga maritima برای ایجاد یک واحد تکراری کربکسیلات برای پیوند Cu را ارائه دادند. آنها نشان دادند که انتخاب یک مدل Diels-Alder cycloaddition با کاتالیست پروتئینی cu در مقایسه با cu تنها موجب ارتقا می شود. روشی مشابه از Lu و همکاران، ارائه شد که در آن سه هیستیدین و یک گلوتاماد یا دو هیستیدین و یک گلوتاماد برای ایجاد یک مرکز آهن غیر هم در میوگلبین نزدیک کوفاکتور هم غیر متغیر برای طراحی ریداکتاز اکسید نیتریک NOR استفاده می شد که این روش می تواند به درک از مکانیزم رویداد طبیعی NOR ها کمک کند. هر دو آنزیم ها NO را به N_2O تبدیل کردند و این گونه مشاهده شد که میوگلبین از خود فعالیت ریداکتاز نیتریت ضعیفی نشان می دهد. ساختار اشعه ایکس NiR موقعیت و مکان دوHis و یک Tyr را شناسایی کرد که برای فعالیت NiR ضروری است. باقی مانده های مناسب هدف برای موتانژ در میوگلبین به وسیله مدلسازی مولکولی در ترکیب با شبیه سازی های دینامیک مولکولی شناسایی شد و به درک از پیوند نیتریت به وسیله محاسبه مقادیر تئوری Km کمک کرد. با این وجود تاکنون شواهد تجربی در این مورد وجود ندارد. استراتژی های متفاوتی از آنزیم های فلزی روی تک هسته ای تاکنون به صورت محاسباتی برای کاتالیز هیدرولیز ارگانوفسفات ها به وسیله تغییر اسید های محل عمل بازطراحی شد و این کار با حفظ پیوستگی هندسی حول محور یون فلزی انجام شد. از ۱۲ طراحی، یک باز طراحی organo- ، adenosine deaminase phosphate diethyl ٧-hydroxycoumarinyl phosphate اکیرال را هیدرولیز کرد و سپس به وسیله تکامل هدایت شده ارتقا پیدا کرد. مقادیر تا ۱۰ به توان ٤ افزایش یافت. همچنین آنالوگ coumariny۱ عامل عصبی سیلوسارین با یک اولویت برای ایزومر Rp را هیدرولیز کرد.

نتیجه گیری

این مقاله پیشرفت های اخیر را که در مهندسی آنزیم بر روش های منطقی برای ایجاد بیوکاتالیز های همراه با فعالیت ارتقا یافته، انانتیوگزینشی، محدوده زیربستر ثبات و همچنین عملکرد های جدید کاتالیزی است ارائه می دهد. نکته مهم این است که در بسیاری از موارد ساختارهای پروتئین به درک از مکانیسم واکنشی آنزیم کمک کرده و باعث میزان سازی دقیق محل عمل به وسیله طراحی منطقی توسط تنها چند جهش به خصوص و در نتیجه ارائه جایگزینی قوی برای غربال مخازن بزرگ با استفاده از روش های تکاملی می شود. با دسترسی تعداد در حال افزایشی از ساختار های پروتئینی و الگوریتم های محاسباتی بسیار معقول، طراحی منطقی خالص همچنان الف) به وسیله درک ناکافی ما از عملکرد آنزیم ها و چین خوردگی پروتئین ب) انعطاف پذیری پروتئین ها وتغییرات قابل تنظیم مانند پیوند زیر بستر و ج) درک محدود ما از دینامیک پروتئین ها، د) حساسیت واکنش های آنزیمی به تغییرات کوچک در فواصل و هندسه زیر بستر در رابطه با اسید های محل عمل و نسبت به تاثیر مولکول های آب محل عمل، ز) تاثیر معکوس برخی جهش ها بر بروز و ثبات پروتئین،

ر) تاثیر مثبت جهش های ظاهرا دور و غیرمرتبط و نیز جهش های پیوسته که در حال حاضر پیش بینی آنها بسیار دشوار است. مورد آخرظرفیت بالای محاسباتی مورد نیاز برای پردازش حجم بالایی از داده محدود است. بنابراین طراحی محاسباتیzآنزیم های De novo هنوز در مراحل ابتدایی آن است و بیوکاتالیز های انجام شده نشان دهنده تنها فعالیت های اندک ولی امید بخشی است. با این وجود احتمال موفقیت استراتژی های تصادفی به تنهایی نیز پایین بوده و نیازمند غربالگری فراوان است. این مقاله به ارائه چندین مثال که در آن ترکیبی از طراحی منطقی با تکامل هدایت شده پرداخته شد که باعث ایجاد آنزیم های De novo مهمی شد. به طور خلاصه استراتژی کلی ای در مورد چگونگی پیشرفت در مهندسی یک آنزیم به خصوص وجود ندارد. این مهندسی شدیدا به واکنش و آنزیم های مورد نظر وابسته است. داده های ساختاری و بیوشیمیایی در دسترس متخصصین بیوانفورماتیک ساختاری و تجهیزات محاسباتی و همچنین ظرفیت های غربالگری مخازن تنها چند نمونه از این موارد است. در حال حاضر طراحی آنزیم محاسباتی به طور بنیادی باعث تغییر در نوع جایگزینی بیوکاتالیز ها شده است ولی همچنان نمی تواند جایگزینی برای تکامل هدایت شده به عنوان روشی انتخابی برای مهندسی پروتئین باشد. در مقایسه دو روش مکمل یکدیگر بوده و باید با یکدیگر به منظور دست یابی به نتایج عالی ترکیب شوند.

منابع:

1- KerstinSteinera,HelmutSchwab,Recent advances in rational approaches for enzymeengineering,Volume No: ۲, Issue: ۳, September ۲۰۱۲, e۲۰۱۲۰۹۰۱۰,

2- http://dx.doi.org۱۰.۵۹۳۶/csbj۲۰۱۲۰۹۰۱۰.