

**LOSCHMIDT
LABORATORIES**

Inženýrství a analýza proteinů in silico

David Bednar

Loschmidtovy Laboratoře



Jiří Damborský

Loschmidtovy Laboratoře

Experimentální tým



Jiří Damborský



Zbyněk Prokop



Martin Marek

Teoretický tým



David Bednář

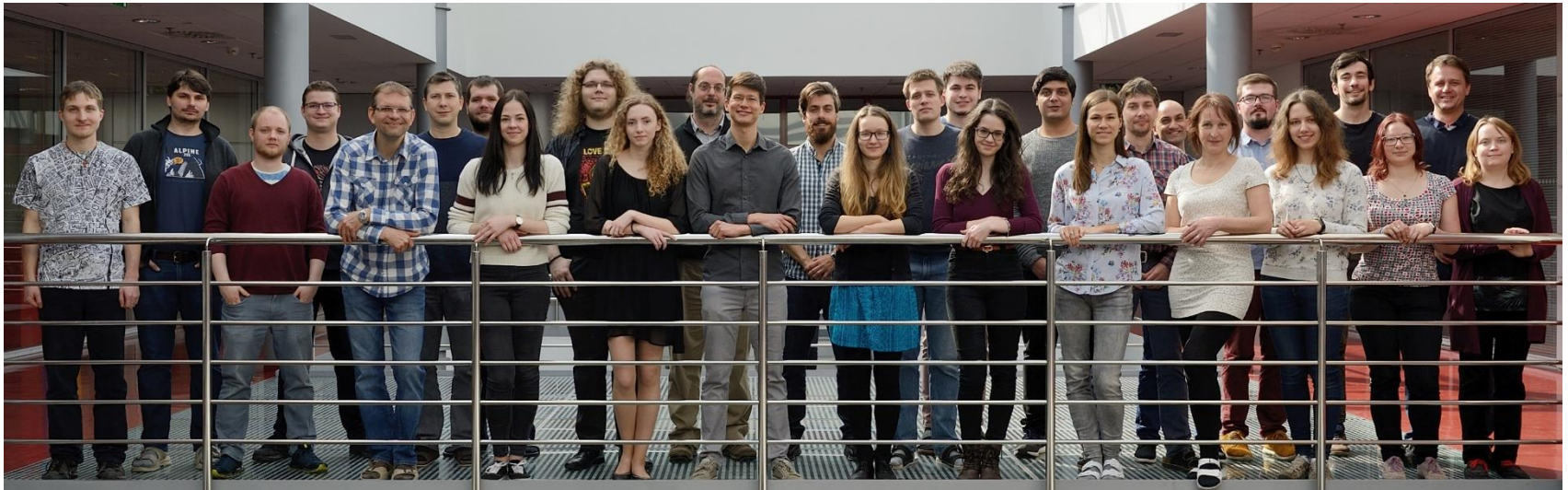


Jan Štourač



Stanislav Mazurenko

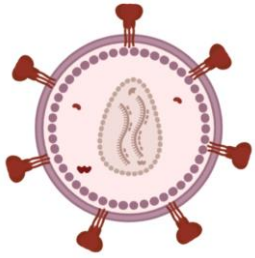
Loschmidtovy Laboratoře



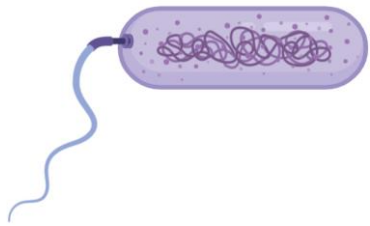
MUNI



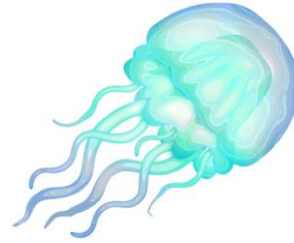
Proteiny



HIV



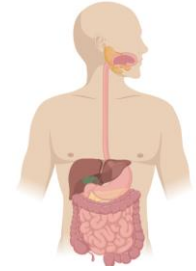
Escherichia coli



Aequorea victoria

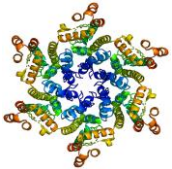


Malus domestica



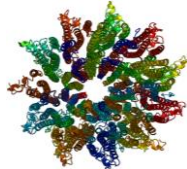
Homo sapiens sapiens

HIV kapsid



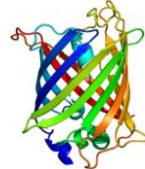
Virulence

Flagelin



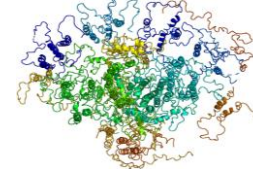
Pohyb

GFP



Fluorescence

Fotosystem I



Fotosyntéza

ADH



Kocovina

Proteiny

Potravinářství



Zemědělství



Chemie a farmacie



Ochrana prostředí



Textilní průmysl



Domácnost



Limitace

- Špatná stabilita
- Nedostatečná specifita
- Nízká aktivita
- ...



Proteinové inženýrství

Přístupy proteinového inženýrství

RATIONAL DESIGN

1. Computer aided design



2. Site-directed mutagenesis



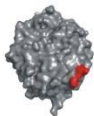
Individual mutated gene

3. Transformation

4. Protein expression

5. Protein purification

6. *not applied*



Constructed mutant enzyme

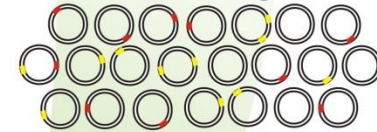
7. Biochemical testing

**IMPROVED
ENZYME**

DIRECTED EVOLUTION

1. *not applied*

2. Random mutagenesis



Library of mutated genes
(>10,000 clones)

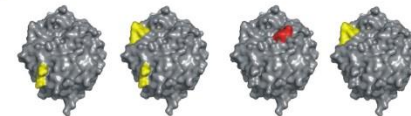
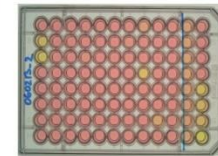
3. Transformation

4. Protein expression

5. *not applied*

6. Screening and selection

- stability
- selectivity
- affinity
- activity



Selected mutant enzymes

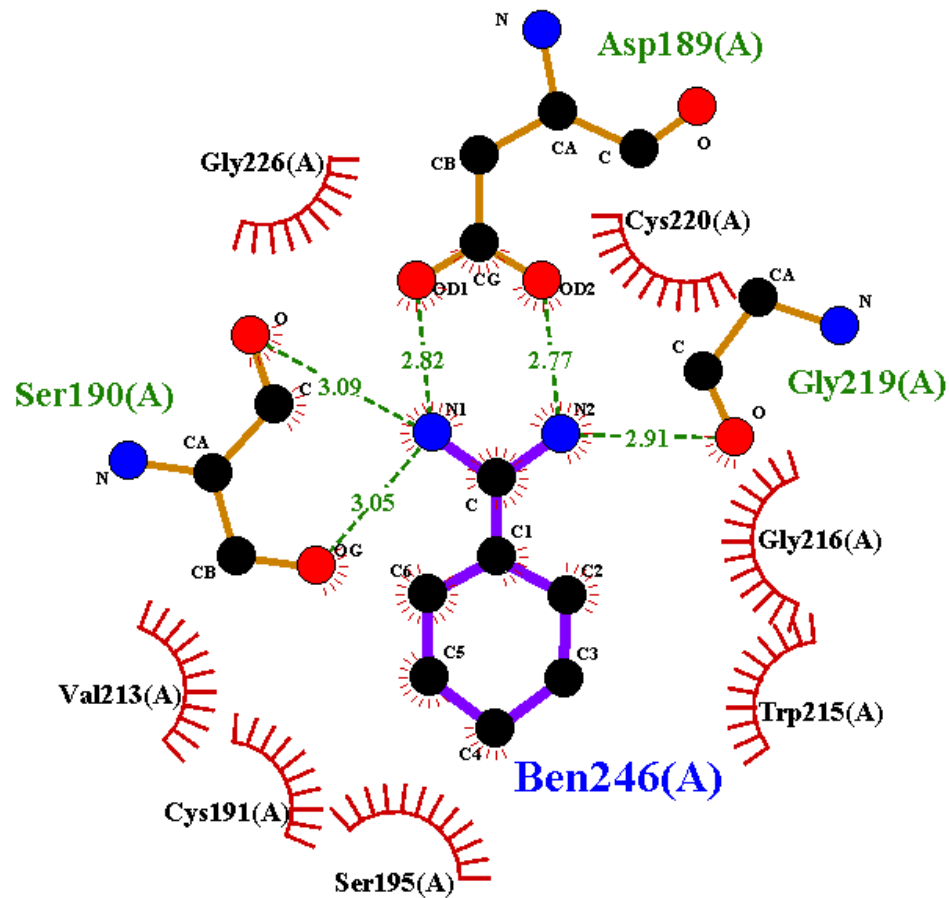
Semi-rationální design

- Identifikace aminokyselin významně ovlivňující určitou funkci proteinů (hot-spoty)
- Vytváření chytrých knihoven pro redukci experimentálního screeningu
- Hledání hot-spotů za účelem zlepšení:
 - Katalytických vlastností
 - Stability



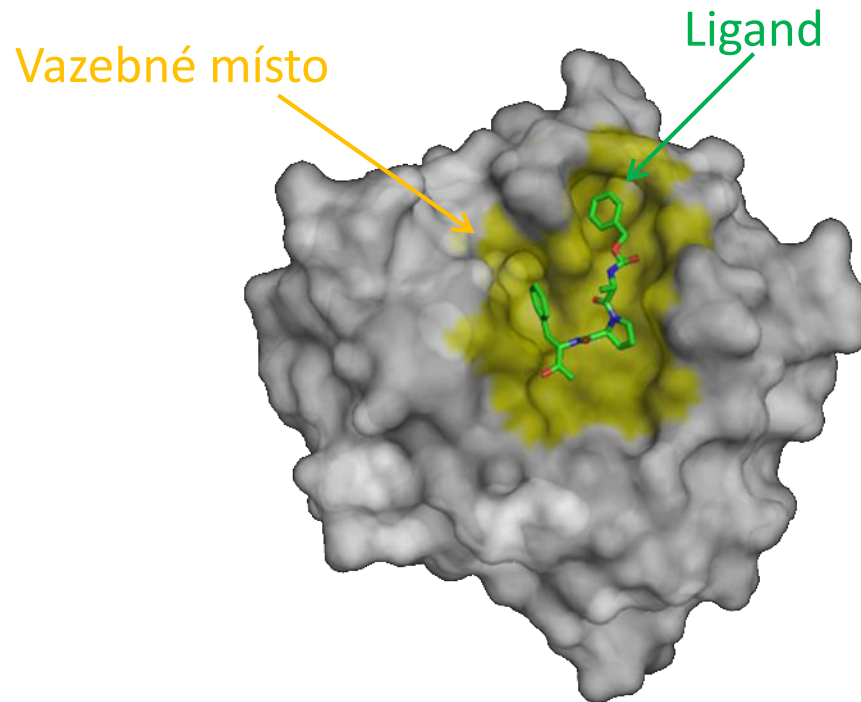
Hot-spoty pro katalytické vlastnosti

- Residua v přímém kontaktu s ligandem



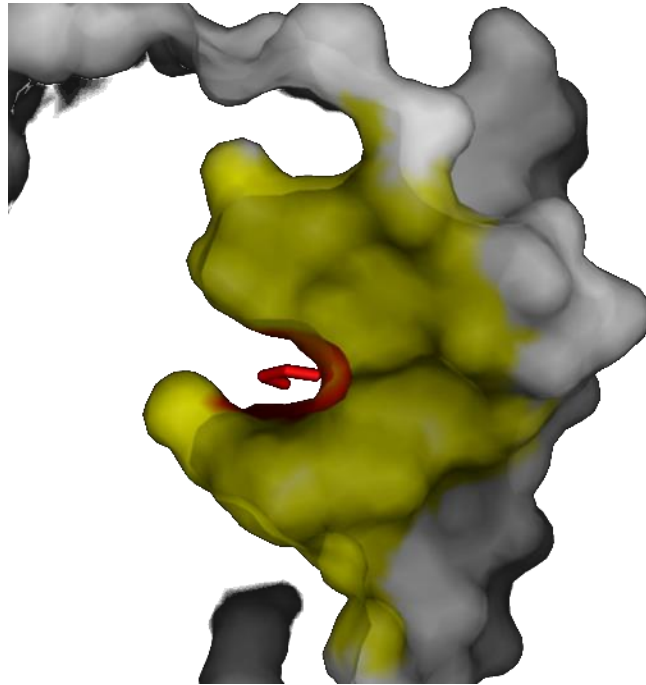
Hot-spots pro katalytické vlastnosti

- Residua vazebné kapsy



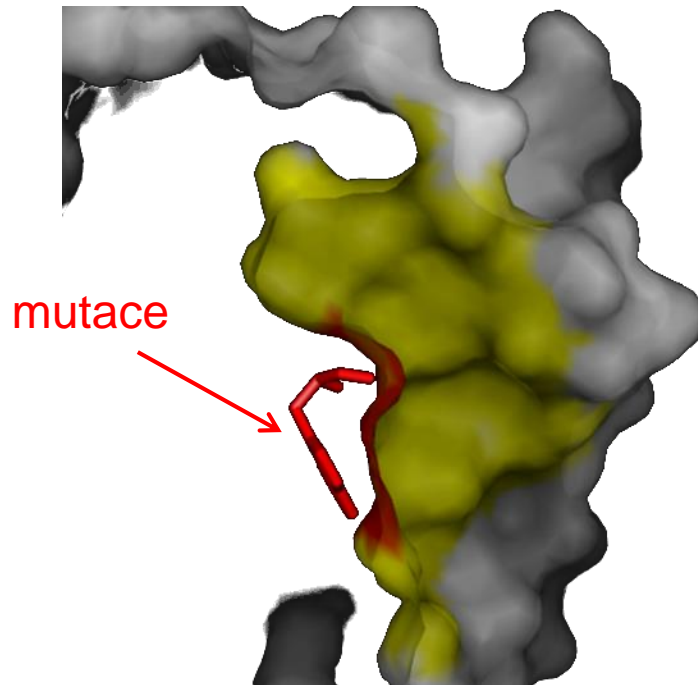
Hot-spots pro katalytické vlastnosti

- Residua vazebné kapsy



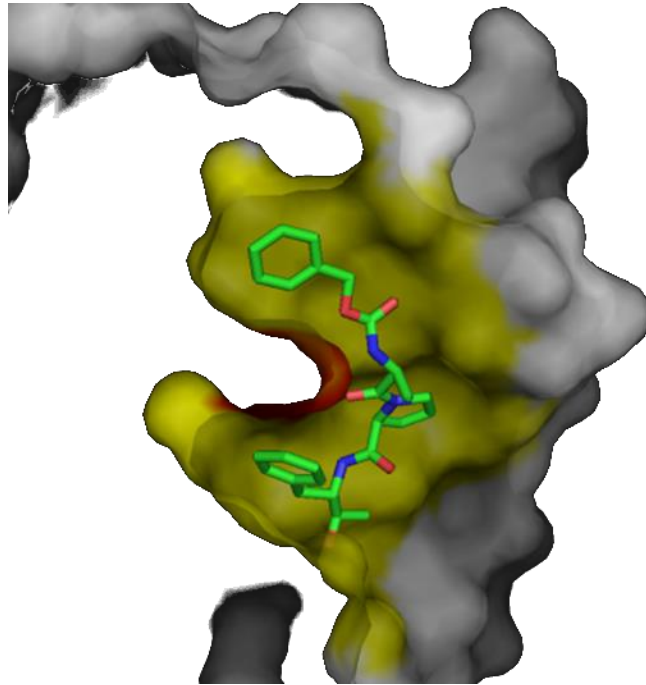
Hot-spots pro katalytické vlastnosti

- Residua vazebné kapsy



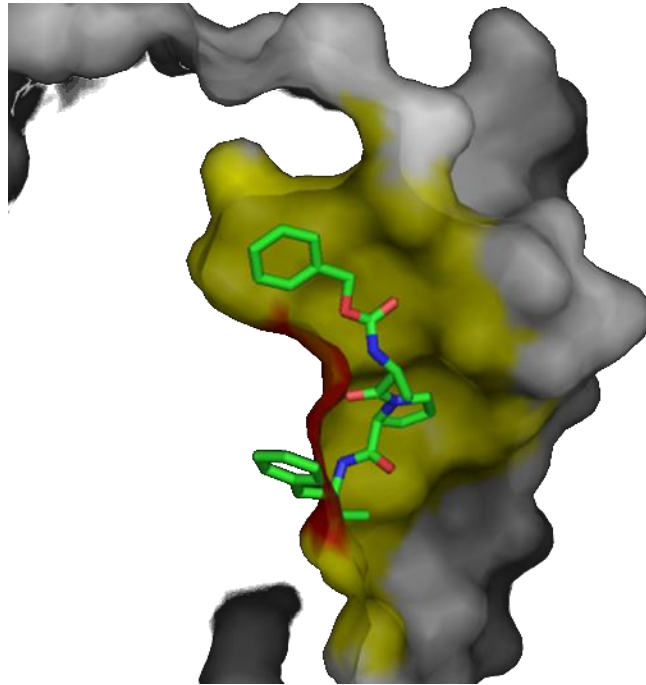
Hot-spots pro katalytické vlastnosti

- Residua vazebné kapsy



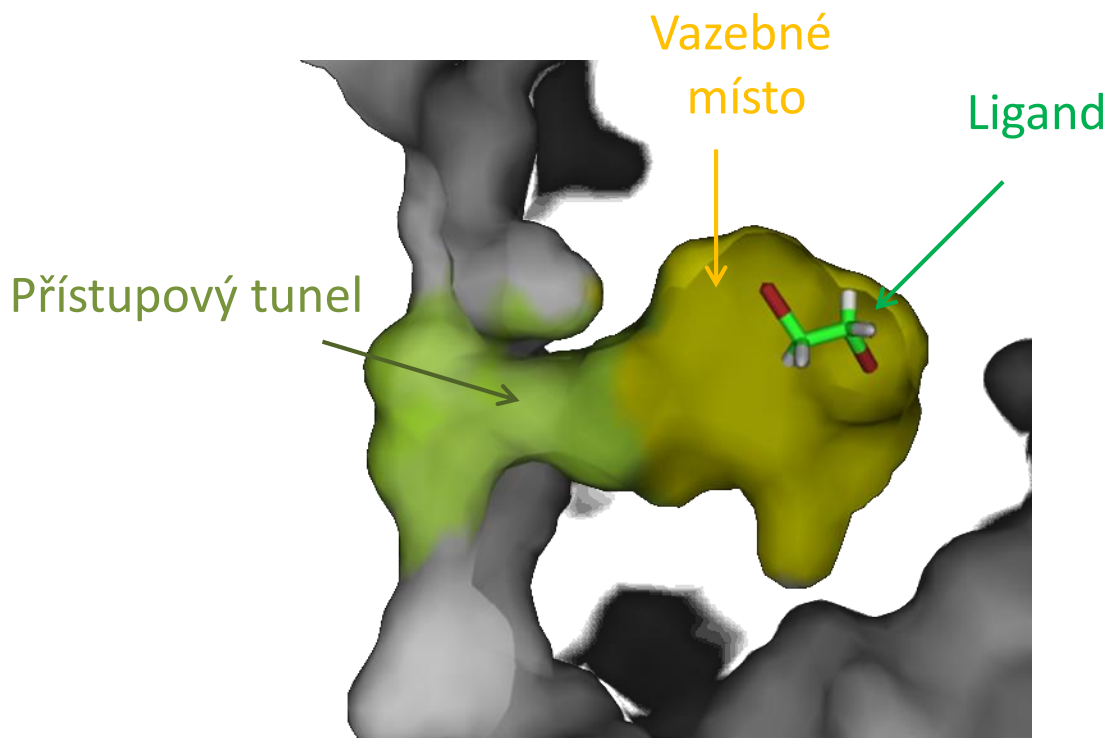
Hot-spots pro katalytické vlastnosti

- Residua vazebné kapsy



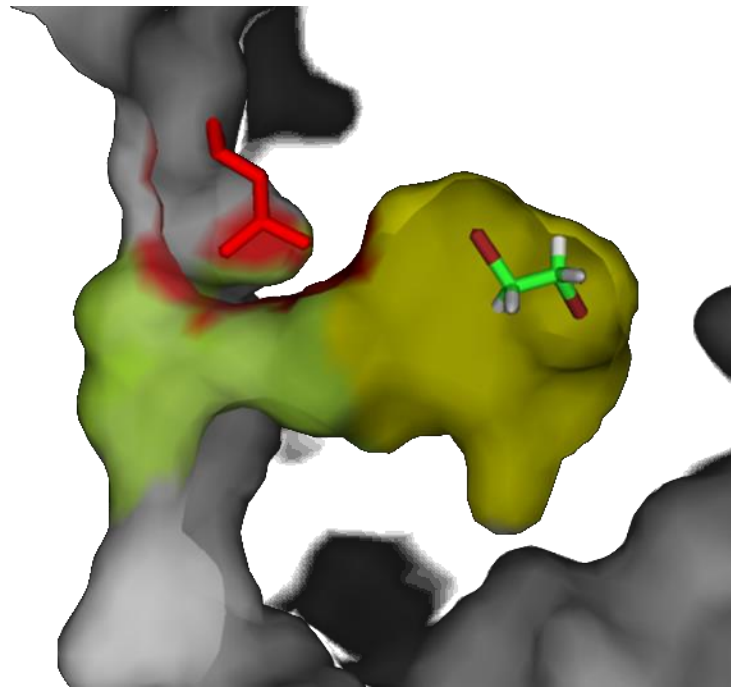
Hot-spots pro katalytické vlastnosti

- Residua v přístupových cestách (tunelech)



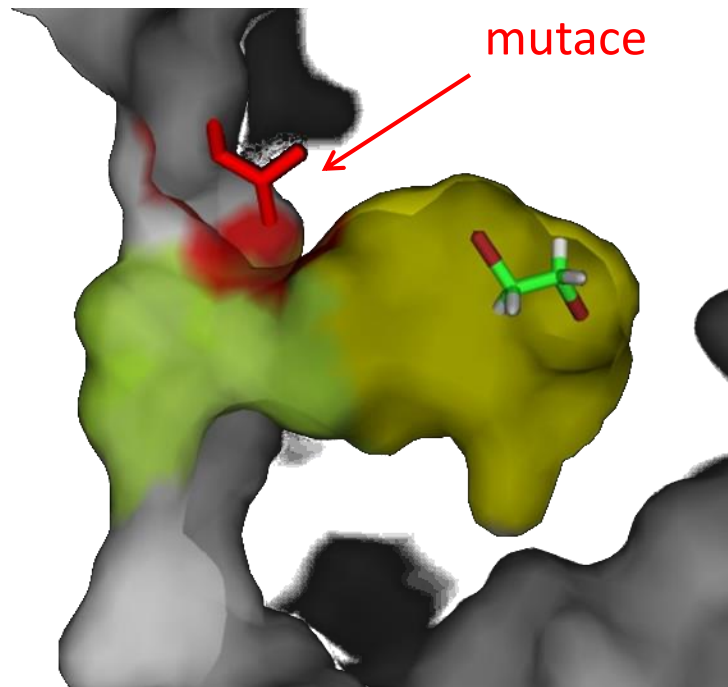
Hot-spots pro katalytické vlastnosti

- Residua v přístupových cestách (tunelech)



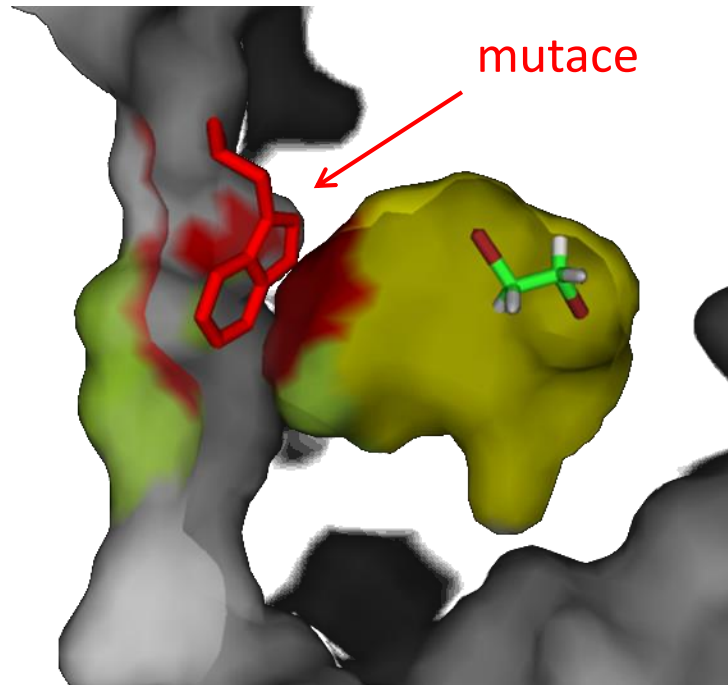
Hot-spots pro katalytické vlastnosti

- Residua v přístupových cestách (tunelech)



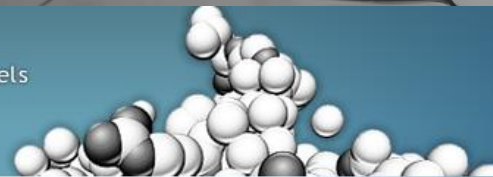
Hot-spots pro katalytické vlastnosti

- Residua v přístupových cestách (tunelech)





gold standard for analysis of tunnels
and channels in biomolecules



tools

explore the features
of CAVER tools



concept

learn more about
CAVER principles



download

download latest build
and plugins



help

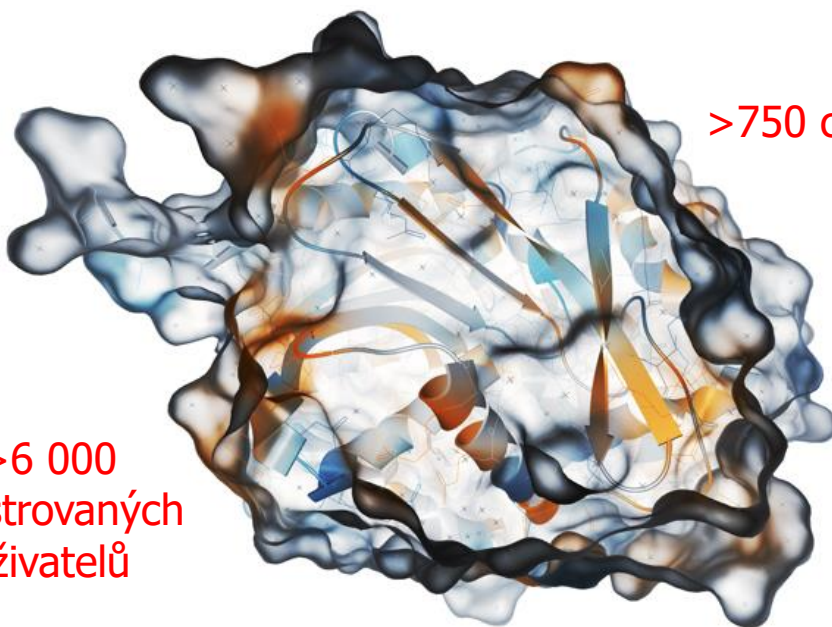
user guide, examples,
publications

www.caver.cz

>111 000 stažení

>750 citací

>6 000
registrovaných
uživatelů



sign in

E-mail:

Password:

[Create new user account](#)

Forgot your password? Please
contact us at caver@caver.cz.

user statistics

765 citations
6071 registered users
111385x CAVER downloaded

news

[CAVER cited in NATURE](#)
January 8, 2019

CAVER was cited in the NATURE
journal in article Cryo-EM structure
of the human $\alpha 1B3y2$ GABAA...

[Read more](#)

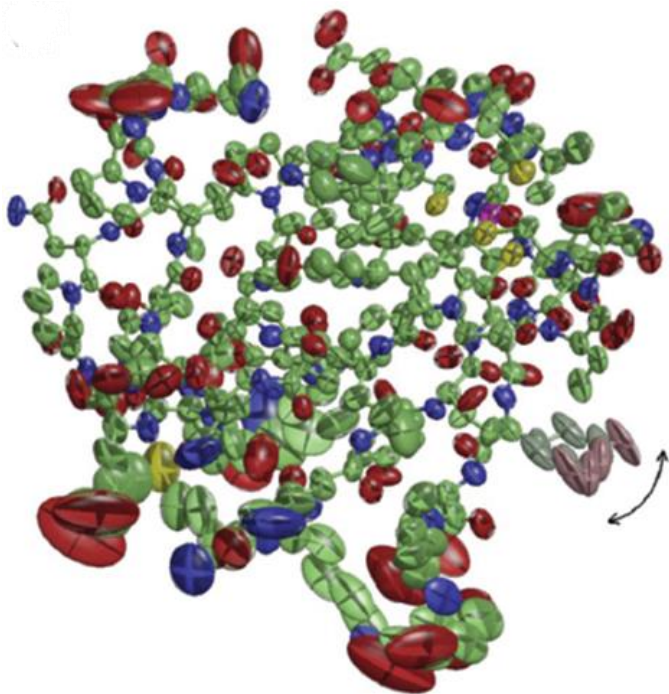
[CAVER cited in NATURE
Communications](#)
January 8, 2019

CAVER was cited in the NATURE
Communications journal in article
Cryo-EM structures of KdpFABC...

[Read more](#)

Hot-spoty pro stabilitu

- Residua s vysokými krystalografickými B-faktory



Title: CRYSTAL STRUCTURE OF NIDOGEN/LAMININ COMPLEX
(The highest 20 averaged B values are shown only.)

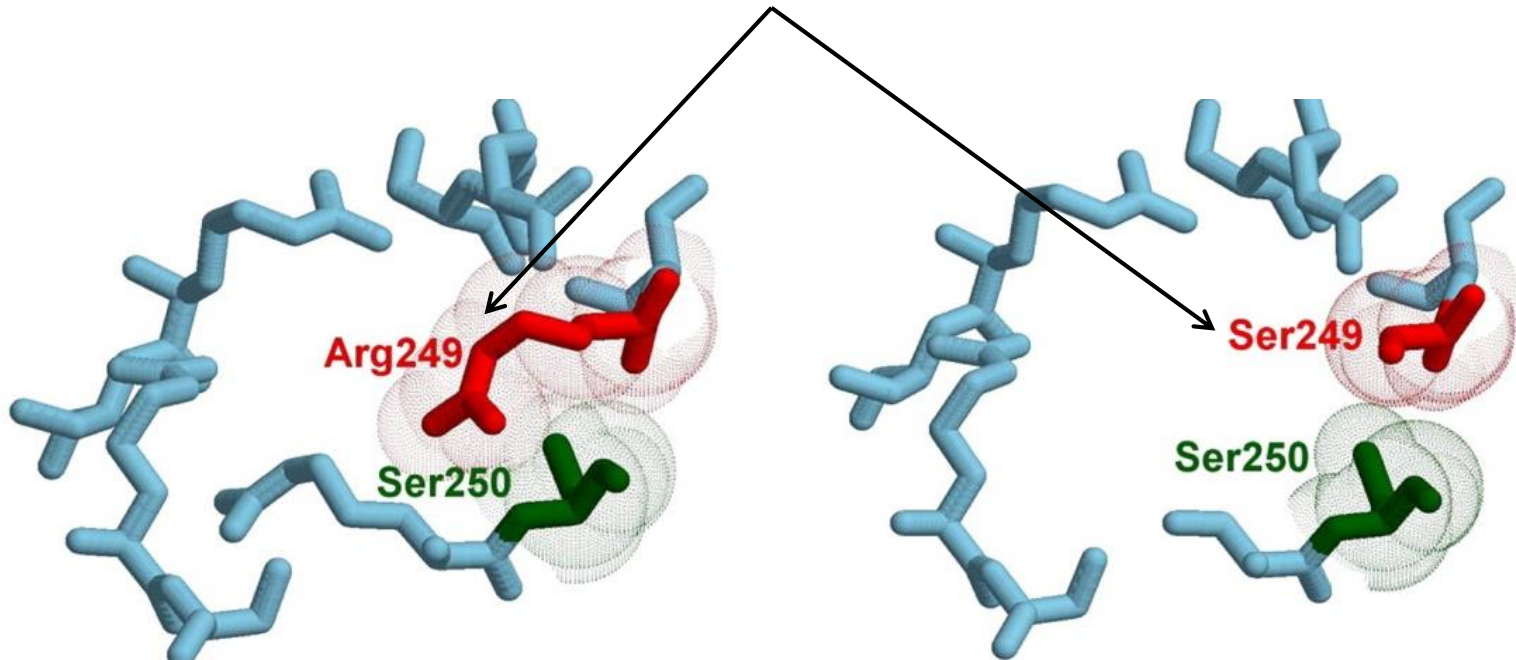
Chain identifier of chain no. 1 : A

Residue Name	Residue seq. no.	B value	Rank
ARG A	931	48.46	1
GLU A	930	46.87	2
SER A	151	46.50	3
ALA A	149	45.90	4
ILE A	150	45.69	5
GLU A	981	45.63	6
ASN A	932	44.67	7
GLY A	979	44.39	8
PHE A	89	44.32	9
LYS A	152	43.64	10
GLY A	980	43.33	11
HIS A	978	42.84	12
LEU A	148	42.76	13

Hot-spots pro stabilitu

- Residua v tunelech a kavitách

Vyplnění volného prostoru -> více interakcí -> lepší stabilita



Racionální design

- Použití metod molekulového modelování pro identifikaci mutací zlepšujících vlastnosti
- Nutná znalost struktury a funkce

MSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEGTGDPILFQHGNTSSYLWRNIMPHCA
GLGRLIACDLIGMGDSKLDPSGPERYAYAEHRDYLDALWEALDLGDRVVLVV
HDWGSALGFDWARRHRERVQGIAYMEAIAMPIEWADFPEQDRDLFQAFRS
QAGEELVLQD

Sekvence

Struktura



Funkce

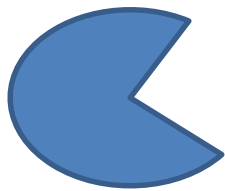
Racionální design



- Použití metod molekulového modelování pro identifikaci mutací zlepšujících vlastnosti
- Nutná znalost struktury a funkce
- **Aplikace a metody**
 - Predikce interakcí protein-ligand (molekulární docking)
 - Predikce pohybů proteinu (molekulová dynamika)
 - Predikce reakčních bariér a mechanismů (kvantová mechanika)
 - Predikce stability (molekulová mechanika)

Molekulární docking

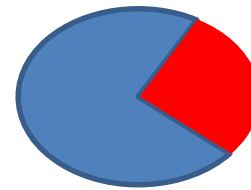
- Predikce komplexu proteinu s navázaným ligandem



Enzym
(receptor)



Malá molekula
(ligand)



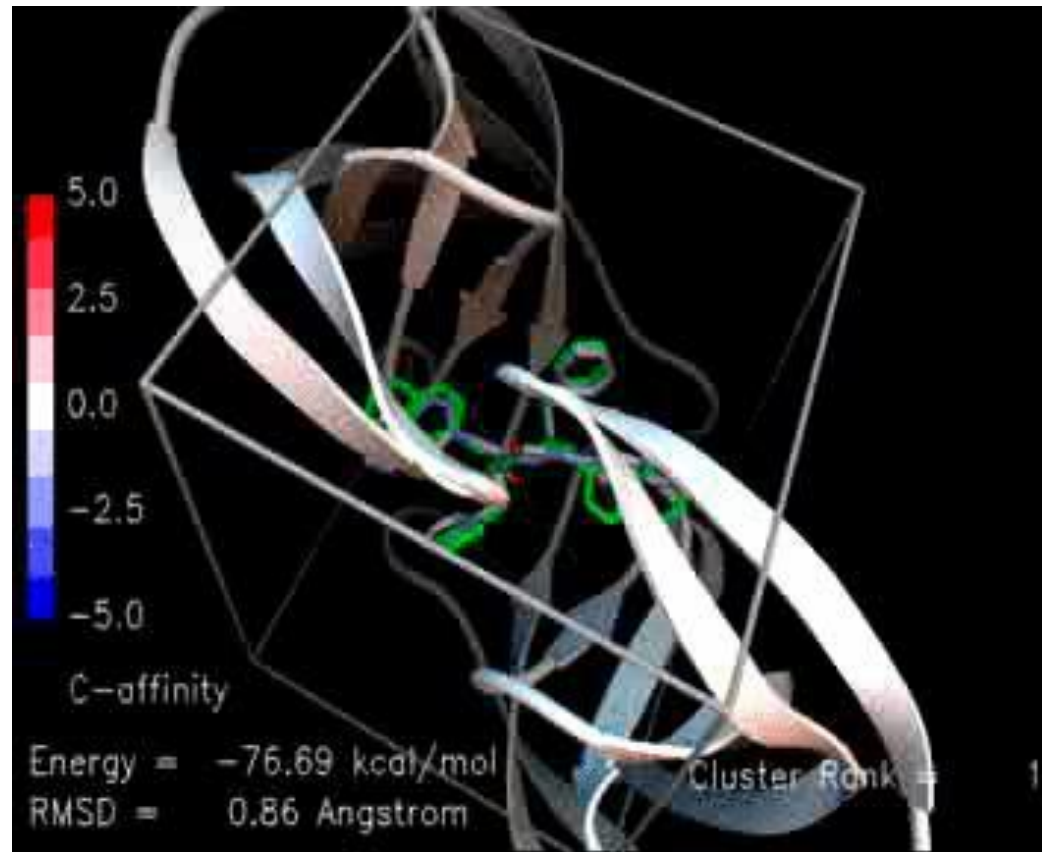
Komplex enzymu s
navázaným ligandem

Molekulární docking

- Dvoukrokový proces

Prohledávání – nalezení konformace
v aktivním místě enzymu

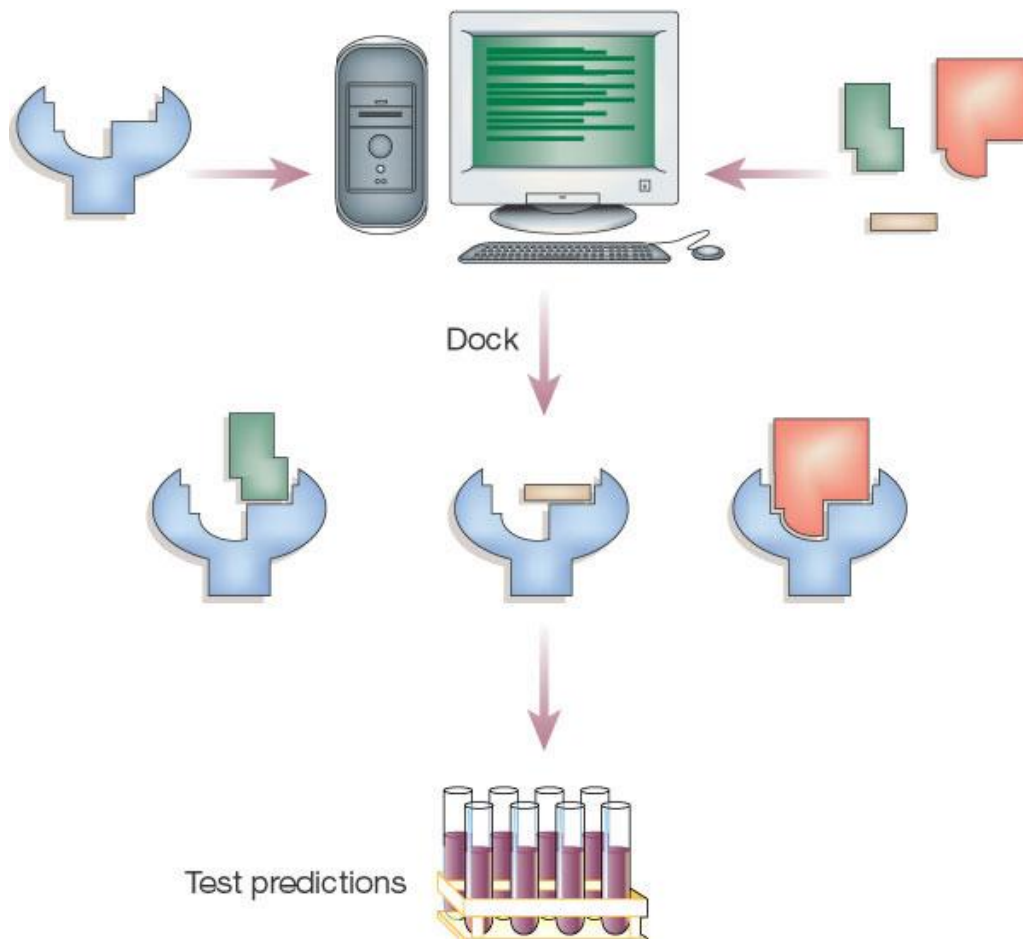
Hodnocení – výpočet vazebné energie
na základě interakcí ohodnocených
skórovací funkcí



Molekulární docking

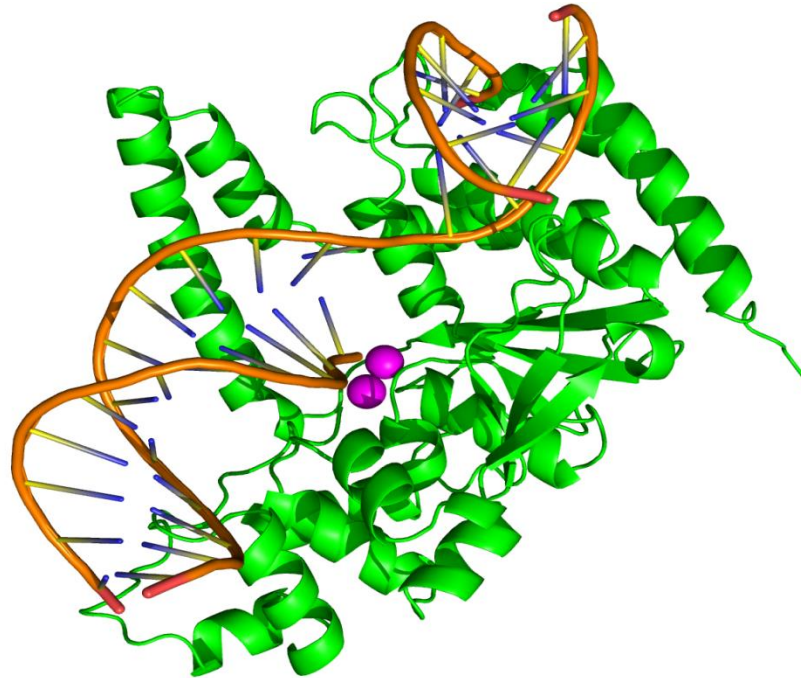
Virtuální screening

- Docking mnoha ligandů do jednoho proteinu
- Docking jednoho ligandu do mnoha proteinů



Virtuální screening

- DNA endonukleasa MUS81
 - Účastní se reparace DNA
 - Cíl pro vývoj protirakovinných léčiv



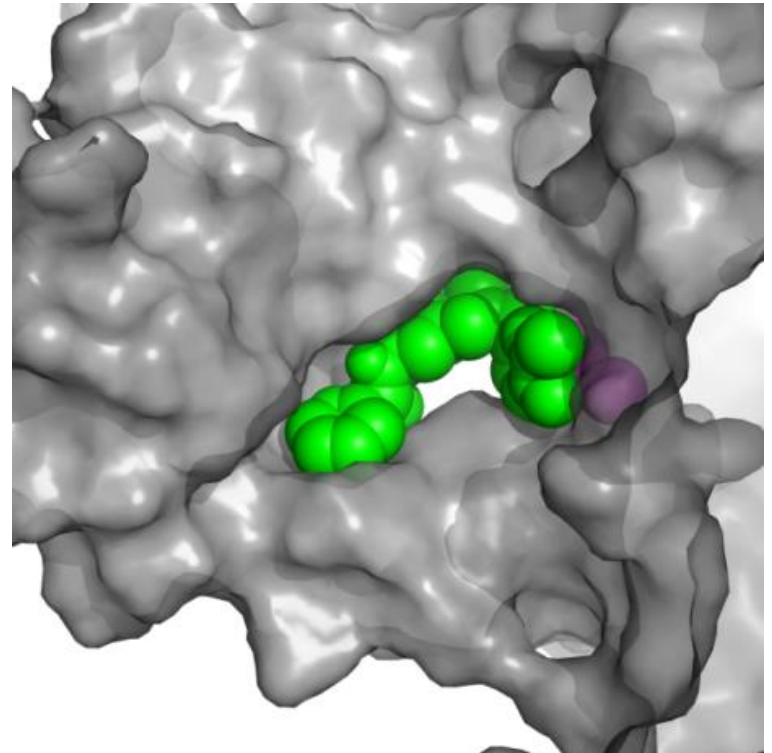
Virtuální screening

- High-throughput screening
 - Robotická platforma v Centru chemické genetiky, AV ČR
 - Experimentálně testováno přes **23 000 molekul**
 - Identifikován inhibitor: **$IC_{50} = 50 \mu M$**



Virtuální screening

- Virtuální screening
 - Dockováno více než **140 000 molekul**
 - Experimentálně testováno **19 potenciálních inhibitorů**
 - 6 inhibitorů s $IC_{50} \leq 50 \mu\text{M}$
 - Nejlepší inhibitor: $IC_{50} = 5 \mu\text{M}$



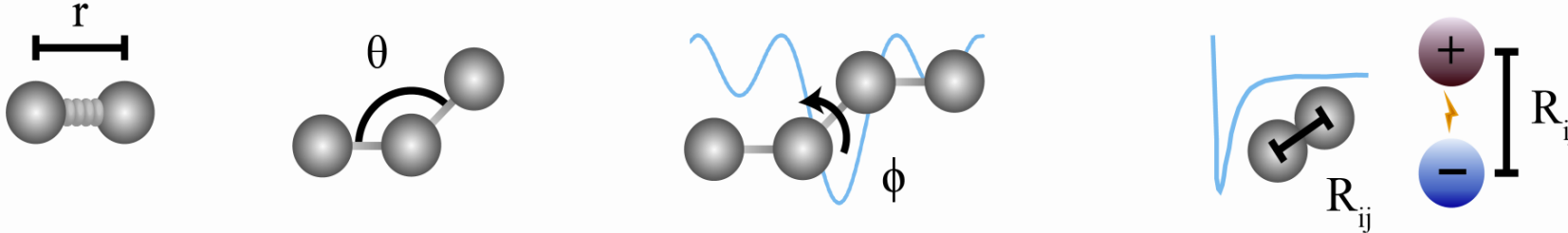
Virtuální screening

- porovnání

	Experimentální	Virtuální
vybavení (Kč)	Desítky mil.	1 mil.
Testování		
Výpočetní	-	140 000
Experimentální	23 000	19
Cena (Kč)	2 000 000	40 000
Čas	Týdny	Dny
Results		
Počet inhibitorů	1	6
Nejlepší IC ₅₀ (μM)	50	5

Molekulová mechanika

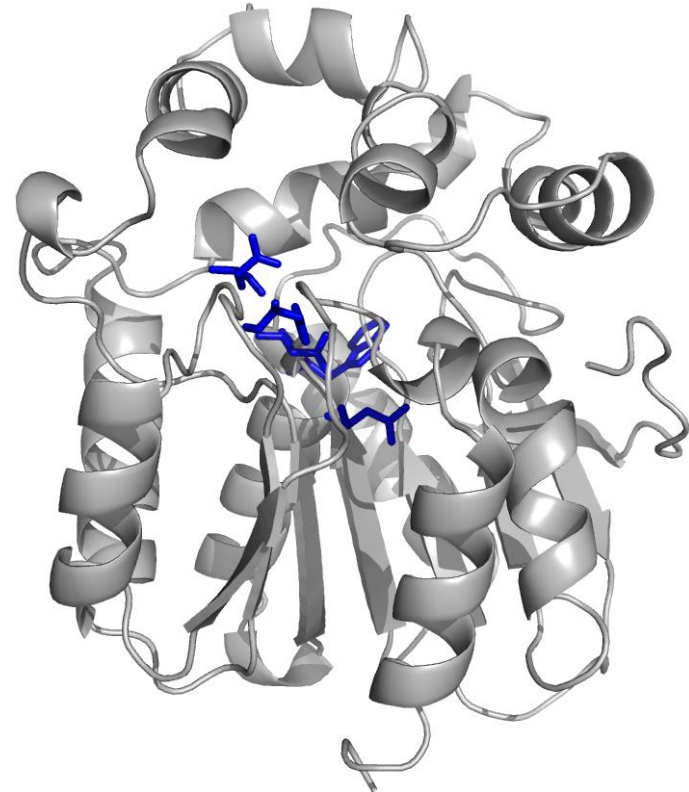
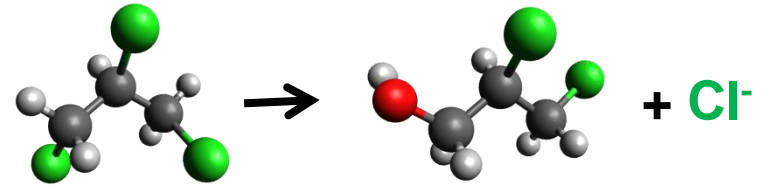
- Aproximace atomů jako kuliček a vazeb jako pružin
- Sílu interakce popisují jednoduché rovnice – silové pole
- Výpočet energie jako součet všech interakcí

$$E_{total} = \underbrace{\sum_{bonds} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{dihedrals} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)]}_{\text{Bonded}} + \underbrace{\sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]}_{\text{Non-bonded}}$$


Inženýrství stability

Stabilizace dehalogenasy DhaA

- Odbourávání toxických látek a produkce čistých chemikálií
- $T_m = 49^\circ\text{C}$
- Poločas rozpadu v 60°C $\tau_{1/2} \sim 5 \text{ min}$



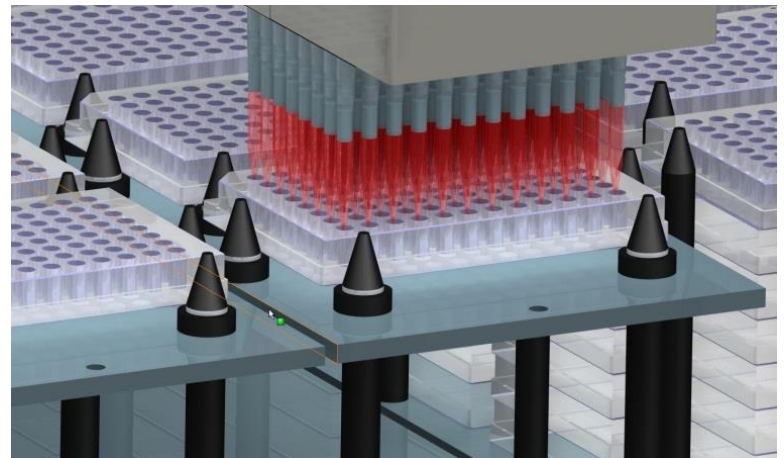
Stabilizace dehalogenasy DhaA

Experimentální přístup

- Projekt společností Diversa a DOW Chemical
- Gene Site Saturation Mutagenesis
- **19** mutací na všech **300** pozicích zkonstruováno experimentálně
 - **120,000** testovaných kolonií
- 10 bodových stabilizujících mutací
- Finální mutant

$$T_m = 67 \text{ }^\circ\text{C} (\mathbf{18 \text{ }^\circ\text{C} \uparrow})$$

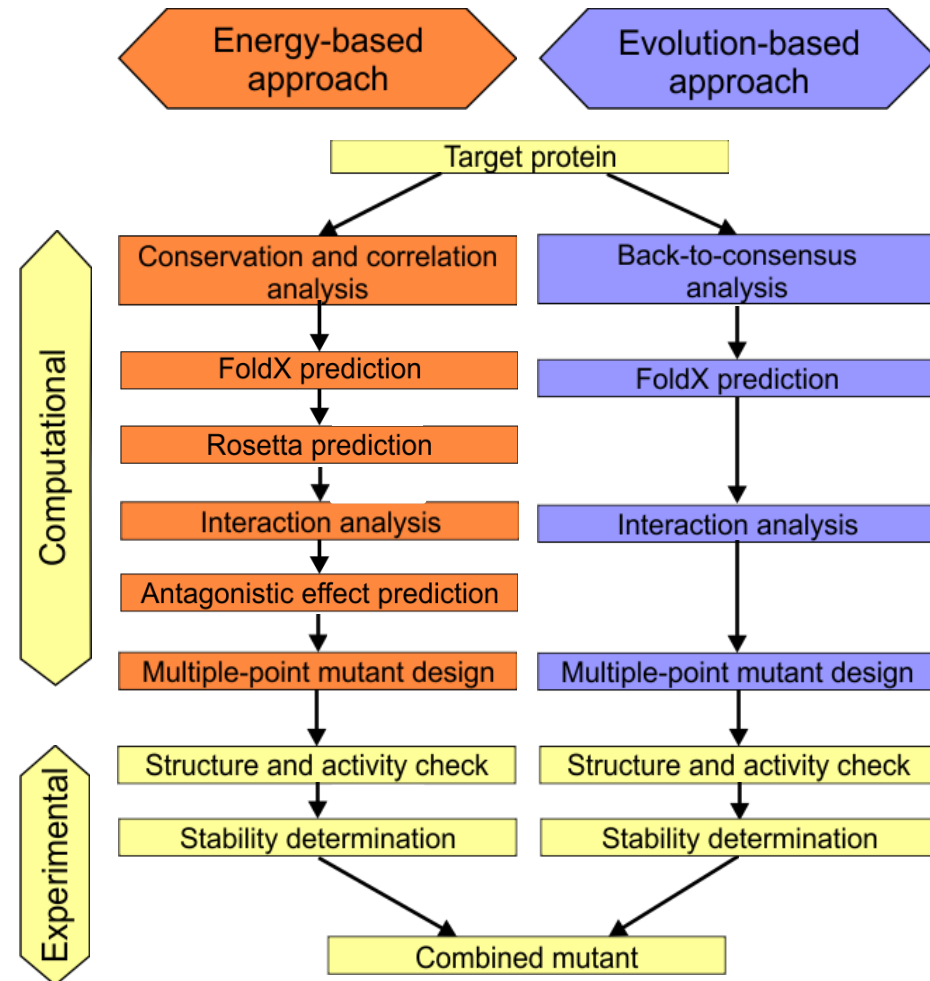
$$\tau_{1/2} = 36 \text{ h} (\mathbf{ca. 36 \text{ h} \uparrow})$$



Stabilizace dehalogenasy DhaA

Racionální design

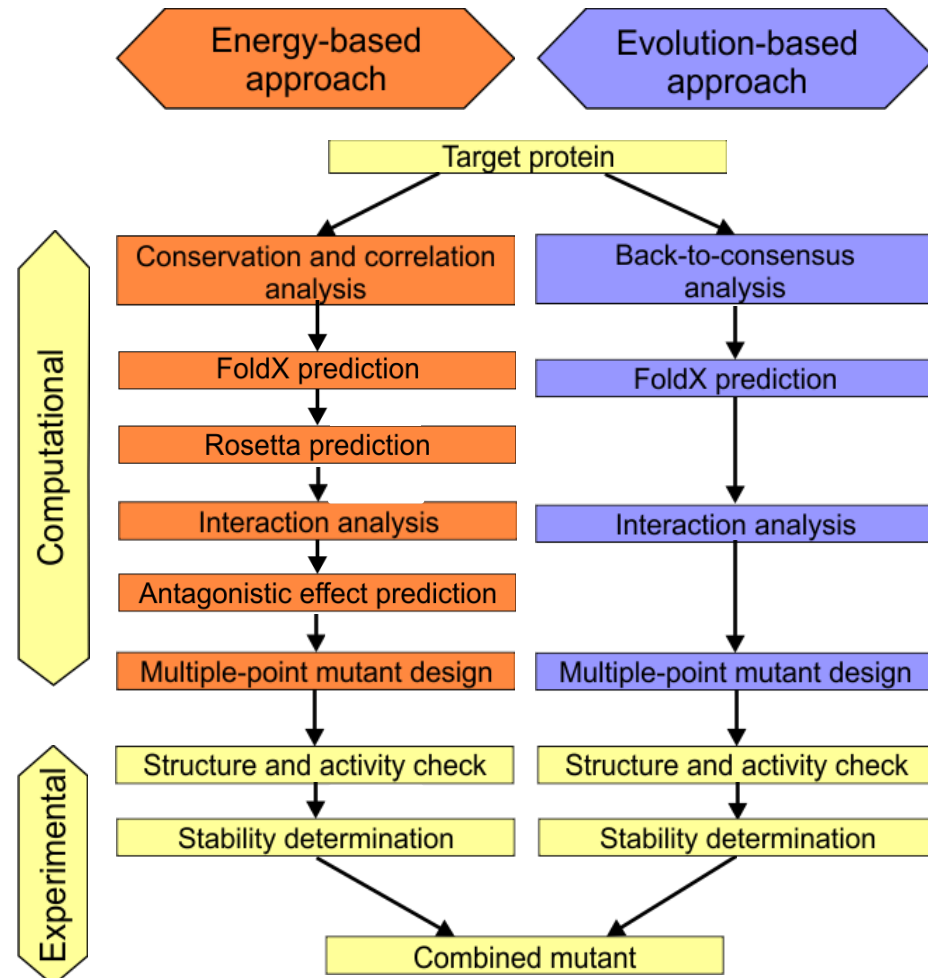
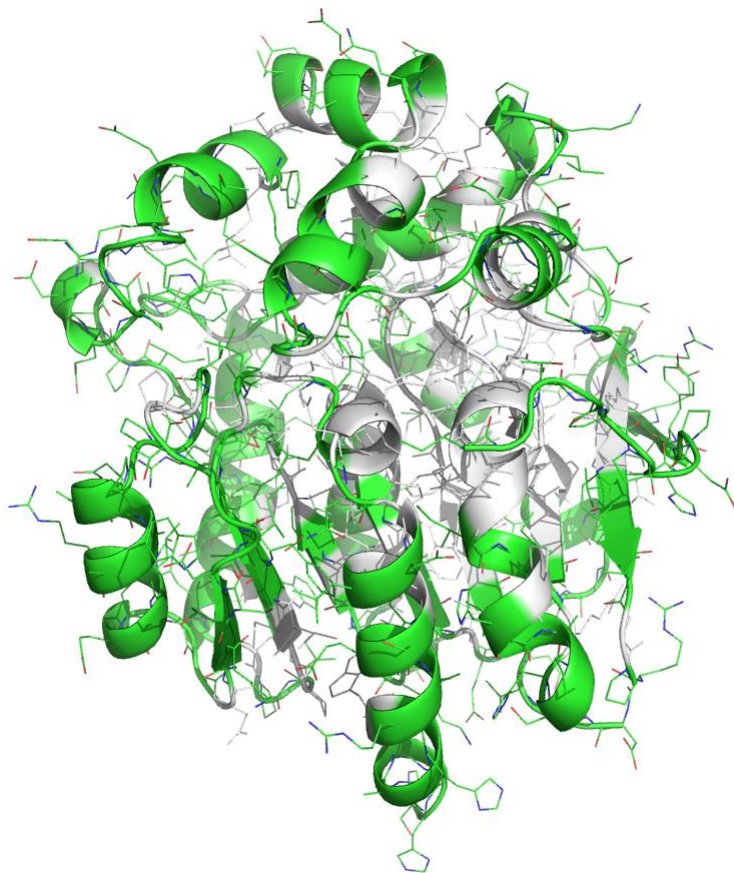
- *In silico* metoda FireProt
- Strukturní a sekvenční analýzy
- **5500** možných mutantů



Stabilizace dehalogenasy DhaA

Racionální design

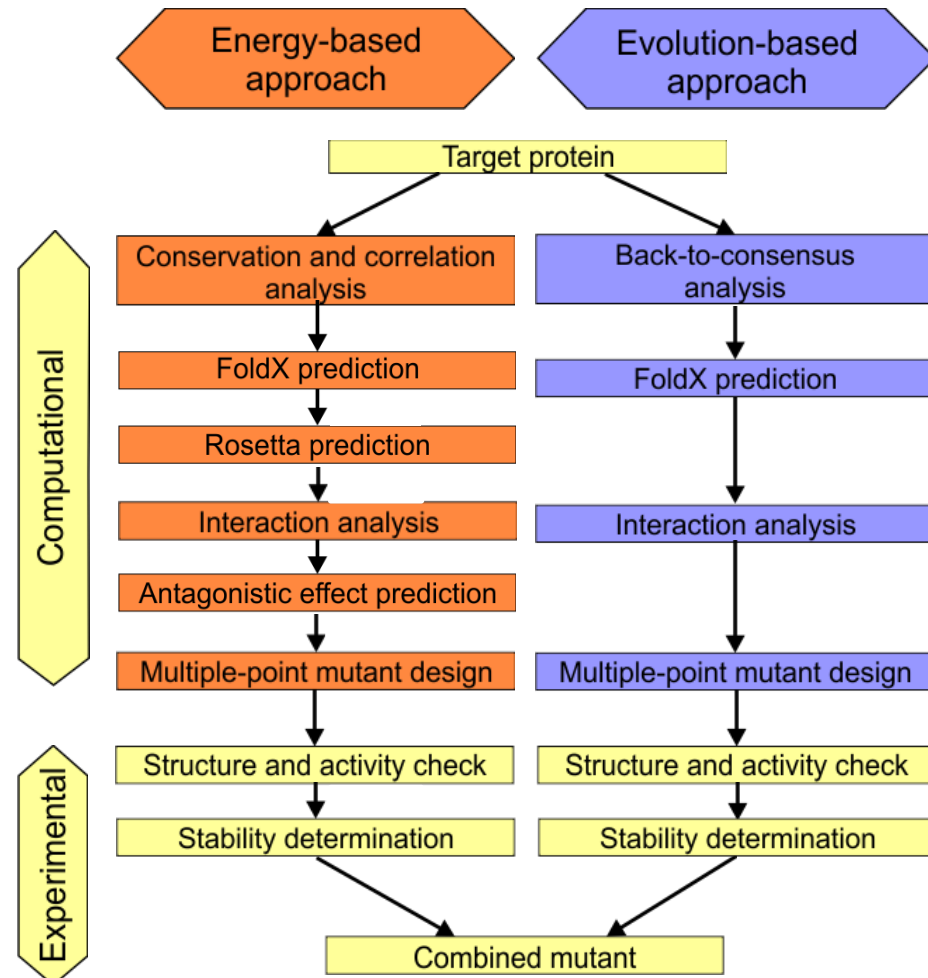
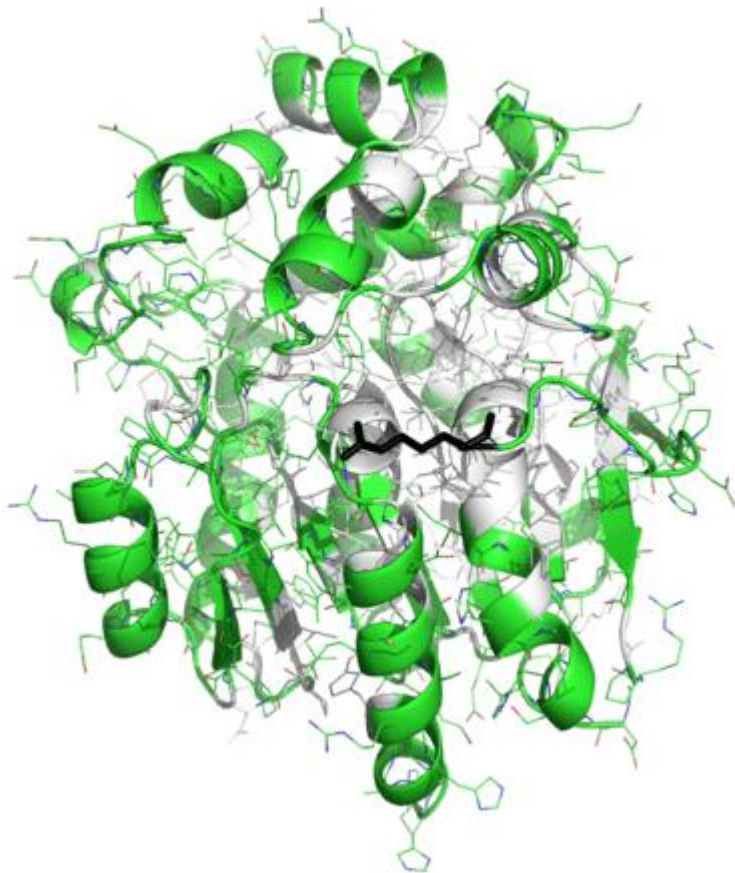
- *In silico* metoda FireProt



Stabilizace dehalogenasy DhaA

Racionální design

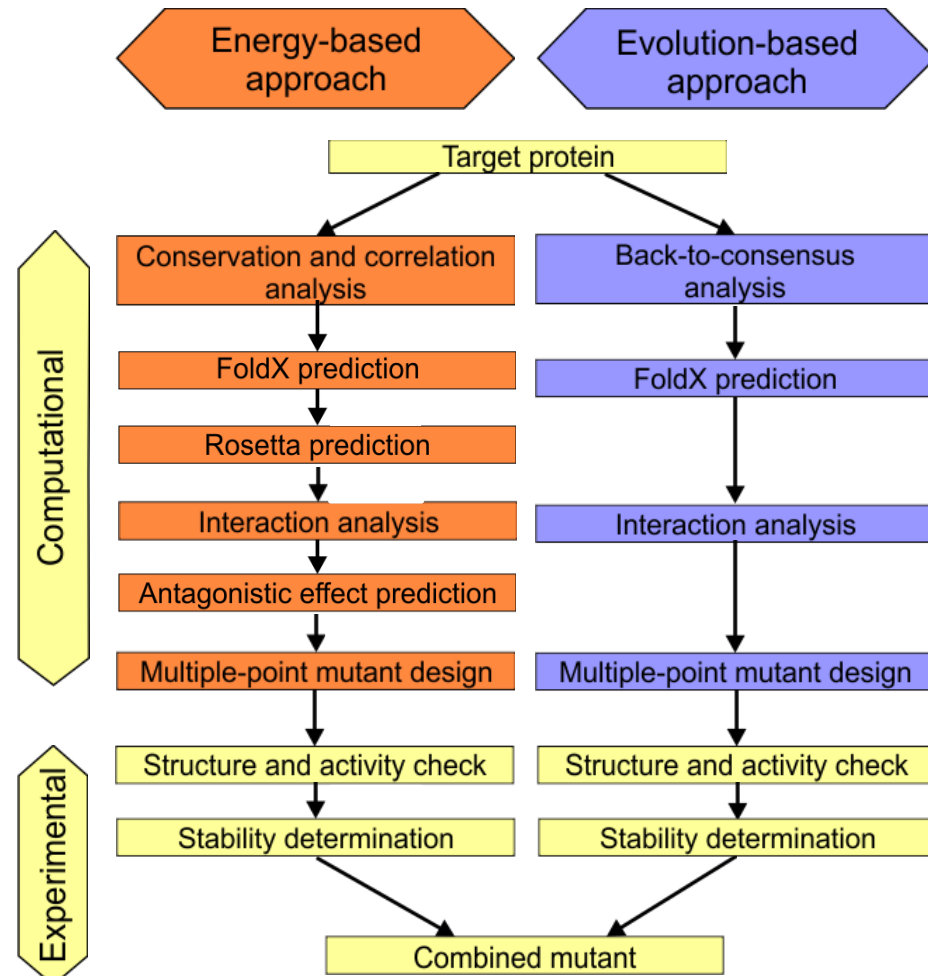
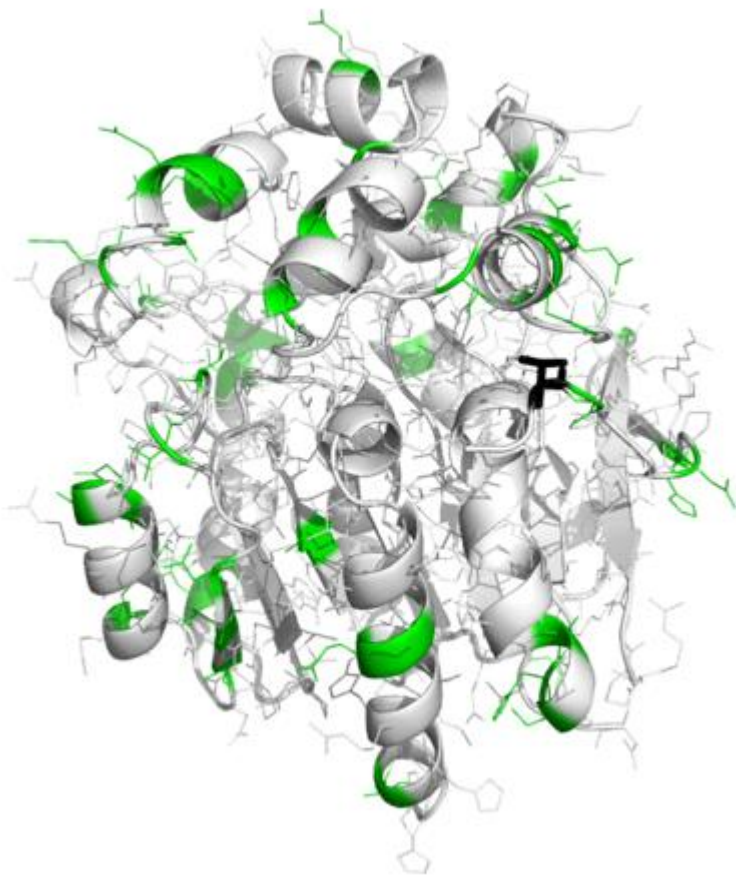
- *In silico* metoda FireProt



Stabilizace dehalogenasy DhaA

Racionální design

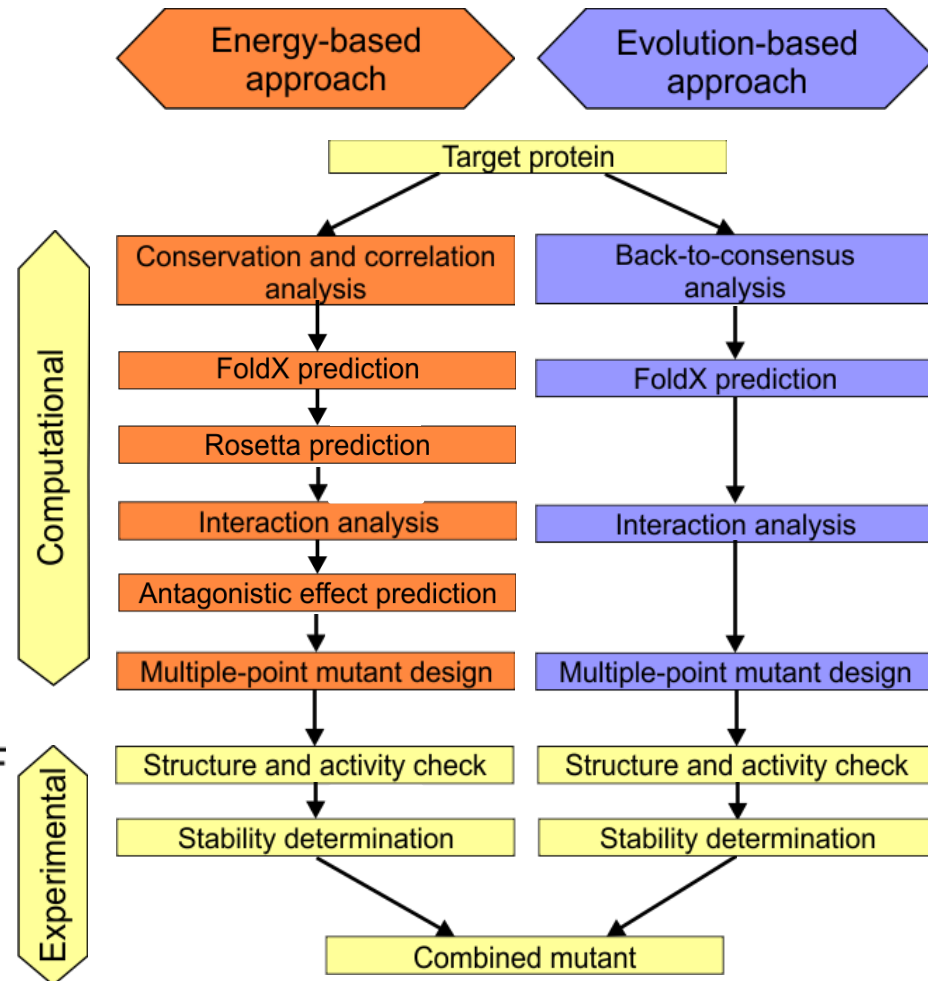
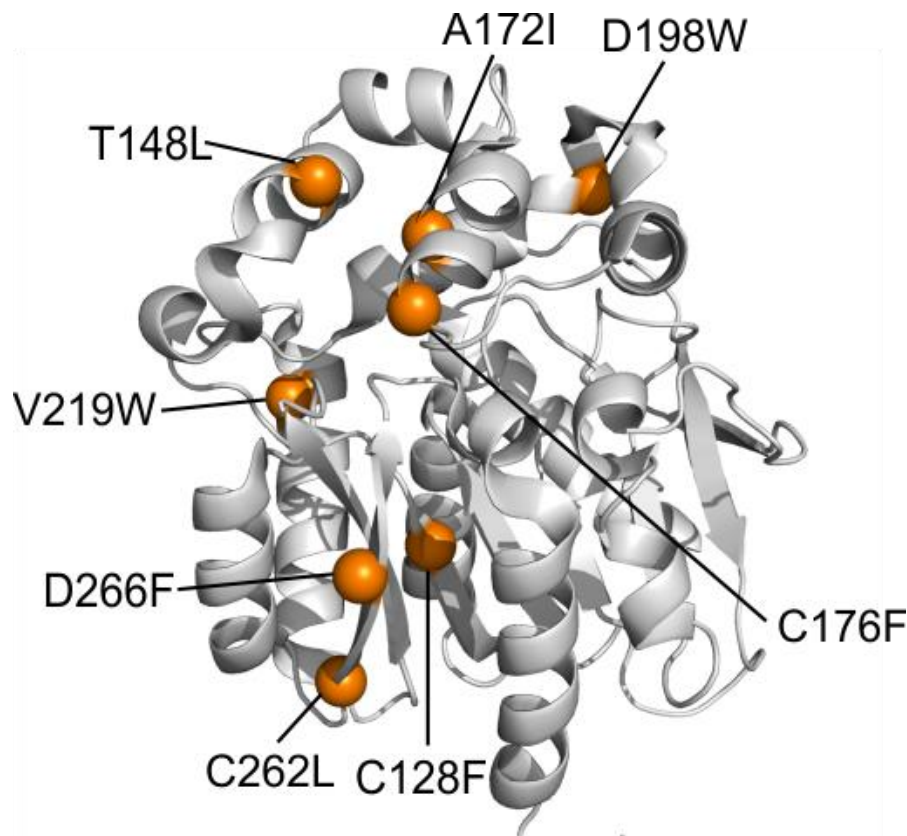
- *In silico* metoda FireProt



Stabilizace dehalogenasy DhaA

Racionální design

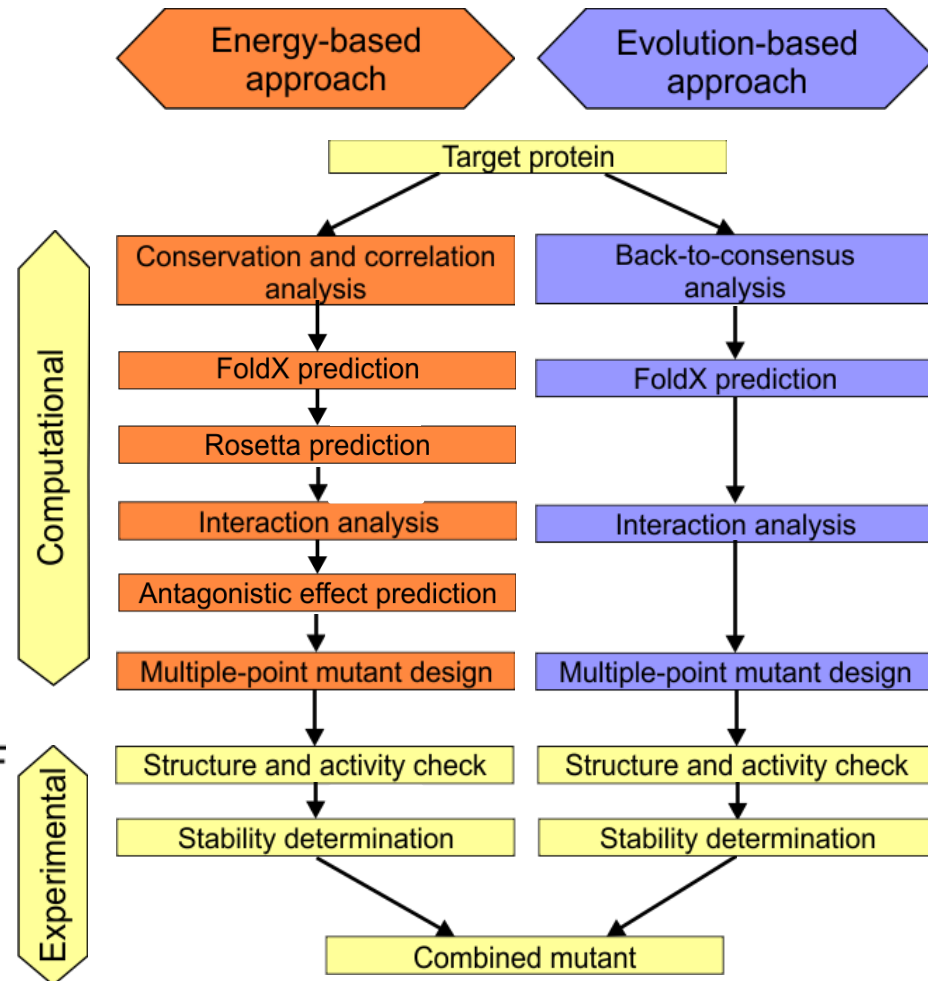
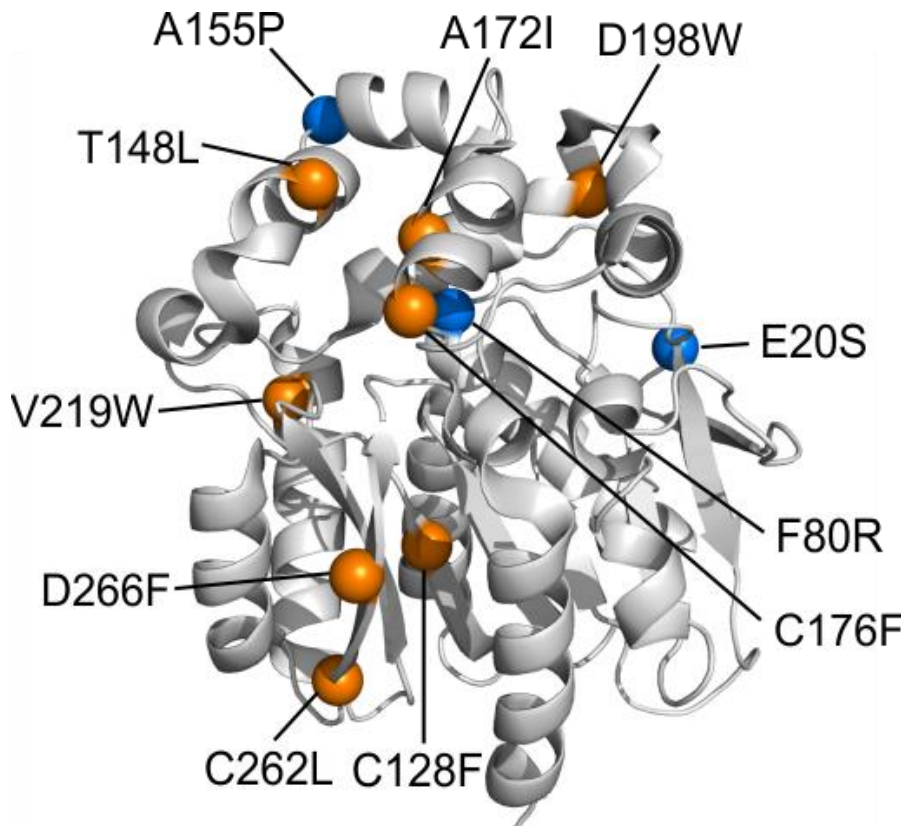
- *In silico* metoda FireProt



Stabilizace dehalogenasy DhaA

Racionální design

- In silico* metoda FireProt



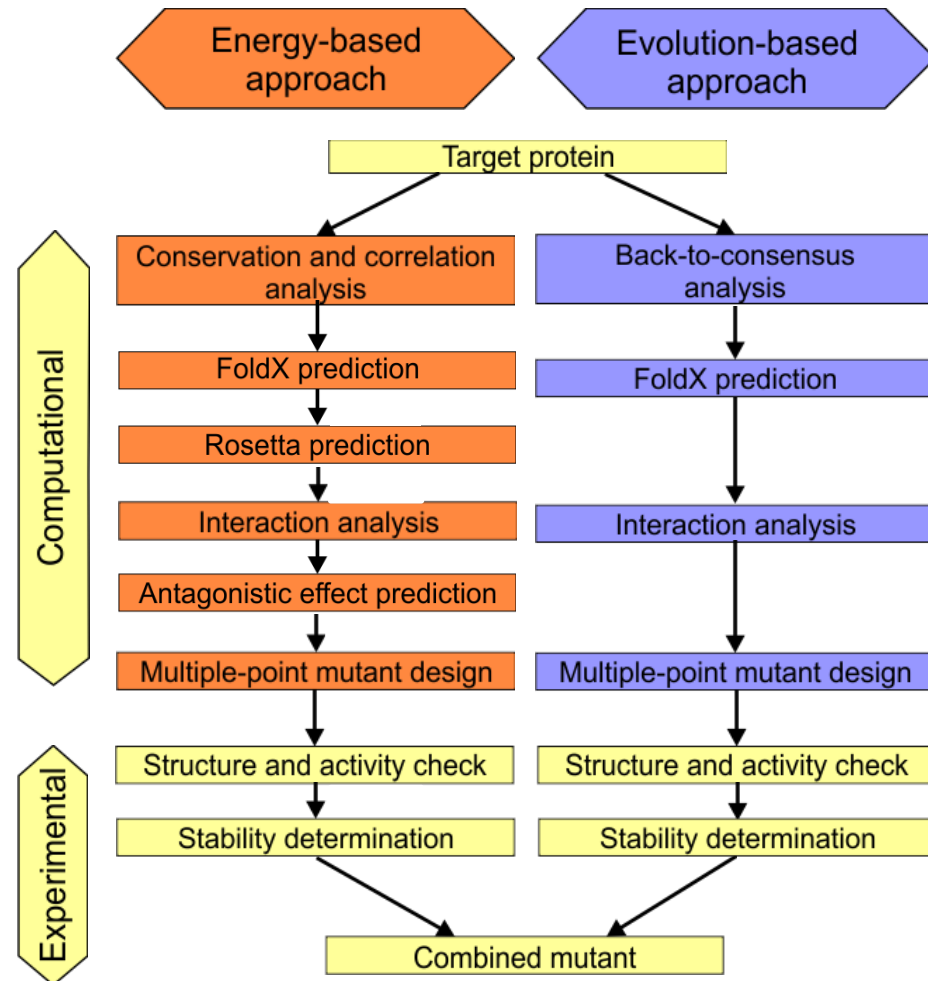
Stabilizace dehalogenasy DhaA

Racionální design

- *In silico* metoda FireProt
- Strukturní a sekvenční analýzy
- **5500** možných mutantů
- **5** experimentálně ověřených
- 3 mutanti stabilnější
- Finální mutant:

$$T_m = 74 \text{ }^\circ\text{C} \text{ (} 25 \text{ }^\circ\text{C } \uparrow \text{)}$$

$$\tau_{1/2} = 72 \text{ h (ca. } 72 \text{ h } \uparrow \text{)}$$



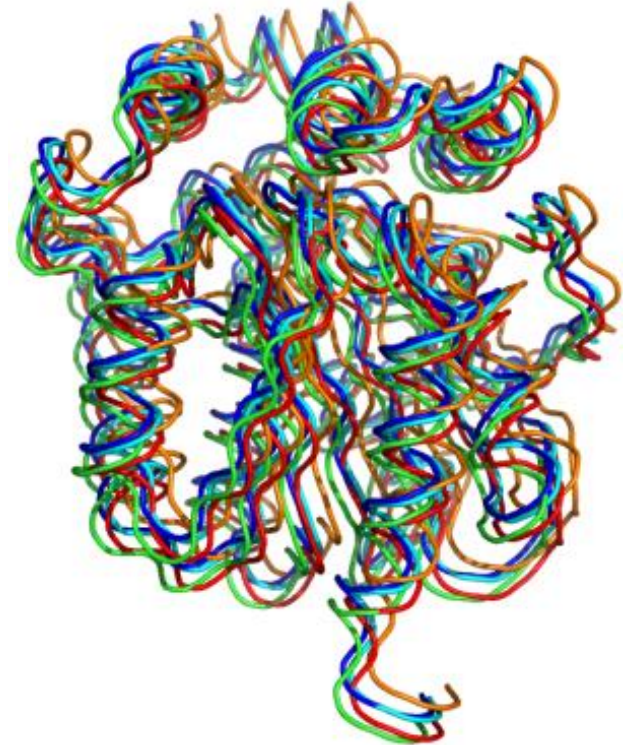
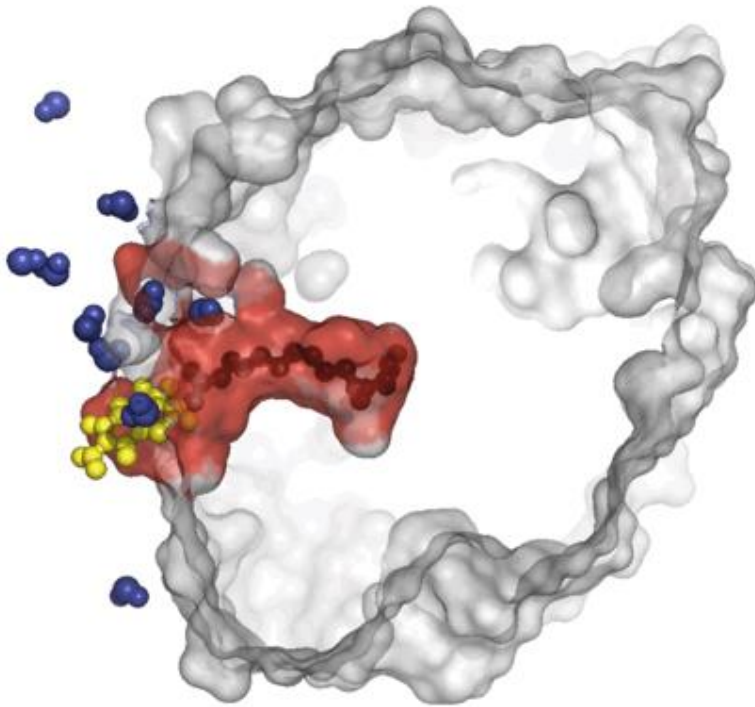
Stabilizace dehalogenasy DhaA

- porovnání

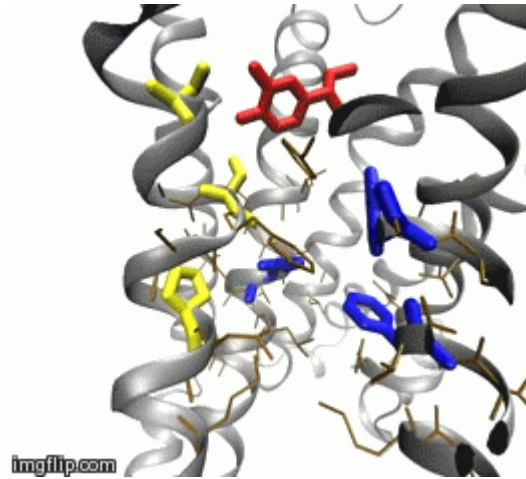
	GSSM	FireProt
Vybavení (Kč)	Desítky mil.	1 mil.
testování		
Výpočetní	-	5 500
Experimentální	120 000	5
náklady (Kč)	1 000 000	80 000
čas	měsíce	týdny
výsledky		
Finální mutant ΔT_m (°C)	18	25
$\tau_{1/2}$ (h)	36	72

Molekulová dynamika

- Popis systému v čase
- Informace o energii, amplitudách a časech pohybů

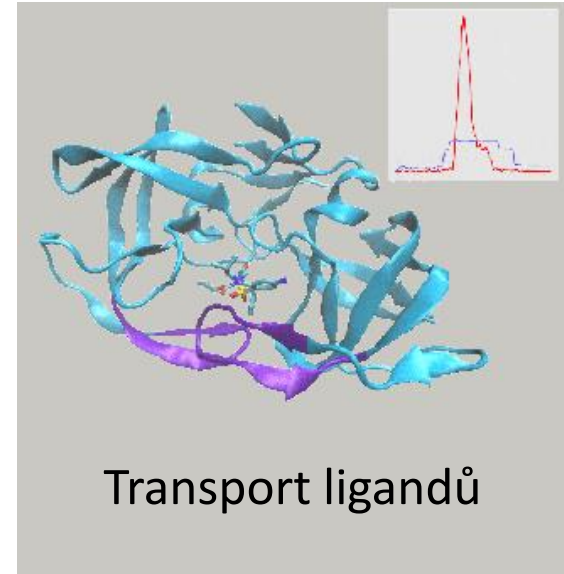


Molekulová dynamika

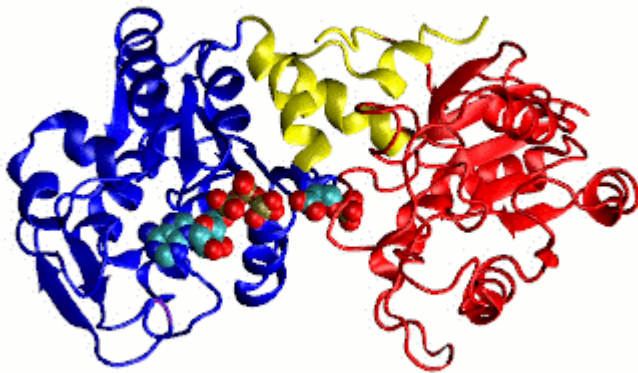


imgflip.com

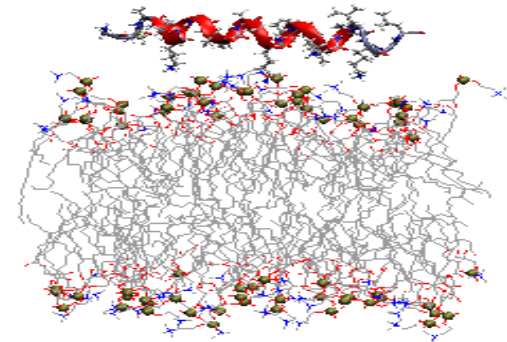
Analýza interakcí



Transport ligandů



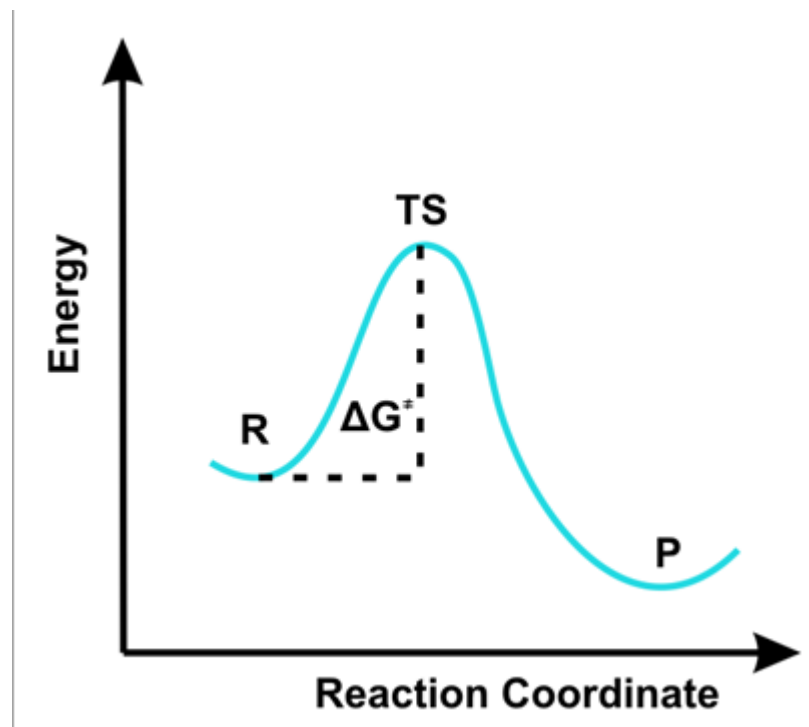
Protein-proteinové interakce



Interakce peptidu s membránou

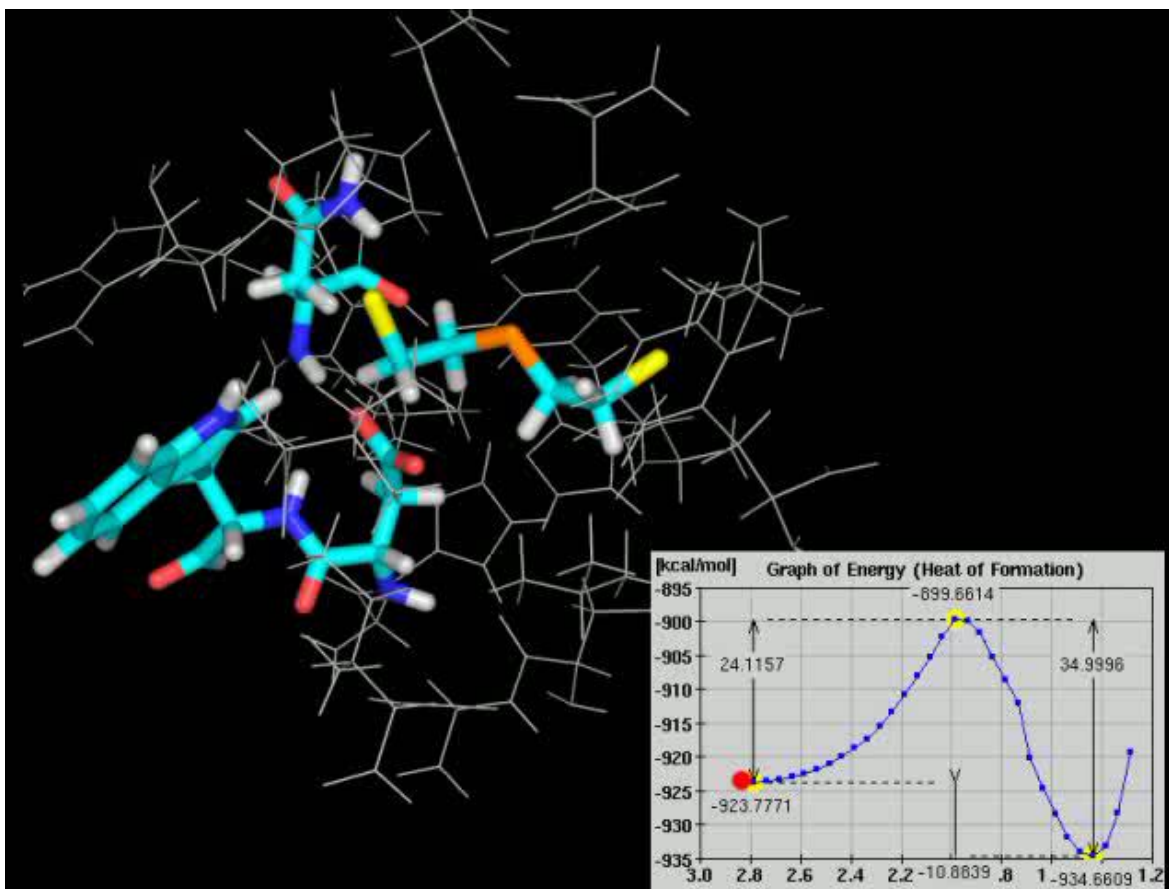
Kvantová chemie

- Modelování reakcí
 - Výpočet rychlosti enzymatické reakce



Kvantová chemie

- Modelování reakcí



Kontakt



David Bednář

Loschmidtovy laboratoře

Ústav experimentální biologie a RECETOX

Budova A13, místnost 219

<http://loschmidt.chemi.muni.cz>

davidbednar1208@gmail.com