

Loredano Pollegioni, Mirella S. Pilone
 Dipartimento di Biotecnologie e Scienze Molecolari
 Università dell'Insubria (VA)
 loredano.pollegioni@uninsubria.it
 mirella.pilone@uninsubria.it

NUOVI BIOCATALIZZATORI “SU MISURA”

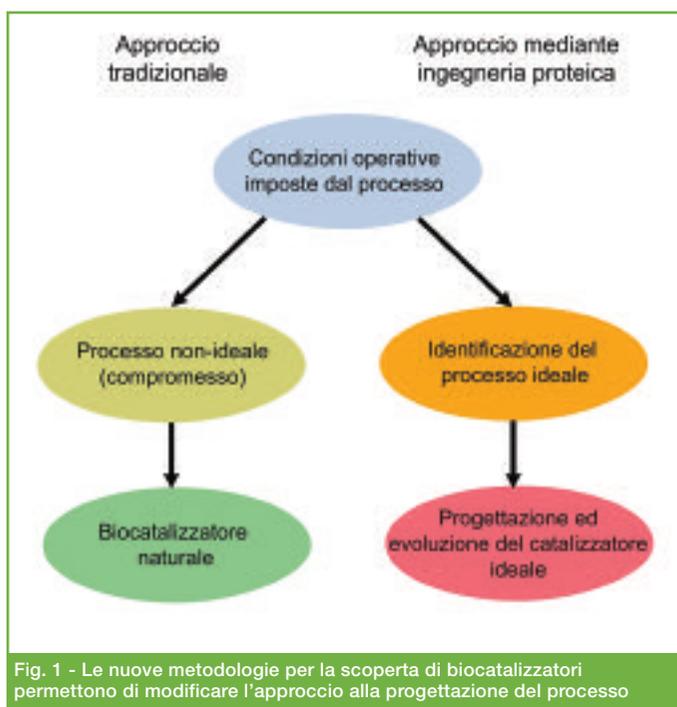
La biocatalisi è oggi una tecnica consolidata per la sintesi organica sia nella ricerca accademica che nell'industria e rappresenta una strategia cruciale in quella che viene definita come “chimica sostenibile”. Sebbene il potenziale delle possibili applicazioni degli enzimi come biocatalizzatori nella produzione industriale di prodotti di chimica fine e farmaceutici sia enorme, queste applicazioni sono sovente limitate dalle intrinseche caratteristiche degli stessi enzimi naturali.

Le proteine enzimatiche native presentano in genere, con rare eccezioni, delle proprietà (ad es. turnover catalitico, stabilità operativa in mezzo acquoso e non-acquoso, al calore, agli agenti denaturanti, ecc.) che sono dettate dall'evoluzione e che possono non essere adatte all'impiego in processi industriali.

Nelle ultime due decadi vi è stato comunque un significativo aumento dell'impiego di biocatalizzatori industriali per la produzione di molecole ad alto valore aggiunto, poiché un processo di produzione industriale condotto mediante biocatalisi presenta spesso il vantaggio di essere una tecnologia ecocompatibile, senza costosi smaltimenti di solventi o prodotti indesiderati, e di essere straordinariamente chemo-, regio- ed enantio-selettivo. In questi ultimi anni vi è stato di

pari passo un notevole incremento delle ricerche nel campo della biocatalisi, che hanno aumentato il numero e la tipologia di reazioni biocatalitiche che si possono condurre in scala produttiva, comprese reazioni redox di particolare difficoltà. Questi progressi si collocano nella frontiera avanzata delle bioscienze e hanno portato ad un approccio innovativo nel cercare di generare biocatalizzatori con non solo nuove proprietà migliorate rispetto all'enzima ‘naturale’, ma esattamente quelle desiderate per condurre una data reazione nelle migliori condizioni possibili.

Gli scienziati sono oggi nella posizione di individuare, se non di progettare, dei sistemi catalitici prossimi all'“ideale” della funzionalità. Il catalizzatore “ideale” è considerato da un biochimico in termini di numero di turnover (k_{cat} , sebbene spesso si usi anche la velocità



massima, V_{max}) e/o di costante di specificità (il rapporto k_{cat}/K_m). Il catalizzatore ottimale per un dato bioprocesso è invece quello che possiede le proprietà adatte per il processo stesso; è ovviamente necessario che l'enzima sia stabile e attivo nelle condizioni di processo, al valore di pH al quale i substrati e i prodotti sono stabili, alla temperatura ed agli altri parametri di reazione. Tuttavia vi è un insieme di condizioni operative imposte, indipendenti dal catalizzatore, che rendono questa definizione non così perentoria, quali ad esempio il costo dell'enzima e/o del prodotto finito, i tempi di messa a punto del processo e di produzione, la produttività, ecc. Infatti, nel paradigma di un bioprocesso ideale, la preselezione delle condizioni ottimali di processo può rendere non ottimali le proprietà di un dato biocatalizzatore; a quel punto sono disponibili varie tecnologie molecolari per l'identificazione o l'ingegnerizzazione del biocatalizzatore (Fig. 1).

Le strategie

Sebbene molti enzimi siano noti nel loro dettaglio strutturale e funzionale, essi rappresentano tuttavia una minima frazione della grande varietà naturale. Questi enzimi si sono evoluti per catalizzare con grande specificità (e spesso anche efficienza) un enorme numero di reazioni in ambito cellulare, realizzando un insieme armonico e coordinato di vie metaboliche in grado di rispondere alle necessità cellulari. Spesso questi enzimi, isolati dall'organismo produttore naturale, hanno proprietà che li rendono utili in varie applicazioni industriali. A questo riguardo un intenso lavoro di selezione ha portato in passato ad isolare varianti naturali da organismi alternativi più adatte all'impie-

go richiesto. Purtroppo tale approccio non sempre ha permesso di identificare enzimi adatti alle richieste applicative (è noto infatti che solo l'1% dei microrganismi può essere coltivato e quindi solo una piccola parte della biodiversità può essere analizzata) anche perché non vi è ragione alcuna che un enzima naturale debba essere adatto a catalizzare reazioni su composti "non-naturali" o in condizioni non fisiologiche di pH e di temperatura o in presenza di solventi organici. La bioinformatica può aiutare nell'identificazione aprioristica della funzione di una proteina mediante un approccio multidisciplinare computazionale e biochimico molto creativo. Su di una recente copertina della rivista *Nature*, che riporta uno schema di struttura proteica, vi è scritto "Form finds function" e si riferisce ad un commento e un articolo specifico sulla possibilità odierna di predire e progettare una desiderata attività enzimatica da considerazioni che partono da dati strutturali, prendendo in considerazione proteine a funzione nota e con struttura simile [1, 2]. Spesso queste proteine posseggono una sequenza aminoacidica nettamente differente ma a posizioni precise della loro struttura primaria, ad esempio nel sito catalitico, hanno delle sequenze simili. Si possono quindi identificare delle 'superfamiglie' di enzimi che hanno delle parziali similarità di sequenza aminoacidica e che effettuano un'identica reazione su substrati con diversa struttura chimica. Contestualmente si può utilizzare l'ingegneria proteica per progettare nuovi enzimi adatti all'impiego biotecnologico utilizzando tecniche sperimentali che spesso mimano l'evoluzione naturale. In questo settore, tre sono attualmente i principali approcci sperimentali utilizzati per ottenere nuovi biocatalizzatori "su misura" o per usare un termine inglese molto espressivo "custom tailored":

- 1) *progettazione razionale* ("rational design"). È un approccio che data ormai da qualche anno (il primo utilizzo di questa tecnica è del 1982) e consiste nell'ingegnerizzare siti di legame per adattarli a substrati diversi e nel produrre siti con nuovi residui catalitici che ne alterino il meccanismo e/o la funzionalità, agendo quindi essenzialmente sui residui in diretto contatto con il substrato. Richiede quindi una dettagliata conoscenza del rapporto tra la funzionalità e la struttura dell'enzima, e questa è disponibile solo per un numero limitato di proteine. Importanti indicazioni circa le posizioni da modificare e le mutazioni da introdurre possono essere ottenute utilizzando studi di omologia basati sull'allineamento di sequenze corrispondenti a enzimi aventi una specificità di substrato o un meccanismo catalitico vicino/simile a quello cercato. È però oggi chiaro che i fattori che determinano la specificità di un enzima sono molto precisi e coinvolgono spesso il contributo di molti fattori piuttosto che di pochi siti critici; questo rende ragione del fatto che l'approccio di mutagenesi razionale riporta relativamente pochi esempi di successo;
- 2) *evoluzione pilotata* ("directed evolution"). Ha il vantaggio che non richiede conoscenze a priori sulla proteina da modificare poiché si

basa sulla generazione casuale di librerie di mutanti su cui si esegue una selezione per identificare i pochi (spesso pochissimi) mutanti con un miglioramento nella proprietà desiderata; questa evoluzione pilotata può richiedere poche o molte generazioni anche in dipendenza della strategia evolutivistica prescelta. In questo approccio (Fig. 2) un gene viene scelto e poi modificato mediante approcci di mutazione (ad esempio usando la tecnica della PCR in condizioni mutageniche, detta Error-Prone PCR o EP-PCR) e/o ricombinazione (ad esempio mediante la tecnica di ricombinazione del DNA, detta "shuffling"). Allo stato attuale sono noti numerosi metodi sperimentali alternativi che permettono di orientare l'introduzione della variabilità genetica in funzione della percentuale di mutazione o ricombinazione desiderate (e quindi del numero totale dei mutanti da analizzare [3]). L'obiettivo è in genere quello di rimanere nell'intervallo di mutagenicità in cui gli effetti non-additivi delle mutazioni sono prevalenti (ovvero ove sia bassa la probabilità che mutazioni dannose coprano eventuali mutazioni favorevoli). È inoltre ampiamente riconosciuto che le tecniche di ricombinazione permettono un più rapido accumulo delle mutazioni favorevoli identificate in geni diversi. La generazione di librerie di grandi dimensioni e un sistema di selezione efficiente sono considerati gli elementi chiave per l'evoluzione di un nuovo biocatalizzatore. Ciò è assolutamente vero per quanto riguarda la fase di selezione/screening: la cosiddetta prima legge della mutagenesi causale cita "you get what you screen for". Anche per questo passaggio sono state sviluppate una pletera di metodiche [4]. Spesso durante questa fase è necessario utilizzare

contemporaneamente un doppio approccio, ad esempio un saggio "positivo" per verificare l'acquisizione di una proprietà (ad esempio l'attività su un nuovo substrato) e un saggio "negativo" per valutare la perdita di un'altra proprietà (ad esempio l'attività sul substrato naturale). Laddove possibile, la fase di screening dovrebbe prevedere condizioni il più possibile simili a quelle operative al fine di identificare il miglior enzima per la specifica applicazione. Diverso è invece attualmente il punto di vista circa la dimensione della libreria. In passato venivano spesso citati esempi in cui l'acquisizione della nuova funzione richiedeva l'analisi di librerie di mutanti di grosse dimensioni (ad esempio fino a 10^9 varianti) [5]. Attualmente molti autori sono concordi nel ritenere che librerie di 10^4 varianti siano sufficienti per identificare enzimi più efficienti/robusti, riducendo di fatto un passaggio costoso in termini economici e di tempo;

3) *progettazione de novo*. È il metodo più innovativo poiché arriva alla progettazione di nuove proteine funzionali combinando (pochi) elementi strutturali stabili. È estremamente innovativo ed ha raggiunto significativi successi, in particolare nello sviluppo di piccole proteine (polipeptidi) con specifiche proprietà di legame. Va sottolineato come per entrambi i primi due approcci sia necessario il gene codificante per l'enzima di interesse, e in tutti i casi un efficiente sistema di espressione della proteina ricombinante.

L'approccio combinato: alcuni esempi dall'Università dell'Insubria

In questo settore fortemente competitivo, a Varese negli ultimi anni abbiamo cercato di produrre biocatalizzatori con nuove specificità di substrato utilizzando approcci diversi e combinati tra loro. Secondo molti autori modificare la selettività di substrato di un enzima è più complesso che aumentarne l'attività in condizioni differenti [5]. Partendo da un classico tormentone a livello industriale: "better, faster and cheaper", il nostro approccio si è proposto di ottenere risultati significativi in termini funzionali tendendo contemporaneamente a ridurre i tempi necessari per sviluppare l'enzima desiderato. Ciò è stato ottenuto attraverso una rigorosa valutazione su base razionale di ogni passaggio sperimentale.

Un primo esempio della strategia usata nel Laboratorio di Ingegneria Proteica di Varese è rappresentato dall'evoluzione di una cefalosporina C acilasi, ovvero di un enzima in grado di convertire in un unico passaggio la cefalosporina C (CefC) in acido 7-amino cefalosporanico (7-ACA). Lo scopo di questo progetto era di soppiantare il sistema enzimatico a due passaggi (Fig. 3a), che a sua volta da circa 20 anni compete efficientemente con il metodo di produzione chimico di questo importante intermedio per la sintesi di cefalosporine semisintetiche (attualmente per il 7-ACA è stimato un mercato annuo pari a

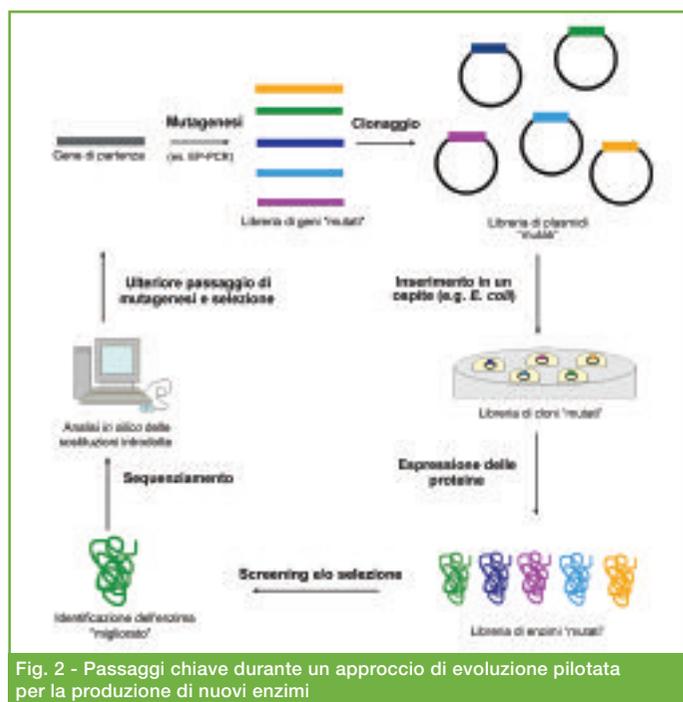


Fig. 2 - Passaggi chiave durante un approccio di evoluzione pilotata per la produzione di nuovi enzimi

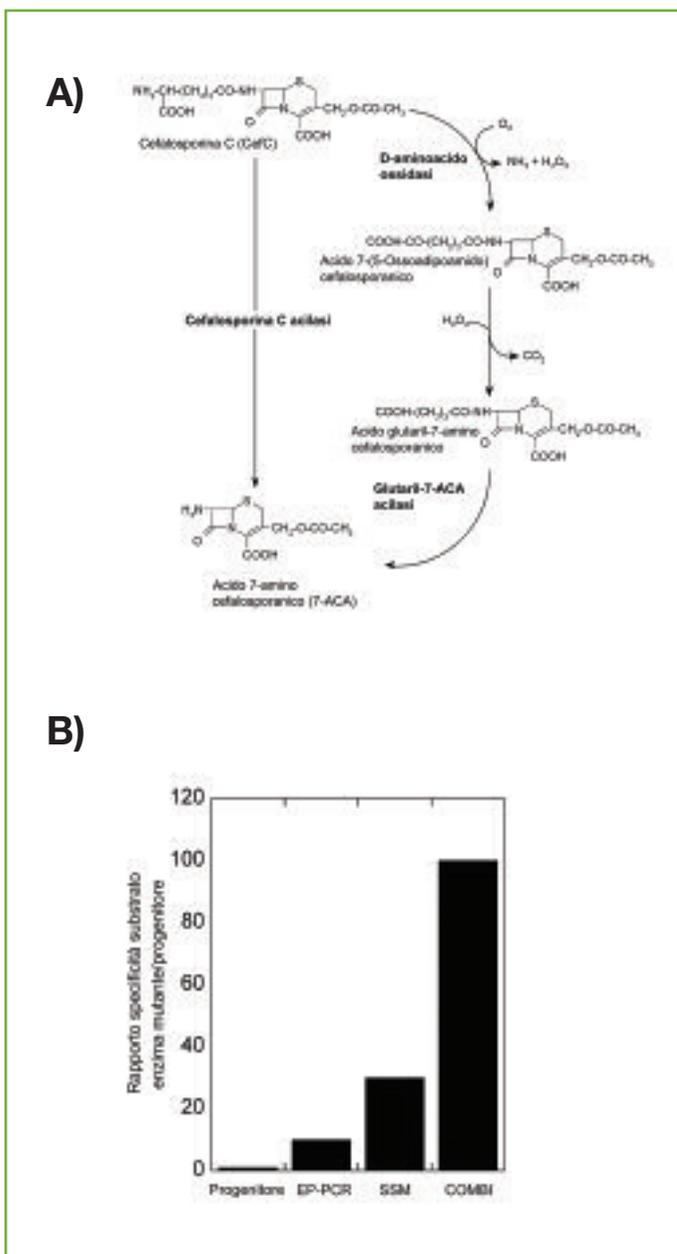


Fig. 3 - Confronto tra la reazione catalizzata dal nuovo enzima CefC acilasi e il classico processo a due stadi per la produzione di 7-ACA da CefC (A); incremento nella specificità di substrato per CefC rispetto al glutaril-7-ACA durante l'evoluzione della nuova attività enzimatica (B)

250 milioni di dollari). In natura non esistono enzimi noti con questa specificità di substrato sebbene alcune glutaril acilasi possiedono una minima attività sulla CefC. Diamo a titolo esemplificativo un elenco dei passaggi critici affrontati in questo progetto:

1) *Scelta del gene progenitore*. Dai dati di letteratura è stata identificata una glutaril acilasi da *Pseudomonas* dotata di una minima attività CefC acilasica (corrispondente al 4% dell'attività dello stesso enzima su glutaril-7-ACA).

2) *Progettazione in silico*. Il corrispondente cDNA è stato progettato e quindi ottenuto per sintesi al fine di ottimizzare la sequenza nucleotidica per i successivi passaggi: i siti di restrizione sono stati localizzati strategicamente per i subclonaggi; l'uso dei codoni (codon usage) è stato ottimizzato per favorire l'espressione della proteina ricombinante in *E. coli*; una specifica sequenza (tag) è stata inserita all'estremità C-terminale della proteina per facilitare la purificazione della proteina ricombinante ecc.

3) *Messa a punto di un metodo di screening colorimetrico*. Il saggio era basato sulla produzione di 7-ACA usando come substrato alternativamente CefC e glutaril-7-ACA, permettendo così di valutare simultaneamente l'aumento dell'attività sul nuovo substrato e la perdita su quello originario.

4) *Espressione e purificazione della proteina progenitore*. Questa attività risultava necessaria per avere una proteina standard da usare come riferimento.

5) *Introduzione della variabilità genetica*. La procedura usata (Error-Prone PCR) ha permesso di produrre librerie di geni modificati (con frequenza di mutazione ottimizzata, 0,1-0,3%) costituite da circa 10^4 cloni per generazione. Date le dimensioni della proteina in oggetto (circa 780 aminoacidi) è stata sottoposta a mutagenesi solo la porzione N-terminale della proteina, quella che abbiamo ipotizzato contenesse il sito attivo. Per ogni generazione sono stati selezionati 2.000 cloni e dopo 3 generazioni sono stati purificati e caratterizzati otto mutanti. Tra questi si osserva un incremento massimo di 10 volte rispetto alla proteina progenitore nella costante di specificità (il rapporto V_{max}/K_m) su CefC rispetto al glutaril-7-ACA (Fig. 3b) e un raddoppio dell'attività specifica.

6) *Identificazione dei residui che sono coinvolti nel legame del substrato e nella catalisi*. Mediante un'analisi *in silico* basata sulla progettazione di un modello tridimensionale dell'enzima in base all'omologia di sequenza con proteine a struttura nota, unita ad analisi di legame ("docking") del nuovo substrato, sono state identificate 11 posizioni critiche.

7) *Mutazioni puntiformi*. In ognuna delle 11 posizioni identificate con l'approccio precedente sono stati introdotti tutti i 20 aminoacidi mediante mutagenesi esaustiva ("site-saturation mutagenesis", SSM). Con questo approccio è sufficiente selezionare 200 cloni per ogni posizione sottoposta a saturazione per avere una probabilità del 96% di avere analizzato tutti i mutanti in quella posizione. Sono così stati identificati degli enzimi mutanti 3 volte più attivi su CefC e con un aumento della costante di specificità di 30 volte rispetto al progenitore (Fig. 3b).

8) *Combinazione delle mutazioni*. Utilizzando i migliori risultati negli approcci precedenti sono stati originati mutanti multipli mediante mutagenesi sito specifica (SDM). Sono stati così prodotti tre

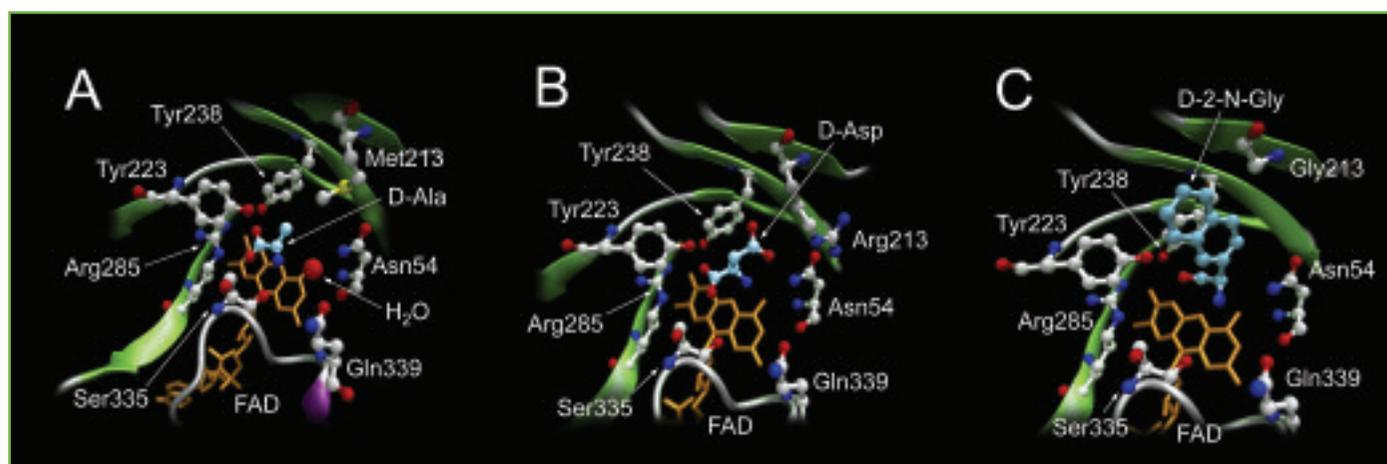


Fig. 4 - Dettaglio della struttura tridimensionale della RgDAAO in complesso con il substrato naturale D-alanina (A) e del modello della struttura del mutante M213R con D-aspartato (B) e del mutante M213G con D-naftilglicina (C)

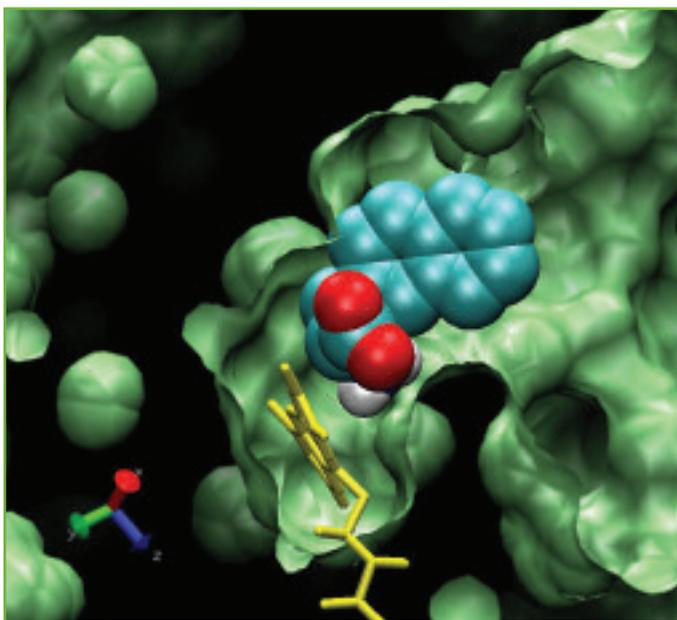
mutanti doppi e uno triplo; quest'ultimo mostra un ulteriore aumento dell'attività su CefC e un considerevole incremento pari a 100 volte nel rapporto di specificità di substrato (ovvero dell'efficienza catalitica su CefC rispetto a quella su glutaril-7-ACA, Fig. 3b) [6].

Va inoltre ricordato (e ciò è fondamentale da un punto di vista brevettuale) che si è contestualmente ottenuta una diminuzione di oltre 10 volte dell'attività sul substrato naturale, rendendo così il nuovo enzima più attivo su CefC che su glutaril-7-ACA ovvero generando una vera CefC acilasi. Il lavoro svolto da Walter Cabri e Roberto Verga (Antibioticos SpA) nell'analizzare operativamente le principali varianti enzimatiche è stato fondamentale per identificare il miglior mutante da usare in bioconversione (non necessariamente corrispondente a quello con i migliori parametri cinetici su CefC); ciò ha permesso di ottenere un enzima in grado di convertire la CefC in un solo passaggio con una resa di conversione del 90% in condizioni simili a quelle usate industrialmente.

Talvolta le necessità del committente, in termini di tempi per l'ottenimento del biocatalizzatore, del costo per il suo sviluppo ecc., non permettono di eseguire tutti i passaggi che abbiamo appena visto per la produzione della CefC acilasi. In questi casi è necessario un approccio ancora più semplice e veloce, ma che frequentemente permette di ottenere risultati comunque soddisfacenti. Noi abbiamo chiamato questo secondo approccio "enzyme factory". Esso consiste nel selezionare un enzima modello per una certa classe (ad esempio la D-aminoacido ossidasi da *Rhodotorula gracilis*, RgDAAO che catalizza le reazioni di deaminazione ossidativa dei D-aminoacidi) che abbia già ottime caratteristiche applicative (ad esempio abbia una elevata attività, sia stabile e facilmente esprimibile e purificabile in forma ricombinante) da cui evolvere in tempi brevi varianti modificate per singole e definite applicazioni.

Ad esempio, mediante un approccio razionale abbiamo progettato *in silico* un mutante che fosse attivo sia sui D-aminoacidi neutri (che sono i substrati fisiologici dell'enzima) che su quelli acidi (che invece non sono ossidati dall'enzima naturale). Studiando le modalità di legame del nuovo substrato D-aspartato nel sito attivo della RgDAAO abbiamo ipotizzato che una carica positiva vicina alla catena laterale acida del substrato stabilizzasse il nuovo substrato nella conformazione adatta per la catalisi (Fig. 4a, b). La sostituzione della metionina 213 con una arginina ha infatti permesso l'ottenimento di una RgDAAO attiva sia sui D-aminoacidi neutri che acidi [7]. Usando un approccio analogo, abbiamo cercato di produrre un enzima più attivo sulle D-naftilglicine, aminoacidi non-naturali importanti come intermedi di farmaci; questi composti sono substrati della RgDAAO naturale ma l'efficienza catalitica è talmente bassa che miscele racemiche D,L di questi composti non possono essere completamente risolte nemmeno usando grandi quantità di enzima e lunghi tempi (> 5 ore) di conversione. L'analisi di legame ha evidenziato la presenza di interferenze steriche che alterano l'interazione corretta di questi aminoacidi non-naturali, la cui catena laterale è ingombrante e rigida, con l'enzima; per aumentare lo spazio nel sito attivo che rendesse possibile di alloggiarli correttamente, la metionina 213 è stata sostituita con glicina (Fig. 4c). Il mutante M213G RgDAAO è risultato in grado di convertire completamente la D-naftilglicina usando una bassa quantità di enzima e in soli 30 minuti [8]. Queste proteine mutanti possono essere progettate e prodotte molto rapidamente: esse non richiedono ulteriori studi di stabilità, espressione ecc., in quanto derivate dall'enzima naturale per introduzione di pochissime mutazioni puntiformi.

Purtroppo esistono proprietà che non possono essere acquisite con un approccio razionale: ad esempio gli studi di modellistica



Modello del legame del substrato non-naturale D-2-naftil-glicina all'enzima D-aminoacido ossidasi

razionale hanno finora fallito nella ricerca di un mutante della RgDAAO attivo su tutti i D-aminoacidi (neutri, acidi e basici). Questo problema è stato risolto usando un approccio di evoluzione pilotata mediante Error-Prone PCR (come riportato sopra per la CefC acilasi). In particolare, due generazioni di mutagenesi casuale hanno permesso di isolare, mediante screening basato sul dosaggio dell'attività enzimatica su tre substrati diversi (la D-alanina come substrato neutro, il D-aspartato come substrato acido e la D-arginina come substrato basico), cinque enzimi mutanti più attivi su tutti

i tipi di D-aminoacidi [9]. Tra questi è stato poi identificato quello la cui attività enzimatica meno dipende dalla composizione della miscela di saggio. Questo enzima mutante è il miglior candidato per sviluppare un biosensore per il dosaggio del contenuto totale dei D-aminoacidi in vari composti biologici, ad esempio negli alimenti ove sono considerati un indice della qualità degli stessi. Va notato che questi ultimi mutanti della RgDAAO contengono soprattutto mutazioni sulla superficie della proteina, in posizioni lontane dal sito attivo. Questi studi indicano che miglioramenti significativi possono anche derivare da cambiamenti in posizioni lontane dal sito attivo e perciò non prevedibili con l'approccio razionale. Un aggiornamento degli studi di ingegneria proteica sulla RgDAAO è stato recentemente pubblicato [10].

Gli esempi riportati non vogliono assolutamente essere esaustivi di una scienza, l'ingegneria proteica, in piena evoluzione. Sono però indicativi delle potenzialità di un approccio che basandosi su strategie sperimentali diverse, e spesso combinate, è ora in grado di rispondere adeguatamente alle necessità del committente, non solo in termini di produzione di adatti biocatalizzatori, ma anche con tempi e costi di sviluppo contenuti, divenendo perciò interessante anche per produzioni medio-piccole. Le tecniche combinatoriali e computazionali sono ormai mature per permettere la progettazione di nuovi enzimi in funzione di specifiche necessità: questo cambiamento avrà effetti profondi sulla biocatalisi industriale ma anche permetterà di produrre enzimi altamente specifici per nuove applicazioni, ad esempio in terapia genica e nella produzione di nuovi strumenti per la ricerca di base e per la diagnostica.

Bibliografia

- [1] J. Stubbe, *Nature*, 2007, **448**, 762.
- [2] B. Seelig, J. W. Szostak, *Nature*, 2007, **448**, 828.
- [3] F.H. Arnold, G. Georgiou, Directed Evolution Library Creation, *Methods in Molecular Biology*, 2003, vol. 231, Humana Press.
- [4] F.H. Arnold, G. Georgiou, Directed Enzyme Evolution, *Methods in Molecular Biology*, 2003, vol. 230, Humana Press.
- [5] H. Tao, V.W. Cornish, *Curr. Opinion Chem. Biol.*, 2002, **5**, 858.
- [6] L. Pollegioni *et al.*, *Protein Sci.*, 2005, **14**, 3064.
- [7] S. Sacchi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 27510.
- [8] A. Caligiuri *et al.*, *Adv Synth. Catal.*, 2006, **348**, 2183.
- [9] S. Sacchi *et al.*, *Prot. Eng. Design Sel.*, 2004, **17**, 517.
- [10] L. Pollegioni *et al.*, *Curr. Prot. Pept. Sci.*, 2007, **8**, 600.

New "Made to Measure" Biocatalysts

While the use of enzymes as biocatalysts in industrial applications has huge potential, their application is often limited by the properties of the natural enzymes. We can now improve existing enzyme activities, modify enzyme selectivities and evolve functions using two rather contradictory molecular tools: directed evolution and rational protein design. However, to fully exploit the potential of protein engineering in industrial applications, it will be necessary to tailor catalyst properties in the context of the specific process in which the biocatalyst is applied.

ABSTRACT