

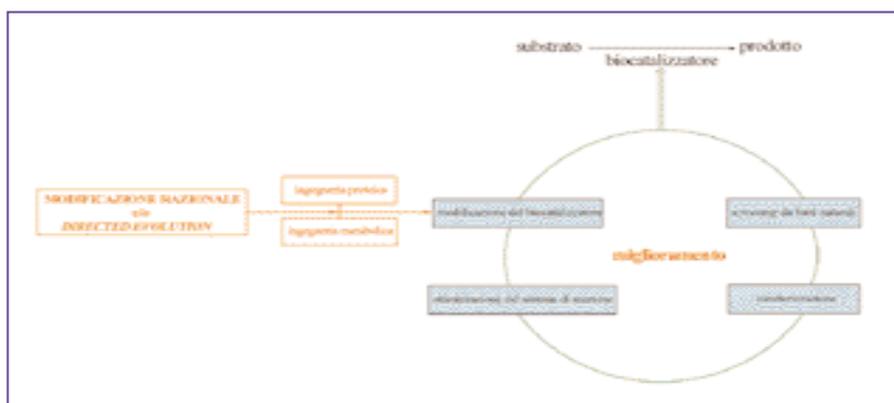
Miglioramento di biocatalizzatori mediante *directed evolution*

di Francesco Molinari e Stefania Iametti

Metodi di *directed evolution* integrano le moderne tecniche della biotecnologia (creazione di librerie di mutanti, ricombinazione *in vitro*, selezione dei mutanti positivi) per migliorare le funzionalità di enzimi e microrganismi. I recenti sviluppi includono la creazione di biocatalizzatori più stabili, più enantioselettivi, con specificità di substrato ampliata e con cammini metabolici migliorati. La combinazione di *directed evolution* e metodi di ingegneria proteica razionale appare molto promettente per la rapida produzione di nuovi biocatalizzatori adatti ad applicazioni industriali in campo farmaceutico, alimentare e della chimica fine.

L'impiego di biocatalizzatori (enzimi isolati o cellule microbiche) in chimica organica costituisce un complemento e, talvolta, un'alternativa ai convenzionali metodi sintetici. Enzimi naturali spesso non offrono le caratteristiche necessarie per applicazioni efficaci in campo industriale, soprattutto in termini di stabilità e selettività. L'efficienza di questi biocatalizzatori può essere aumentata mediante manipolazione dell'ambiente di reazione (*medium engineering*), immobilizzazione, impiego d'opportuni bioreattori (a membrana, a flusso continuo ecc.) oppure mediante la modificazione dell'enzima stesso (V. Figura). I metodi tradizionalmente utilizzati per migliorare le funzionalità di un enzima sono laboriosi (*random mutagenesis*) oppure necessitano di conoscenze dettagliate della struttura proteica e dei meccanismi catalitici coinvolti (*site-directed mutagenesis*). Negli ultimi anni si è sviluppato un nuovo concetto di modificazione proteica, comunemente definito *directed evolution*, che simula *in vitro* la naturale, darwiniana evoluzione enzimatica basata su cicli iterativi di casuali mutazioni, ricombinazioni e selezione dei migliori ricombinanti. La ricombinazione all'interno di una popolazione selezionata amplifica la diversità genetica creando nuove combinazioni di mutanti e può teoricamente migliorare le caratteristiche funzionali del sistema biologico naturale. Questi passaggi sono accele-

F. Molinari, Sezione di Microbiologia Industriale - DISTAM - Università di Milano; S. Iametti, Facoltà di Agraria - DISMA - Università di Milano. francesco.molinari@unimi.it



rati nei processi di *directed evolution* mediante l'impiego delle moderne tecniche di mutazione, ricombinazione e *screening*: la diversità molecolare è indotta in un enzima naturale con metodi di mutazione casuale e/o creando delle diversità nelle sequenze proteiche attraverso ricombinazioni *in vitro* (in particolare metodi di *DNA-shuffling* oppure *error-prone PCR*). I mutanti con funzionalità migliorate sono impiegati in successivi cicli di modificazione/ricombinazione/selezione. Nessuna informazione sulla relazione struttura/attività della proteina è necessaria per applicare metodi di *directed evolution* e questo appare come il principale vantaggio legato a questo approccio rispetto alle tecniche di progettazione razionale. Un passaggio imprescindibile è l'identificazione dei migliori mutanti attraverso *screening* rapidi e praticabili su un grande numero di varianti; in genere è necessario disporre di sistemi di *high throughput screening* (HTS) per affrontare un processo di *directed*

evolution. Si è recentemente svolto il primo congresso europeo focalizzato su questo tema (*Engineering enzymes for biocatalysis by using directed evolution*, Parigi, 16-18 settembre 2002), nel quale sono stati presentati i più recenti sviluppi nel campo delle nuove tecniche impiegate per creare diversità molecolare e per effettuare *screening* sempre più rapidi ed efficienti. Esempi di vantaggiose modificazioni di singoli enzimi o d'interi cammini metabolici sono ormai numerosi e riguardano non solo *miglioramenti* d'attività, specificità, stabilità, ma anche la *creazione* di nuove attività e specificità. In questa nota sono riportati alcuni esempi illustrativi di diverse applicazioni.

Enantioselettività

Il gruppo di Reetz ha impiegato tecniche di tipo *error-prone PCR* e metodi d'analisi basati su spettroscopia di massa per aumentare l'enantioselettività di una lipasi

da *Pseudomonas aeruginosa* (PAL) nell'idrolisi della miscela racemica del *p*-nitrofenilestere dell'acido 2-metildecanoico, passando da un valore di rapporto enantiomerico (E) pari a 1,04 (produzione preferita dell'enantiomero S), caratteristico dell'enzima naturale, ad un E=25 per l'enzima "evoluto". Nessuna delle cinque mutazioni osservate nel miglior mutante è localizzata nel sito di riconoscimento del substrato o nelle sue vicinanze, indicando le difficoltà nel prevedere quali mutazioni possano essere davvero importanti. Più recentemente, lo stesso gruppo ha applicato la mutagenesi combinatoriale di cassette multiple per selezionare un mutante dello stesso enzima (PAL) capace di fornire (S)-2-metildecanoato con E=51; durante questi processi di modificazione proteica sono stati identificati mutanti con enantioselettività opposta. Anche in questo caso, gli aminoacidi sostituiti sono risultati essere in posizioni lontane da quelle del sito di legame proteina-substrato. Cambiamenti nell'enantioselettività di una trasformazione possono essere efficacemente analizzati con tecniche (GC o Hplc chirale, Nmr) difficilmente impiegabili nel caso in cui si debbano valutare le prestazioni di un elevato numero di mutanti. Questo rende complicato utilizzare tecniche di *directed evolution*, soprattutto quando si vogliono migliorare buoni valori di enantioselettività (ad esempio, eccessi enantiomerici di un prodotto intorno al 90%) fino a valori eccellenti (e.e.>97%).

Nuove specificità

La formazione di legami carbonio-carbonio per via enzimatica è di notevole interesse sintetico e molte aldolasi di origine microbica si sono dimostrate catalizzatori altamente stereoselettivi, ma la loro applicabilità è limitata dall'elevata specificità che questi enzimi mostrano nei confronti dei loro substrati naturali.

La D-2-cheto-3-desossi-6-fosfogluconato aldolasi (KDPG) da *Escherichia coli* è un enzima stabile ed efficace nelle reazioni aldoliche di addizione alla D-gliceraldeide-3-fosfato. Fong e collaboratori hanno orientato l'evoluzione della KDPG in modo tale che questo enzima possa accettare anche l'aldeide non fosforilata e D-gliceraldeide-3-fosfato; lo stesso enzima è stato "evoluto" dal gruppo di Wymer, sempre al fine di ampliare lo spettro di substrati accettati dall'enzima. In questo caso si è osservato che la vantaggiosa modificazione era dovuta allo spostamento del residuo catalitico chiave (una lisina)

in una posizione diversa. *Directed evolution* è stata impiegata anche per aumentare la varietà di substrati utilizzati da enzimi ossidativi. Il citocromo P450 BM-3 naturale ossidra acidi grassi con lunghezza di catena tra C12 e C18, mentre i mutanti ottenuti dopo *directed evolution* sono efficienti anche nell'azione su *n*-ottano. La diossigenasi da *Pseudomonas putida* è nota per la capacità di produrre il corrispondente diidrodiolo otticamente puro a partire dal toluene e, mediante evoluzione orientata, è stata ottenuta una sua variante capace di diidrossilare substrati eterociclici, come la 4-picolina.

Stabilità

La stabilità di enzimi verso condizioni non naturali (valori di temperatura o pH estremi, solventi organici, tensioattivi ecc.) è importante in molte applicazioni industriali. La stabilità (misurabile come attività residua dopo trattamento in condizioni particolari) e l'attività iniziale possono essere contemporaneamente migliorate oppure il miglioramento di una di queste proprietà può avvenire a scapito dell'altra. L'attività e la termostabilità di alcuni enzimi mesofili (subtilisine, esterasi) sono state aumentate significativamente mediante strategie di *directed evolution*. Ad esempio, una subtilisina da un *Bacillus* psicrofilo (ceppo TA41) è stata trasformata in un enzima termofilo dopo otto cicli evolutivi: la variante finale possiede attività in ampio intervallo di temperatura (10-60 °C); tredici aminoacidi sono stati sostituiti nell'evoluzione dall'enzima naturale al migliore mutante e ben sei mutazioni coinvolgono la sostituzione di serina con altri aminoacidi. Il confronto tra proteine mesofite e termofile ha rivelato che in enzimi termofili vi è generalmente una presenza ridotta di residui di serina rispetto agli analoghi mesofili. La stabilità verso solventi organici di diverse fosfolipasi è stata aumentata, mentre dalla ossidasi da rafano sono stati ottenuti mutanti stabili verso alte concentrazioni di acqua ossigenata, sodio dodecilsolfato e diversi sali.

Cammini metabolici

La possibilità di produrre nuove molecole naturali mediante la modificazione dei cammini metabolici in cellule microbiche o vegetali è di interesse in campo farmaceutico, agrochimico e nel campo della chimica fine. Un esempio particolarmente brillante riguarda la biosintesi di carotenoidi: l'attività della geranilgeranil difosfato sintasi

è risultata essere cruciale per il controllo della via biosintetica che porta a licopene ed è stata l'obiettivo di un progetto di evoluzione orientata in *Escherichia coli*. Cloni con produzione aumentata fino al 100% sono stati facilmente individuati per osservazione delle colonie più colorate. Anche enzimi di cellule vegetali sono stati modificati mediante *directed evolution* e di nuovo trasferiti in piante. Una desaturasi da *Arabidopsis*, capace di agire esclusivamente su acidi C18, è stata evoluta e selezionata in *E. coli* in modo da ottenere mutanti con specificità estesa ad acidi grassi a catena più corta; l'espressione dell'enzima con specificità ampliata nelle piante ha permesso l'accumulo di acidi grassi monoinsaturi inusuali, con percentuali fino al 25% dell'olio di semi.

Conclusioni

Molti laboratori stanno sfruttando tecniche di *directed evolution*, spesso in concomitanza con approcci di ingegneria proteica "razionale", per generare enzimi sempre più adatti alle esigenze industriali. Questi sviluppi sono accompagnati da contributi creativi in ogni passaggio di questo cammino evolutivo artificiale. Molti di questi progetti sono ostacolati dal fatto che, pur disponendo di sofisticate ed ingegnose tecniche molecolari, i sistemi di valutazione delle funzionalità alterate non sono altrettanto efficaci.

Bibliografia

- [1] F.H. Arnold, *Nature*, 2001, **409**, 253.
- [2] E.B. Cahoon, J. Shanklin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, **16**, 922.
- [3] E.T. Farinas et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, 545.
- [4] S. Fong et al., *Chem. Biol.*, 2000, **7**, 873.
- [5] P.A. Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1997, **8**, 724.
- [6] J. Punnonen et al., *Science and medicine*, 2000, **7**, 38.
- [7] M.T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 2001, **40**, 284.
- [8] T. Sakamoto et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 3882..
- [9] J.D. Sutherland, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2000, **4**, 263.
- [10] C.W. Wang et al., *Biotechnol. Prog.*, 2000, **97**, 922.
- [11] N. Wymer et al., *Structure*, 2001, **9**, 1.
- [12] Y.X. Zhang et al., *Nature*, 2002, **15**, 644.
- [13] H. Zhao, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, 104.