

Lezione 8

Ingegneria Proteica Applicata

Vedremo esempi di utilizzo delle tecniche di evoluzione guidata nella produzione di nuovi enzimi. Molti di questi gruppi hanno cercato di sviluppare soluzioni a problemi reali.

Evoluzione guidata per il miglioramento della stabilità dell'enzima

Lo studio riguarda la sintesi chimica di antibiotici, nello specifico la sintesi di *cefalosporine*. In questi casi è spesso importante proteggere i gruppi più reattivi delle molecole con cui si lavora, perché tra i molti gruppi reattivi si vuole fare la reazione su un gruppo specifico.

Nel caso analizzato i gruppi protettivi usati erano gruppi *para-nitrobenzile estere*.

Il problema specifico è che nel corso delle reazioni di sintesi i gruppi protettivi vanno ad un certo punto rimossi.

La Eli Lilly ai tempi utilizzava tecniche chimiche in cui si usavano catalizzatori a base di *zinco*. L'azienda ha pensato di sostituire alcuni passaggi classici con dei passaggi enzimatici.

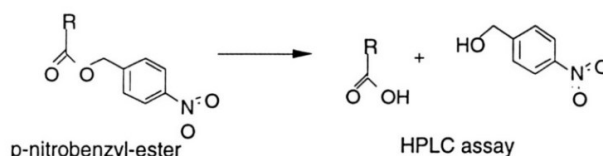
La molecola di interesse è protetta da gruppi *p-nitrobenzile*, che sono legati con un legame estere.

Il punto di partenza è quindi selezionare una *esterasi* per catalizzare la reazione di rottura del legame estere tra molecola e gruppo protettivo. L'enzima però potrebbe non essere ottimale per le condizioni di reazione necessarie.

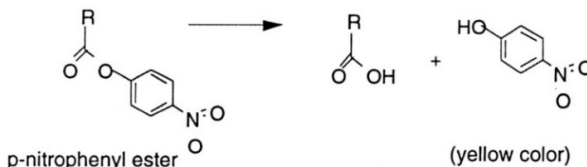
Il primo problema è che questa reazione deve avvenire in solvente organico, nello specifico in *dimetilformamide* (DMF). Le esterasi provate non sono abbastanza stabili in questo solvente.

Il secondo problema è che questo substrato è particolare (probabilmente non è il substrato più vicino a quello originale dell'enzima, K_m alta?), quindi le esterasi non sono molto attive.

Desired reaction:



Reaction used in screening:



Un altro problema è lo screening del risultato, perché lavorando con qualche migliaio di varianti servono metodi facili e veloci per analizzare il risultato delle mutazioni.

Se lavorassimo col substrato vero della reazione richiesta, nel momento in cui l'enzima catalizza la reazione si otterrebbero dei prodotti che per essere rilevati richiedono metodi analitici complessi. In questo caso si dovrebbe usare la HPLC, che è una tecnica a basso throughput.

Possiamo però ovviare a questo problema utilizzando un substrato simile a quello di interesse, ma la cui catalisi dà luogo a prodotti facilmente rilevabili e misurabili.

Possiamo quindi disegnare un *para-nitrofenil estere*, nel quale l'idrolisi del legame estere dà luogo alla formazione di *para-nitrofenolo*, che è un substrato *cromogenico*, che dà una colorazione gialla.

Usiamo quindi un substrato sintetico nella reazione come gruppo protettivo.

La nostra esterasi di partenza lavorerà bene su alcuni substrati, ma ha problemi di stabilità nel nostro solvente organico.

Faremo quindi dei cicli di epPCR per evolvere l'enzima perché funzioni nelle condizioni di nostro interesse.

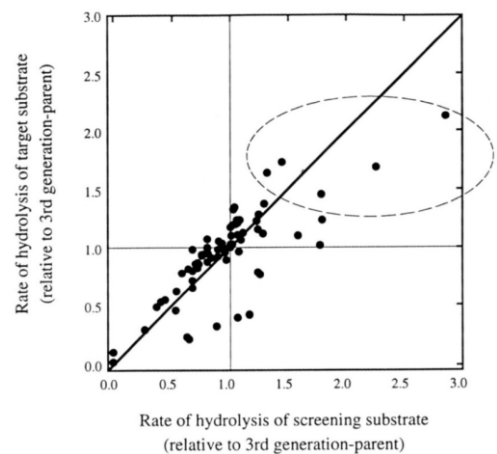
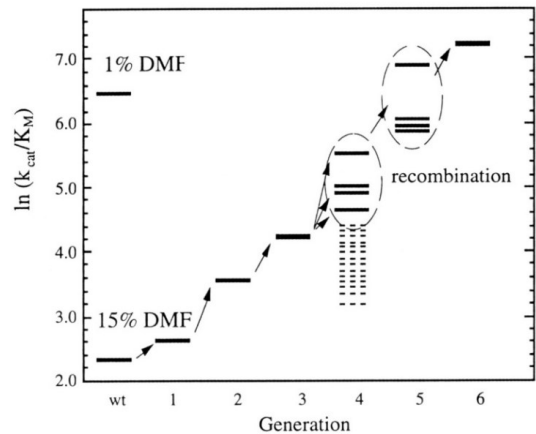
L'analisi di dati è un punto importante di questo studio.

Il lavoro di evoluzione era stato fatto sul substrato *para-nitrofenil estere*, che è diverso rispetto a quello reale della reazione, cioè il *para-nitrobenzile estere*.

Bisogna quindi valutare successivamente l'enzima evoluto sul substrato reale, per validare la strategia di screening utilizzata.

Vengono selezionati circa 60 mutanti con buone performance sul substrato modello, da valutare sul substrato originale. La valutazione viene fatta su HPLC, che è fattibile per un numero così ridotto di varianti selezionate.

Il risultato è stato che effettivamente gli enzimi che hanno una buona attività sul substrato modello hanno una attività simile anche sul substrato reale.



Dopo 4 generazioni di epPCR si è visto che l'enzima aveva migliorato la sua capacità catalitica di 24 volte. La epPCR lavora aggiungendo mutazioni (tranne nei rarissimi casi di reverse di una mutazione).

A questo punto i ricercatori hanno deciso di proseguire utilizzando lo shuffling.

Un risvolto interessante dello shuffling è che nei vari passaggi vengono rimosse mutazioni amminoacidiche incompatibili tra loro, perché il rimescolamento dei frammenti genici permette l'interscambio tra sequenze diverse, e la selezione favorisce le più attive. Questo si contrappone alla epPCR, dove le mutazioni sono esclusivamente incrementali.

Con lo shuffling i ricercatori hanno ottenuto un enzima più attivo dell'originale ma adattato alle condizioni di reazione richieste dal processo. L'attività complessiva dell'enzima sul substrato di interesse e nelle condizioni di reazione utili è aumentata di 150 volte.

Nei primi anni di evoluzione guidata, la parte che spesso lasciava stupiti era l'analisi del risultato. Alla fine del processo si cercano sempre le mutazioni che hanno permesso di ottenere il risultato, cercandone la localizzazione nella struttura.

Le sostituzioni erano spesso in siti in cui non ce se le aspettava. Questo è quello che succede sempre in realtà. Si è visto che molto spesso le mutazioni si trovano sulla superficie della proteina, e molto raramente nei pressi del sito attivo.

Questo ci fa intuire che mutazioni al livello del sito catalitico sono mal tollerate dagli enzimi, perché molto destabilizzanti.

Frequenti sono le sostituzioni distali, cioè lontane dal sito catalitico. L'enzima è un oggetto flessibile e dinamico, quindi la sostituzione di un aminoacido sulla superficie può avere ripercussioni su tutta la struttura della proteina.

Si è visto inoltre che bastano poche sostituzioni (nell'ordine delle 10, ma spesso anche meno), selezionate nel corso degli esperimenti, per cambiare anche radicalmente l'attività dell'enzima.

Nel corso degli esperimenti di vari gruppi si è visto che alcune delle varianti più termostabili hanno una bassa attività, e viceversa le varianti più attive sono meno stabili. Questo ci dice che per sviluppare più caratteristiche contemporaneamente nello stesso enzima, ad esempio stabilità ed attività, bisogna selezionare le varianti per entrambe le caratteristiche. Screening e selezione vanno quindi applicate in parallelo sulle proprietà che ci interessa evolvere.

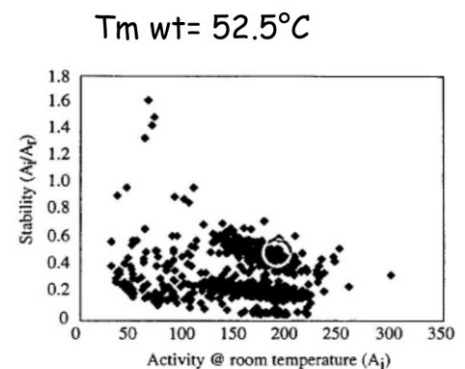


FIG. 2. Results of screening 1,100 clones picked from the second-generation library. Values from multiple screens of the parent enzyme (1A5D1) fall within the circle. Variants with less than 20% of the initial activity of 1A5D1 have been removed.

Questo ci dice anche che attività e stabilità possono essere proprietà indipendenti, che dipendono quindi da combinazioni diverse di aminoacidi.

Nell'esperimento di evoluzione dell'esterasi, analizzando le mutazioni amminoacidiche più importanti in ogni generazione si è visto che le prime mutazioni hanno reso più stabili alcuni loop. Questo ha creato un background più stabile per innestare ulteriori mutazioni utili al miglioramento della funzione. Questo ci ricorda che strutture stabili sono spesso substrati migliori per l'evoluzione.

Da (A structural view of evolutionary divergence - Ben Spiller, FH. Arnold... 1998)

Analizzando tante varianti della esterasi, il gruppo di Arnold ha visto che alcune erano molto stabili. Oltre a vedere la localizzazione delle mutazioni sono state comparate le zone che subiscono i maggiori cambiamenti conformazionali in seguito alle mutazioni.

In questi mutanti si è visto che le mutazioni hanno causato riarrangiamenti topologici a lungo raggio nell'enzima, cioè una mutazione in una certa zona della proteina causa riarrangiamenti in una zona distante.

Questi effetti vanno sempre tenuti in considerazione, perché i riarrangiamenti morfologici di questo tipo possono anche avere conseguenze deleterie sulla proteina.

Evoluzione dell'enantioselettività

L'enantioselettività è un aspetto molto importante in enzimologia. In molte applicazioni, specialmente applicazioni farmaceutiche, è utile ottenere prodotti enantiomericamente puri.

A volte i biocatalizzatori non sono specifici per un enantiomero, oppure la selettività per un enantiomero non è perfetta.

In letteratura ci sono esempi di aumento dell'enantioselettività ottenuti con metodi razionali. Questo non sempre è realizzabile.

Consideriamo che i metodi evolutivi random vengono applicati soprattutto quando l'enzima di partenza è lontano dalle prestazioni che vogliamo ottenere, oppure quando non conosciamo esattamente da cosa dipende la proprietà desiderata.

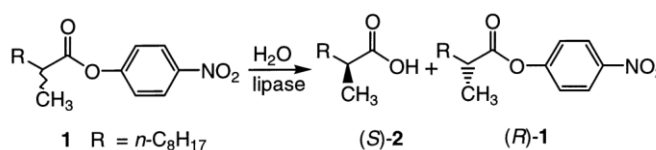
Il punto di un lavoro che andremo ad esaminare era non solo ottenere un catalizzatore performante, ma anche fare uno studio della fattibilità di questo approccio.

Uno dei problemi tecnici è avere metodiche di screening delle varianti ottenute.

Lo scopo del lavoro era ottenere un catalizzatore in grado di catalizzare con elevata enantioselettività l'idrolisi di un substrato modello.

Il substrato modello è la molecola chirale *p*-nitrofenil estere dell'acido metildecanoico.

Si vuole fare una risoluzione cinetica del composto, ottenendo un enantiomero specifico, in questo caso l'enantiomero S.



Il composto di partenza è interessante per lo sviluppo di farmaci.

In questo caso come enzima di partenza si è usata una *lipasi*, nello specifico la lipasi di *Pseudomonas aeruginosa*. Questo enzima ha una minima attività nella reazione di interesse e soprattutto non è specifica. La reazione procede con un *eccesso enantiomerico* del 2%, quindi la differenza nella produzione dei due enantiomeri è solo del 2%, cioè non è specifica per nessuno dei due enantiomeri.

Per lo screening bisogna selezionare un metodo adeguato. In genere la differenziazione degli enantiomeri si esegue con tecniche cromatografiche, come la HPLC, che però sono difficilmente applicabili ad un ampio numero di campioni.

1. Qui si è scelto un saggio in doppio. Sono state usate piccole camere di reazione (96 wells multiwell). Per testare ogni variante servono 2 pozzetti per fare un saggio il doppio. Mettiamo due campioni identici nei due pozzetti, quello che cambia tra i due campioni è il substrato fornito (48 mutanti per multiwell).

In un pozzetto mettiamo l'enantiomero R, nell'altro l'enantiomero S

Fornendo substrati enantiomericamente puri vediamo l'attività dell'enzima rispetto agli enantiomeri puri.

Si fa un saggio semi quantitativo con un prodotto cromatogenico, ma non si riescono a fare valutazioni precise dell'eccesso enantiomerico.

Il gruppo ha usato la tecnica dei epPCR, facendo ad ogni giro un numero abbastanza limitato di mutanti. Ad ogni generazione si sono valutati tra i 1000 e i 2000 cloni.

Ad ogni generazione sono stati estratti un numero compreso tra 1 e 12 varianti interessanti. In questi pochi campioni selezionati si sono eseguiti saggi più precisi, in cui si sono utilizzate cromatografie chirali. Si è valutato l'eccesso enantiomerico dell'enzima nei pochi mutanti selezionati.

I ricercatori hanno introdotto le mutazioni mediante epPCR.

Alla fine della mutagenesi con epPCR gli autori sono passati da un eccesso enantiomerico del 2% ad oltre l'81%. Risultato molto incoraggiante ma non finale, perché rimane una quantità di composto chirale non voluto relativamente ampia.

L'uso di più tecniche di evoluzione guidata può portare a sinergie nel raggiungimento dell'obiettivo.

Si sono fatti poi interventi di mutagenesi a saturazione e mutagenesi sito specifica.

Dai cicli di epPCR si era evidenziato che c'erano delle posizioni particolarmente importanti per la caratteristica oggetto di studio.

Ad esempio, molto interessante sembra la mutazione sull'aminoacido 155.

Su queste posizioni particolari è stata utilizzata la mutagenesi a saturazione.

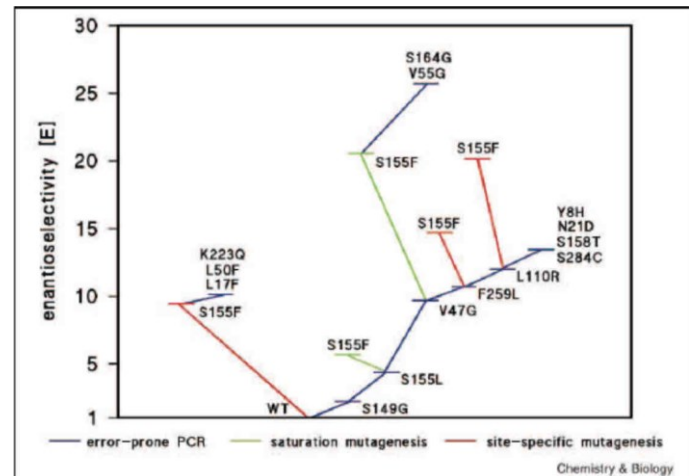
Ad esempio nella posizione 149 si è effettuata una mutagenesi a saturazione, ma si è visto che la prima mutazione ottenuta ($S \rightarrow G$) andava già bene, e non si ottenevano miglioramenti cambiandola.

Anche nella posizione 155 si è fatta mutagenesi a saturazione, e si è visto che in quella posizione l'aminoacido migliore per l'enantioselettività era la *fenilalanina*.

Integrando questo lavoro con lo shuffling si è poi ottenuto un enzima altamente enantioselettivo.

L'analisi strutturale sulle varianti migliori dopo la epPCR ha mostrato che l'enzima più selettivo aveva 5 sostituzioni, 4 delle quali inserivano una glicina. Tutte queste sono situate distanti dal sito catalitico.

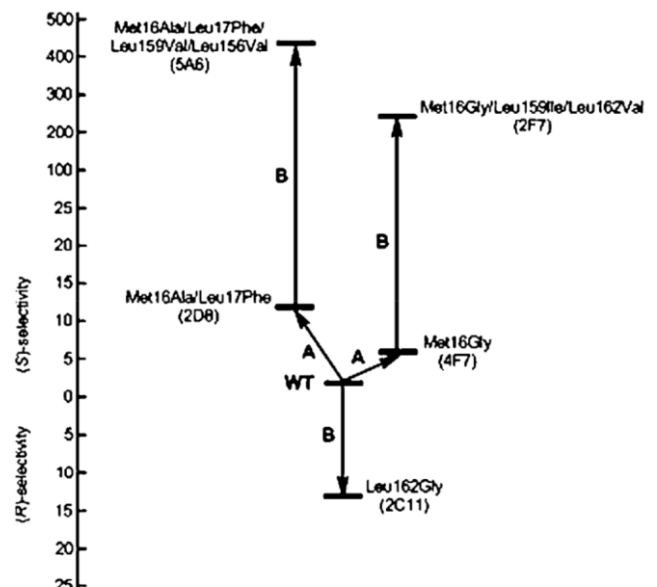
Sappiamo che la glicina è un aminoacido che dà flessibilità alla struttura, il mutante mostra infatti una maggior flessibilità sui loop rispetto al wild type.



Mutagenesi a saturazione iterativa

In questa tecnica vengono individuati degli hot-spot, quindi le singole posizioni importanti per la proprietà di interesse. Su queste posizioni viene fatta la mutagenesi a saturazione, effettuata in modo cumulativo.

Ad esempio, individuo una posizione importante, eseguo la mutagenesi a saturazione e individuo la sostituzione migliore. Sull'enzima migliore così ottenuto seleziono un secondo hot-spot, e faccio una mutagenesi a saturazione su questa posizione. E così via.



Shuffling (da: DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin. Jon E. Ness. 1999)

L'intento dello studio che analizzeremo è l'evoluzione della *subtilisina* per mezzo di shuffling con molte sequenze omologhe.

La subtilisina è una serina proteasi, isolata per prima da *Bacillus subtilis*, che è un enzima usato industrialmente per reazioni di sintesi. Al livello industriale la più usata era l'enzima chiamato *Savinase*.

Il gruppo in questione si chiede se è possibile evolvere una subtilisina con proprietà superiori alla *Savinase*.

Il gruppo parte da un pool di sequenze omologhe che comprende la sequenza della *Savinase* ed altre 25 sequenze di subtilisina ottenute da ceppi di *B. subtilis*. L'identità di sequenza tra queste varia tra il 64 e il 99%.

Nel primo passaggio si esegue lo shuffling del DNA. Si ottengono molti cloni che codificano per diverse varianti. Di queste varianti molte non saranno interessanti o non saranno attive.

La valutazione dell'attività della proteasi è relativamente semplice. Vengono selezionati i cloni su terreno solido arricchito con proteine del latte. I cloni che avranno un alone di chiarificazione attorno produrranno una subtilisina funzionante.

Lo stesso esperimento può essere fatto con un substrato sintetico la cui idrolisi dà luogo a fluorescenza.

Sulle varianti selezionate si testano una serie di caratteristiche.

Le caratteristiche di interesse sono l'attività a 23°C, la termostabilità, la stabilità a solventi organici e la dipendenza da pH. Lo scopo è quindi testare gruppi di attività.

Dallo shuffling dei parentali si selezionano 654 sequenze, e se ne analizzano le proprietà richieste.

La valutazione delle varianti viene fatta considerando sempre le condizioni di reazione scelte, o spesso coppie di proprietà, e paragonandole all'attività dei parentali nelle stesse condizioni.

Si rileva che 77 varianti hanno performance migliori dei parentali.

Si effettua anche l'analisi genetica delle sequenze.

Da questi esperimenti vengono tratte conclusioni interessanti.

Le stesse proprietà tra le varianti possono essere ottenute da combinazioni di sequenze diverse. Si può quindi evolvere la stessa proprietà da sequenze amminoacidiche diverse, le quali però influenzeranno la struttura della proteina e le relative proprietà.

Per ognuna delle proprietà che osserviamo, le sequenze più interessanti sono ottenute da sequenze parentali che non mostravano le proprietà in questione, diversamente da quello che ci si potrebbe aspettare ad esempio mescolando sequenze che già mostravano la proprietà cercata.

Una domanda fondamentale che deriva da questo è:

Perché negli enzimi naturali non troviamo proprietà che ci sembrano in contrasto tra loro?

Evoluzione di operoni batterici

Nello studio che vediamo si utilizzano elementi genici più grandi del singolo gene, nello specifico viene descritta l'evoluzione di un operone batterico.

Gli autori volevano affrontare un problema di decontaminazione di ambienti inquinati. Nel caso specifico erano materiali di scarto delle miniere d'oro. Per l'estrazione di minerali si usano processi di bioleaching, che producono acque di scarico che contengono sali solubili dell'arsenico, che sono tossici.

L'obiettivo era generare microorganismi in grado di detossificare queste acque di scarico.

Il primo passaggio è vedere se ci sono batteri resistenti all'arsenico. Uno di questi batteri è *S. aureus*, che è però considerato patogeno. Si decide quindi di trasferire l'operone di interesse in un altro batterio non patogeno.

L'operone di interesse in *S. aureus* è formato da 3 sequenze importanti:

- *arsR* è una sequenza di regolazione
- *arsC* è la ossidoreduttasi che catalizza la reazione di detossificazione
- *arsB* è una proteina di membrana, che permette l'accesso nella cellula dei composti da trasformare, e il trasporto verso l'esterno dei prodotti di reazione.

Partendo dall'operone di *S. aureus* si genera diversità di sequenza facendo passaggi di epPCR. Si esegue poi frammentazione delle sequenze ed infine lo shuffling per miscelare le sequenze. Si riassemblano con PCR senza primer e solo alla fine si amplifica con primer.

Si inseriscono le sequenze nei vettori, in questo caso *E. coli*.

Nelle sequenze che stiamo mescolando ci saranno mutazioni che daranno un effetto positivo. Ci sono anche mutazioni che ci daranno effetti negativi.

Con lo shuffling, selezionando per la proprietà di interesse, si avranno sequenze arricchite per le mutazioni positive. Si tende ad ottenere quindi sequenze più adatte per la proprietà selezionata.

In questo caso si può effettuare una selezione invece di uno screening.

Il motivo è che noi vogliamo selezionare un batterio che degrada una sostanza tossica, quindi selezionando in un terreno che contiene sali di arsenico sopravviveranno solo i cloni che sono in grado di degradarli.

Nell'esperimento, partendo dal wild type, vengono eseguiti 3 cicli di shuffling.

Il wild type cresce in terreni contenenti fino a 10 mM di sali di arsenico

Dopo il primo ciclo di epPCR fino a 16 mM

Dopo il secondo fino a 64 mM

Dopo il terzo ciclo fino a 400 mM di sali d'arsenico.

Ottenuti i cloni di *E. coli* con alta capacità catalitica sui sali di arsenico, si sequenziano le varianti migliori.

Si vede che su tutto l'operone sono state introdotte 13 mutazioni.

2 mutazioni silenti nella sequenza regolatrice *arsR*

1 mutazione silente nell'enzima *arsC*

10 mutazioni, di cui 7 silenti, sulla pompa per substrato e prodotto *arsB*

Si fanno quindi delle ipotesi.

La pompa di membrana, cioè *arsB*, è una proteina tossica per le cellule che la esprimono, risulta quindi impossibile esprimerla oltre un certo livello.

Le sostituzioni sulla pompa convertono aminoacidi idrofobici in aminoacidi idrofilici. Si ipotizza che il cambiamento nelle proprietà chimico-fisiche permetta un miglior folding dell'enzima, e quindi una sua miglior espressione. Il risultato è un maggior trasporto di substrati ed un accoppiamento ottimale tra trasporto e catalisi dei substrati.

Evoluzione di pathway metabolici

Analizzeremo l'applicazione delle tecniche di evoluzione guidata ad un intero pathway metabolico, nello specifico la sintesi dei carotenoidi. I carotenoidi sono pigmenti naturali che svolgono varie funzioni biologiche. Sono implicati nei processi di visione, ma sono anche utilizzati nella chimica fine come nutraceutici ed in altre applicazioni.

Non tutti gli organismi sintetizzano carotenoidi, ma essendo queste molecole degli isoprenoidi, derivano da pathway metabolici comuni, ad esempio il pathway della sintesi dei terpenoidi.

Lo scopo del lavoro era produrre in un organismo modello, quale *E. coli*, la più grande variabilità possibile di carotenoidi. *E. coli* non ha pathway sintetici per la sintesi di carotenoidi, ma ha il pathway per la sintesi dei terpenoidi.

È possibile modificare le cellule introducendo i geni *crtB* (geranilgeranil difosfato sintasi) e *crtE* (fitoene sintasi), che provengono dal batterio *Erwinia*.

L'introduzione di questi geni nelle cellule permette di sintetizzare il *fitoene*, che sarà il punto di partenza per gli interventi successivi.

Le cellule vengono trasformate con plasmidi contenenti sequenze codificanti enzimi che servono a modificare il fitoene. Si introdurranno *desaturasi*, che introducono doppi legami, e *ciclasasi*, che introdurranno delle strutture cicliche nelle molecole.

Queste sequenze non sono inserite come wild type, ma saranno prima sottoposte ad interventi di mutagenesi random.

A valle della produzione del fitoene quindi le cellule di *E. coli* avranno un'ampia diversità potenziale di espressione di desaturasi e ciclasasi mutagenizzate, e potrebbero essere in grado di produrre molte combinazioni tra substrati e prodotti di questo pathway.

Effettivamente gli autori sono riusciti nel loro intento, ottenendo anche la produzione di *Torulene*, che i batteri non producono.

Questo era un ottimo caso studio per studiare una procedura così complessa, perché i carotenoidi assumono colorazioni diverse in base alla loro struttura chimica. È stato quindi possibile usare sistemi ottici semplici e ad alto throughput per valutare i composti prodotti.

Obiettivi dell'evoluzione guidata in enzimologia industriale

L'applicazione dell'evoluzione guidata in enzimologia industriale in genere si concentra su alcuni obiettivi:

- Aumento di attività catalitica
- Aumento della stabilità
- Aumento della specificità di substrato
- Miglioramento della stereoselettività
- Evitare o diminuire la dipendenza da cofattore

Il problema che si incontra negli enzimi con cofattore è che il cofattore va rigenerato. Ad esempio se l'enzima usa il NAD come cofattore, questo cofattore andrà ossidato nuovamente ad ogni ciclo.

- Conferire resistenza all'ossidazione o a modificazioni chimiche

Ad esempio gli enzimi che si usano nei detersivi lavorano in ambiente ossidante

- Migliorare le proprietà di legame dell'enzima

Evoluzione di nuove attività catalitiche

Ci si è chiesti negli ultimi anni se sia possibile evolvere nuove attività catalitica su scaffold di enzimi naturali.

Ci viene incontro il concetto della *promiscuità catalitica*, che si riferisce al fatto che un enzima possa catalizzare reazioni diverse da quelle in cui performa al meglio.

Una delle maggiori resistenze iniziali a questo concetto era data dal fatto che le proprietà degli enzimi si valutavano sulla loro attività primaria. Ad esempio su una esterasi si andrà a valutare appunto l'attività esterasica, e difficilmente si misura l'attività amidasica. Magari quell'enzima avrà quella attività catalitica, anche se in percentuale molto bassa rispetto alla sua attività principale.

Cercando attività alternative negli enzimi si è visto che molti enzimi hanno caratteristiche di promiscuità, ed altri possono essere agevolmente evoluti per acquisire caratteri di promiscuità.

La promiscuità è una fonte importante di variabilità. Un enzima con una piccola attività nel senso di nostro interesse può essere evoluto in almeno due modi: spostando tutta la specificità verso la caratteristica di interesse oppure evolvendo la specificità secondaria dell'enzima cercando di preservare la sua specificità principale, ottenendo quindi un enzima con doppia attività.

È importante tenere sempre in considerazione la promiscuità quando si vuole evolvere un enzima.

Un approccio che sta riscuotendo interesse è lo studio di sequenze di enzimi ancestrali. Anche senza avere le sequenze a disposizione si possono fare delle ipotesi studiando le sequenze attuali.

Si ritiene che le sequenze ancestrali generassero delle proteine più robuste rispetto alle attuali, più pronte ad accettare variazioni, con ampia specificità di substrato e promiscuità catalitica. Queste proprietà sarebbero estremamente utili nell'evoluzione di enzimi con nuove specificità e proprietà catalitiche. Queste sequenze potrebbero essere maggiormente evolvibili, specialmente per ottenere enzimi con proprietà nuove, non presenti in natura.

Anche senza lavorare su sequenze ancestrali si è provato a modificare in modo razionale per vedere se fosse possibile generare enzimi con una nuova chimica.

In alcuni casi si è visto che con poche modifiche si è riusciti a rilassare la specializzazione dell'enzima e a generare nuove specificità catalitiche.

I metodi computazionali possono risultare sicuramente molto utili nell'esplorazione delle strutture enzimatiche in ottica di miglioramento.

Ci sono esempi in cui sono stati evoluti enzimi con capacità inaspettate di rimozione di inquinanti prodotti dall'uomo in tempi recenti, tempi troppo brevi per l'evoluzione naturale.

Come mai non troviamo proprietà contrastanti negli enzimi attuali?

Adattamento alla temperatura

Ci si è chiesti se ci fosse una incompatibilità fisica tra attività a bassa temperatura e termostabilità, e viceversa se una elevata stabilità impedisca l'attività a bassa temperatura.

Nell'esempio che vedremo gli autori hanno lavorato sulla *subtilisina*.

Si è iniziato con l'analisi di 200 sequenze di subtilisina da svariati organismi che si sono adattati ad un ampio intervallo di temperature.

Si sono comparate queste sequenze, controllando punti in comune e diversità nella sequenza. Si è visto che in questo grande gruppo il fold è in generale lo stesso, e ci sono gruppi di aminoacidi conservati, indipendentemente dalla temperatura. Questi aminoacidi conservati corrispondono a residui che si trovano nel sito attivo, nei pressi del sito attivo e nei pressi del sito di legame dei substrati.

In questi studi si sfruttano enzimi particolari.

In questo caso la Subtilisina S41 è per esempio un ottimo rappresentante degli enzimi psicrofili.

Questo enzima contiene 2 siti di legame per il calcio, di cui uno a maggiore affinità ed uno a minore affinità. Questa subtilisina psicrofila ha molti residui idrofilici sulla superficie (*Aspartato*), presenta loop molto ampi e ha meno interazione ioniche rispetto agli enzimi più termostabili.

Queste modificazioni hanno a che fare con l'adattamento al freddo?

Se allineiamo le sequenze vediamo che c'è una discreta conservazione. Altre differenze sono visibili, ad esempio un lungo loop, che però è visibile anche in una sequenza mesofila.

Gli autori provano a fare ipotesi in base ai risultati dell'evoluzione guidata.

Si sottopone la sequenza S41 a cicli di mutagenesi e selezione, selezionando per due proprietà: stabilità al calore ed attività ad oltre 25°C \geq rispetto al wt.

Questa subtilisina non è stabile alla temperatura. Lo screening è fatto a basse concentrazioni di Ca^{2+} , perché si ritiene che questo ione stabilizzi la proteina.

Si esegue prima una epPCR, si selezionano due varianti migliori e si esegue il metodo StEP per ricombinare le due sequenze tra loro. Si legano le sequenze e si effettua un ulteriore passaggio di epPCR.

La sequenza migliore è stata studiata per valutare le differenze col wt.

Le sostituzioni stabilizzanti si sono verificate in sequenze non conservate. Due di queste sostituzioni si trovano nell'omologo mesofilo. Non ci sono modifiche sui residui di Acido aspartico in superficie e nei siti di legame per Ca^{2+} .

Una certa parte di sostituzioni si trovano su un loop poco organizzato in superficie. Ci si chiede quindi se questa regione non sia quella da cui comincia la denaturazione termica dell'enzima.

Da questo lavoro non si riesce a razionalizzare da cosa dipendano le proprietà psicrofile della subtilina S41. Se paragoniamo i mutanti con la subtilisina mesofila SSII non troviamo differenze evidenti.

Si fa quindi l'esperimento inverso, prendendo la subtilisina mesofila, con omologia del 77% con S41. Questi due enzimi hanno in comune il lungo loop e l'abbondanza di residui acidi in superficie, e si distinguono per queste proprietà rispetto alle altre subtilisine. La SSII non ha attività al freddo.

La subtilisina mesofila SSII viene sottoposta ad evoluzione guidata per mezzo di epPCR. Si ottengono circa 3000 varianti.

Lo screening viene fatto per il miglioramento dell'attività a 10°C, però gli autori non applicano pressione selettiva per la stabilità alla temperatura. I ricercatori volevano effettivamente replicare il processo di evoluzione naturale di un enzima che si adatta alla bassa temperatura.

Si selezionano le 3 varianti migliori per fare ricombinazione con la metodica StEP.

Si ottiene così una variante la cui attività catalitica a 10°C migliorava di circa 10 volte.

Studiando la sequenza ottenuta si è visto che 4 mutazioni erano sufficienti a migliorare l'attività al freddo. Si ha la perdita di una sostituzione in seguito alla procedura StEP.

Si compara l'enzima psicrofilo con il mesofilo evoluto in psicrofilo.

Nessuna delle sostituzioni introdotte nel mesofilo evoluto trova corrispondenza nella subtilisina psicrofila S41.

Enzimi con proprietà contrastanti non sono presenti in natura, non per motivi strutturali per cui questo non possa avvenire, ma perché in natura non si è avuta una doppia pressione selettiva che abbia creato la necessità di evolvere questo tipo di proprietà.

Gli enzimi evoluti per funzionare a basse temperature non hanno avuto la pressione selettiva per evolvere il funzionamento anche ad alte temperature. L'evoluzione naturale segue la pressione selettiva che c'è sugli organismi.

Nella realtà comunque ci sono evenienze in cui si incontrano enzimi psicrofili con un'alta stabilità alla temperatura. Dipende in ogni caso dal percorso evolutivo che la sequenza ha compiuto.