

Modificazione funzionale di enzimi e microrganismi

Nuove metodologie

di Alessandra Stefan e Alejandro Hochkoepler

Nel corso dell'ultimo decennio sono state sviluppate numerose metodologie innovative utili alla modificazione strutturale e funzionale di enzimi, nonché alla costruzione di ceppi microbici di interesse industriale. In particolare, notevole interesse ha suscitato la cosiddetta evoluzione orientata di enzimi, che permette l'individuazione e l'isolamento di varianti enzimatiche a prescindere da informazioni e/o considerazioni di carattere strutturale riguardo alla proteina oggetto di indagine.

Nel corso degli ultimi tre decenni l'utilizzazione di enzimi in campo industriale si è notevolmente ampliata e diversificata grazie al preventivo sviluppo di diversi settori dell'enzimologia, tra i quali è opportuno ricordare:

- l'individuazione e l'ottimizzazione di metodologie di immobilizzazione di enzimi (avvenuta principalmente nel corso degli anni Settanta), che permettono il recupero di questi ultimi al termine del processo produttivo e che sovente conferiscono maggiore stabilità al catalizzatore opportunamente immobilizzato;
- l'introduzione della catalisi enzimatica in solventi organici (a partire dagli anni Ottanta) nel repertorio delle potenzialità applicative degli enzimi, in particolar modo con la finalità di sfruttare proteine ad attività idrolasica per la catalisi di reazioni di condensazione;
- il reperimento, l'isolamento e la produzione (iniziata anch'essa negli anni Ottanta e attualmente in forte progressione) di enzimi intrinsecamente stabili nei confronti di differenti parametri chimico-fisici, quali temperatura, pH, forza ionica.

A fronte di tali innovazioni che si sono concretamente tradotte in processi industriali, attualmente risultano in notevole espansione sia le ricerche riguardanti il reperimento di enzimi da microrganismi estremofili, sia gli studi volti alla modificazione funzionale di enzimi.

L'evoluzione orientata di enzimi

Un importante aspetto dell'enzimologia è quello che si prefigge l'individuazione di varianti enzimatiche caratterizzate da maggiore stabilità o diversa specificità di substrato rispetto alla controparte wild-type, nonché alla costruzione di enzimi artificiali dotati di attività non ancora riscontrate tra i catalizzatori natura-

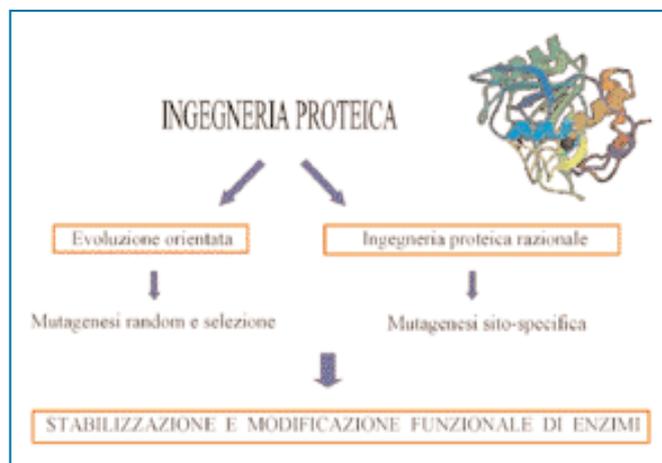


Figura 1 - L'ingegneria proteica razionale si occupa della modificazione strutturale e funzionale di un enzima

li. Il perseguimento di tali obiettivi si avvale tradizionalmente della cosiddetta ingegneria proteica razionale, la quale, a fronte della conoscenza della struttura terziaria di un enzima, si occupa della modificazione strutturale e funzionale di quest'ultimo mediante la sostituzione di specifici amminoacidi con residui alternativi ritenuti opportuni per conseguire la finalità desiderata (Figura 1). L'ingegneria proteica razionale, avvalendosi dei mezzi appena ricordati, si è rivelata in grado di ottenere risultati sorprendenti, tra i quali è opportuno ricordare la costruzione di una proteasi termostabile in grado di conservare la propria attività alla temperatura di 100 °C [1]. Se tale risultato dimostra le enormi potenzialità dell'ingegneria proteica razionale, occorre altresì sottolineare come l'utilizzazione di tale metodologia soggiace ad una serie stringente di vincoli:

- è necessario conoscere la struttura terziaria dell'enzima che si desidera modificare e ciò rappresenta spesso un forte limite, in quanto la maggior parte degli enzimi attualmente utilizzati industrialmente non sono stati caratterizzati dal punto di vista strutturale;
- la possibilità di utilizzare l'ingegneria proteica razionale diminuisce drasticamente all'aumentare della massa molecolare dell'enzima di interesse, in quanto la modificazione razionale di strutture proteiche estremamente complesse è attualmente difficilmente percorribile.

Da quanto appena descritto si può facilmente comprendere come la comparsa di metodologie alternative all'ingegneria proteica razionale sia stata accompagnata, negli ultimi anni, da un notevole interesse. Tali metodologie alternative all'ingegneria proteica razionale sono generalmente denominate come evoluzione orientata di enzimi e sono state efficacemente

A. Stefan, A. Hochkoepler, Dipartimento di Chimica Industriale e dei Materiali - Università di Bologna. hochko@ms.fci.unibo.it

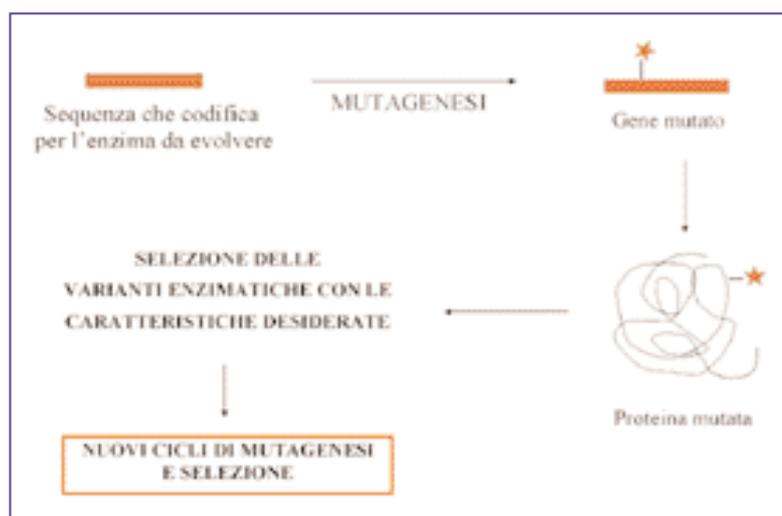


Figura 2 - Evoluzione orientata di un enzima

utilizzate per la modificazione funzionale di enzimi a prescindere da qualsiasi informazione o inferenza riguardo alla struttura dell'enzima oggetto della modificazione medesima (Figura 1). La strategia che si adotta in questi casi consiste infatti nel generare una libreria di mutanti casuali del gene bersaglio (che codifica una particolare proteina di interesse), nel clonaggio della libreria in un opportuno vettore di espressione e nel successivo screening o selezione di quest'ultima; in questo modo alcune varianti dotate di caratteristiche di interesse possono essere individuate e il procedimento può essere a questo punto reiterato fino al raggiungimento dell'obiettivo desiderato (Figura 2). Le modalità mediante le quali si costruiscono attualmente le suddette librerie sono l'utilizzazione di ceppi mutatori e la Pcr mutagenica.

In particolare, i ceppi mutatori sono caratterizzati da una frequenza di mutazioni superiore rispetto a quella che è normalmente esibita dal corrispondente ceppo wild-type; è quindi comprensibile come sia possibile costruire librerie di mutanti di un gene bersaglio semplicemente clonando quest'ultimo in un opportuno vettore, il quale a sua volta possa essere propagato in ceppi mutatori opportunamente scelti; la Pcr mutagenica consiste invece nell'amplificazione del Dna bersaglio in condizioni di scarsa fedeltà di replicazione, che si traduce nella generazione di una popolazione di molecole di Dna mutanti. Storicamente, il primo esempio di evoluzione orientata di enzimi è rappresentato dall'utilizzazione di ceppi mutatori di *Escherichia coli* allo scopo di isolare una variante dell'enzima kanamicina nucleotidil-transferasi dotato di termostabilità superiore rispetto al corrispondente enzima naturale [2]. Recentemente è stata inoltre indagata l'influenza del tipo di vettore e delle modalità di propagazione di quest'ultimo in ceppi mutatori nei confronti dell'efficienza della procedura di evoluzione orientata di enzimi [3]. Il DNA shuffling [4] è una metodologia decisamente utile a programmi di evoluzione orientata e consiste essenzialmente nella

frammentazione di una libreria di mutanti, nella successiva ricombinazione *in vitro* dei corrispondenti frammenti seguita a sua volta dall'assemblaggio di questi ultimi fino ad ottenere molecole la cui massa molecolare corrisponde a quella del gene di partenza; infine, i geni ricombinanti così ottenuti possono essere amplificati mediante Pcr convenzionale. L'importanza del Dna shuffling risiede nella possibilità che questa tecnica offre di ricombinare frammenti genici che contengono mutazioni casuali (inserite con qualsiasi altra tecnica) con frammenti wild-type: in tal modo è possibile rimuovere da alcuni cloni mutazioni sfavorevoli eventualmente presenti; tali cloni possono essere successivamente utilizzati per successivi cicli di mutagenesi, shuffling, screening o selezione.

Nuovi biocatalizzatori

Numerosi e interessanti esempi di evoluzione orientata di enzimi sono stati effettuati con le tecniche appena menzionate e riportati in letteratura (Tabella). A questo proposito è opportuno sottolineare come, tramite evoluzione orientata, sia stato possibile isolare enzimi dotati di notevole termostabilità o di stabilità nei confronti di solventi organici polari [5]. Particolarmente interessante è l'osservazione che l'evoluzione orientata possa assistere nella costruzione di varianti enzimatiche la cui efficienza catalitica è indipendente dal cofattore naturalmente necessario al medesimo processo catalitico [6]. Numerosi ed interessanti sono inoltre gli esempi che riportano la modificazione della specificità nonché della stereoselettività di enzimi potenzialmente utili dal punto di vista industriale [7]. Rilevante a questo proposito è ricordare come l'enzima β -galattosidasi di *Escherichia coli*, codificato dal gene *lacZ*, sia stato evoluto in una corrispondente proteina dotata di attività β -fucosidasi [8]: la struttura della proteina bersaglio è infatti in questo caso estremamente complessa (la β -galattosidasi di *Escherichia coli* è una proteina costituita da quattro subunità, ciascuna contenente 1.025 amminoacidi) e difficilmente un programma di ingegneria proteica razionale potrebbe essere in

Esempi di evoluzione orientata

Enzima	Proprietà	Anno
β -lattamasi	Attività e specificità verso antibiotici	1994
Subtilisina E	Attività in solventi organici	1996
<i>p</i> -nitrobenzilesterasi	Specificità di substrato	1996
Lipasi di <i>Pseudomonas</i>	Termostabilità	1996
β -galattosidasi	Specificità di substrato	1997
operon <i>ars</i>	Aumento di resistenza all'arsenico	1997
Lipasi di <i>Pseudomonas</i>	Aumento enantioselettività	1997
Bifenildiosigenasi	Aumento capacità degradative	1998
Subtilisine di <i>Bacillus</i>	Termostabilità, attività a pH acidi e basici	1999
IGPS di <i>Sulfolobus</i>	Aumento attività catalitica a basse temperature	2000
β -lattamasi	Aumento resistenza ad antibiotici (ceppo ipermutatore)	2001
Genoma	Proprietà	Anno
Retrovirus MLV	Aumento tropismo cellulare	2000
<i>Lactobacillus lacti</i>	Aumento acido-tolleranza	2002
<i>Streptomyces fradae</i>	Aumento produzione dell'antibiotico tilosina	2002

questo caso intrapreso. A dimostrazione di quest'ultima affermazione si può sottolineare il fatto che le mutazioni inserite in *lacZ* e che conferiscono alla β -galattosidasi attività β -fucosidasi non sono facilmente analizzabili alla luce delle caratteristiche strutturali dell'enzima bersaglio.

Shuffling di genomi

Recentemente la tecnica del Dna shuffling è stata estesa, con successo, alla ricombinazione genomica di microrganismi di interesse industriale, quali batteri lattici o specie appartenenti al genere *Streptomyces* (Tabella, [9, 10]). In questo caso, la procedura prevede la preparazione di una popolazione di batteri mutanti (secondo metodologie tradizionali), seguita dalla preparazione di opportuni protoplasti che permettono la fusione reciproca di diversi mutanti (in numero superiore a 2); tale fusione permette la ricombinazione dei rispettivi genomi e, conseguentemente, l'individuazione mediante screening o selezione dei ricombinanti dotati delle caratteristiche desiderate. La procedura di mutagenesi, ricombinazione, screening o selezione può essere reiterata più volte fino al conseguimento di ceppi caratterizzati da un fenotipo desiderato. L'efficienza dello shuffling genomico è stata valutata quantitativamente ed è stato stimato che l'ottenimento di ceppi di *Streptomyces* ad alta efficienza produttiva di antibiotici risulta, se perseguito mediante shuffling genomico, drasticamente più veloce (secondo un fattore che può es-

sere considerato pari a 20 volte), rispetto al corrispondente isolamento ottenuto mediante metodologie genetiche tradizionali. Si può pertanto ragionevolmente affermare che l'introduzione, nell'ultimo decennio, di efficaci metodologie utili all'evoluzione orientata di enzimi e microrganismi possa determinare, in tempi quanto mai rapidi, un notevole incremento del repertorio di biocatalizzatori potenzialmente utili in svariati settori industriali e che tale prospettiva potrebbe a sua volta incidere drasticamente sui processi produttivi della chimica industriale.

Bibliografia

- [1] B. Van der Burg *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**, 2056.
- [2] H. Liao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83**, 576.
- [3] A. Stefan *et al.*, *FEBS Letts.*, 2001, **493**, 139.
- [4] W.P.C. Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 10747.
- [5] K. Chen, F.H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 5618.
- [6] H. Joo *et al.*, *Nature*, 1999, **399**, 670.
- [7] M.T. Reetz, K.E. Jaeger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1997, **36**, 2830.
- [8] J. Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**, 4504.
- [9] R. Patnaik *et al.*, *Nature Biotechnol.*, 2002, **20**, 707.
- [10] Y. Zhang *et al.*, *Nature*, 2002, **415**, 644.