

Ортогональная трансляция, изменение специфичности аминоксил тРНК синтетаз

Розанов А.*, Дахневич А., Илюшин Д., Мясоутова С., Тихонова Е.,
Кукушкина А., Иванов Р.

Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Россия

* rozanov.as@talantiuspeh.ru

Ключевые слова: аминоксил тРНК синтетаза; неприродная/непротеиногенная аминокислота; направленная эволюция; пирролизин

Мотивация и цель: Один из путей создания белков и пептидов с новыми свойствами – это включение аминокислот, не встречающихся в природе. Такие аминокислоты называются неприродными или непротеиногенными (НПА). Традиционно такие аминокислоты встраивают, обычно в небольшие пептиды, химическим синтезом или посттрансляционной модификацией аминокислотного остатка. Этот подход имеет множество ограничений, в том числе экономические. Включение НПА позволяет вводить химические группы, которые обеспечивают недоступные для природных белков свойства. В том числе возможна прижизненная встройка НПА [1].

Для чего это может быть нужно? При помощи НПА со взаимно комплементарными группами возможно специфически соединять белки и пептиды, направленно присоединять органические соединения, в обычных условиях без защиты других аминокислотных остатков. Возможно вносить защищенные или модифицированные группировки для химических преобразований. Прежде всего, такой подход может быть актуален при разработке лекарственных средств. Для изучения влияния посттрансляционных модификаций возможно также включение аминокислот уже с модификациями. Отдельные НПА могут иметь флуоресцирующие, или регистрируемые другими методами, группы, что может быть интересно для прижизненного исследования биологических объектов. Еще один вариант использования – это модификация функциональных атомов для изменения аффинности или реакционной способности. Цель научной группы в НТУ Сириус – в первую очередь включение НПА для конструирования пептидов и белков, обладающих уникальными свойствами, для создания фармацевтических субстанций.

В настоящее время пептиды с НПА, встроенными при помощи биологического синтеза, не получили широкого признания, тогда как НПА, встроенные химическим синтезом, находят широкое применение. Это говорит о перспективности данного направления.

Методы и алгоритмы: Первым шагом в развитии биологических систем, направленных на получение аминокислотных последовательностей с НПА, является получение пар аминоксил тРНК синтетаза(АРС)/тРНК, ортогональных другим аминокислотам, тРНК и АРС клетки. АРС не взаимодействует с другими тРНК и аминокислотами. тРНК не взаимодействует с другими АРС в клетке. При этом тРНК должна взаимодействовать с элементами системы трансляции рибосомой и факторами элонгации.

Помимо 20 аминокислот, которые встраиваются в белки большинством организмов, существуют еще две – селеноцистеин и пирролизин. Селеноцистеин включается с использованием дополнительных механизмов, а пирролизин – традиционного механизма рибосомального синтеза при помощи дополнительной пары APC/tРНК. Данная пара была обнаружена в геноме архей и оказалась ортогональной к хозяйским парам APC/tРНК как бактерий, так и эукариот [2]. Именно эта пара стала донором для получения достаточно широкого разнообразия НПА в белки и пептиды. В настоящее время продемонстрировано включение более 200 вариантов НПА в белки после направленных изменений. В основном это производные лизина и фенилаланина/тирозина [3].

Несмотря на то что была показана возможность включения широкого спектра НПА, в большинстве случаев эффективность включения довольно низка. Требуется дополнительная работа для повышения как селективности включения конкретных НПА, так и эффективности работы APC. Возможны два основных принципа для изменения свойств APC. Первый принцип – это рациональный дизайн. Второй – направленная эволюция. Мы использовали второй вариант – метод RACE (phage assisted continues evolution) [4].

Результаты: При помощи RACE из пары пирролизиновой APC/tРНК были получены варианты, способные включать ряд аминокислот производных тирозина: О-аллил-тирозин, о-триазид-тирозин, о-метил-тирозин, п-амин-фенилаланин и 2-хлор-фенилаланин. На первом этапе направленную эволюцию APC проводили в присутствии 10 мМ целевых аминокислот. При меньшей концентрации первый этап эволюции не удавалось проводить. В ходе последовательных итераций направленной эволюции удалось добиться работы системы при снижении концентрации целевых НПА до 2.5 мМ. Работы по повышению эффективности APC продолжаются.

Для анализа свойств полученных APC они были клонированы в штаммы *E. coli*, экспрессирующей ген белка GFP с амбер стоп-кодоном в 6-м положении. Эффективность работы оценивали по уровню флюоресценции. Масс-спектрометрический анализ GFP с включенным о-аллил-тирозином показал, что варианты APC из начальных этапов RACE обладают не только меньшей эффективностью, но и меньшей селективностью. То есть помимо целевой аминокислоты могут включать природные аминокислоты тирозин и фенилаланин. Варианты APC с более поздних этапов эксперимента обладали значительно большей специфичностью.

Выводы: Впервые в России получены штаммы продуценты белков с НПА. Таким образом, нами отработан протокол получения ортогональных пар APC/tРНК для включения целевых НПА производных фенилаланина/тирозина. Данный протокол может быть расширен на производные лизина, гистидина и триптофана. Ввиду того, что в качестве кодона мы можем использовать один вариант – амбер стоп-кодон, в настоящий момент возможно получение пептидов и белков с одним вариантом НПА. Расширение возможностей для параллельного включения нескольких НПА требует разработки нескольких взаимно ортогональных пар и работы над другими элементами транскрипции и трансляции.

Финансирование: Исследование поддержано в рамках реализации государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус».

Orthogonal translation, changing the specificity of aminoacyl tRNA synthetases

Rozanov A.*, Dakhnevich A., Ilyushin D., Myasoutova S., Tikhonova E.,
Kukushkina A., Ivanov R.

Sirius University, Sirius, Russia

* rozanov.as@talantiuspeh.ru

Key words: aminoacyl tRNA synthetase; non-natural/non-canonic amino acid; directed evolution; pyrrolysine

Motivation and Aim: One way to create proteins and peptides with new properties is to incorporate amino acids not found in nature. Such amino acids are called non-natural or non-canonic amino acids (ncAA). Traditionally, such amino acids are incorporated, usually into small peptides, by chemical synthesis or post-translational modification of an amino acid residue. This approach has many limitations, including economic ones. The incorporation of ncAAs allows the introduction of chemical groups that provide properties unavailable to natural proteins. It is also possible to incorporate ncAAs in life cells or animals [1].

What can it be used for? With the help of ncAAs with mutually complementary groups it is possible to specifically connect proteins and peptides, to join organic compounds in a targeted manner, under normal conditions without protecting other amino acid residues. It is possible to introduce protected or modified groupings for chemical transformations. This approach may be relevant primarily in drug design. It is also possible to include amino acids already with modifications to study the influence of posttranslational modifications. Certain ncAAs may have fluorescent groups, or groups that can be registered by other methods, which may be interesting for the lifetime study of biological objects. Another use case is the modification of functional atoms to change affinity or reactivity. The goal of the research group at university Sirius is primarily to incorporate ncAAs for the design of peptides and proteins with unique properties for the creation of pharmaceutical substances.

At present, peptides with ncAAs incorporated by biological synthesis are not widely recognized, whereas ncAAs incorporated by chemical synthesis are widely used. This indicates that this direction is promising.

Methods and Algorithms: The first step in the development of biological systems aimed at obtaining amino acid sequences with ncAA is to obtain aminoacyl tRNA synthetase (aaRS)/tRNA pairs orthogonal to other amino acids, tRNA and aaRS in the cell. aaRS does not interact with other tRNAs and amino acids. tRNA does not interact with other aaRS in the cell. However, tRNA must interact with elements of the ribosome translation system and elongation factors.

In addition to the 20 amino acids that are incorporated into proteins in most organisms, there are two more, selenocysteine and pyrrolysine. Selenocysteine is incorporated using additional mechanisms, while pyrrolysine is incorporated using the traditional mechanism of ribosomal synthesis with the help of an additional aaRS/tRNA pair. This pair was discovered in the archaea genome and was found to be orthogonal to the host aaRS/tRNA pairs of both bacteria and eukaryotes [2]. It was this pair that became a donor for the acquisition of a sufficiently wide variety of ncAAs into proteins and peptides.

The incorporation of more than 200 variants of ncAAs into proteins, following directed modifications, has now been demonstrated. These are mostly lysine and phenylalanine/tyrosine derivatives [3].

Although a wide range of ncAAs have been shown to be incorporated, in most cases the incorporation efficiency is quite low. More work is required to improve both the selectivity of inclusion of specific ncAAs and the efficiency of aaRS. Two basic principles are possible to modify the properties of aaRS. The first principle is rational design. The second principle is directed evolution. We have used the second principle. The PACE (phage assisted directed evolution) method was used in this work [4].

Results: Using PACE, variants capable of incorporating a number of tyrosine derivative amino acids were generated from the pyrrolysine aaRS/tRNA pair: O-allyl-tyrosine, o-triazide-tyrosine, o-methyl-tyrosine, p-amine-phenylalanine, and 2-chloro-phenylalanine. In the first step, directed evolution of aaRS was performed in the presence of 10 mMol of the target amino acids. At lower concentrations, the first step of evolution could not be performed. In the course of successive iterations of directed evolution, it was possible to achieve the system operation when the concentration of target ncAAs was reduced to 2.5 mMol. The works on increasing the efficiency of aaRS, continue.

To analyze the properties of the obtained aaRS, they were cloned into *E. coli* strains expressing the gene of GFP protein with amber stop codon in the 6 position. The performance was evaluated by fluorescence level. Mass spectrometric Analysis of GFP with incorporated o-allyl-tyrosine showed that aaRS variants from the initial stages of PACE have not only lower efficiency but also lower selectivity. That is, they can include the natural amino acids tyrosine and phenylalanine in addition to the target amino acid. aaRS variants from later stages of the PACE experiment had significantly higher specificity.

Conclusion: Strains producing proteins with ncAAs were obtained for the first time in Russia. We have developed a protocol for obtaining orthogonal pairs of aaRS/tRNA to incorporate phenylalanine/tyrosine derivatives into target ncAAs. This protocol can be extended to include lysine, histidine and tryptophan derivatives. Since we can use a single variant, the amber stop codon, it is currently possible to produce peptides and proteins with a single ncAA variant. Expanding the possibilities for parallel incorporation of multiple ncAAs requires the development of multiple, mutually orthogonal pairs and work on other transcription and translation elements.

Funding: The study is supported supported by the grant of the state program of the “Sirius” Federal Territory “Scientific and technological development of the Sirius Federal Territory”.

Список литературы/References

1. Shandell M.A., Tan Z., Cornish V.W. Genetic code expansion: a brief history and perspective. *Biochemistry*. 2021;60(46):3455-3469
2. Wang L., Schultz P.G. A general approach for the generation of orthogonal tRNAs. *Chem Biol*. 2001;8(9):883-890
3. Guo L.-T. et al. Ancestral archaea expanded the genetic code with pyrrolysine. *J Biol Chem*. 2022;298(11):102521
4. Bryson D.I. et al. Continuous directed evolution of aminoacyl-tRNA synthetases. *Nat Chem Biol*. 2017;13(12):1253-1260