

ELABORATO
“ EVOLUZIONE DIRETTA DELLA LIPASI DI P.
AERUGINOSA ”

Mariacristina Ciocci

INDICE

PREMESSA.....	3
CAPITOLO 1 EVOLUZIONE MOLECOLARE ENZIMATICA.....	4
CAPITOLO 2 EVOLUZIONE DIRETTA DELLA LIPASI DI P.AERUGINOSA PER LA RISOLUZIONE DI ENANTIOMERI.....	13
CONCLUSIONI.....	23
BIBLIOGRAFIA.....	24

PREMESSA

Sebbene gli enzimi siano degli ottimi catalizzatori in condizioni fisiologiche, frequentemente le loro prestazioni in condizioni di processo, in termini di attività, stabilità, ed enantioselettività, non sono soddisfacenti. Le proprietà degli enzimi possono essere ottimizzate mediante tecniche di ingegneria molecolare sfruttando meccanismi tipici dell'evoluzione naturale: generazioni di varianti enzimatiche mediante mutazioni, e selezione delle varianti più idonee mediante saggi di attività.

Questo tipo di approccio atto a migliorare le prestazioni di un enzima viene definito "Evoluzione Diretta".

Il primo caso di evoluzione diretta di enzimi enantioselettivi è stato studiato da *Reetz* in collaborazione con *Jaeger* (*Pure Appl. Chem.*, 2000). I loro studi si sono basati sull'idea che, se l'enantioselettività (% ee) di una reazione di interesse $A \rightarrow B$ è scarsa utilizzando un determinato enzima isolato in natura (*wilde-type*), è possibile aumentare l'enantioselettività dell'enzima a livelli accettabili, combinando appropriati metodi di mutagenesi random, espressione genica, e screening. Applicarono, quindi, le tecniche di evoluzione molecolare enzimatica alla lipasi di *P.Aeruginosa* al fine di ottimizzarne la capacità di risoluzione enantioselettiva. I risultati mostrarono un aumento di enantioselettività da un valore del fattore di selettività pari a $E=1.1$ ad un valore $E > 51$.

In questo elaborato verranno analizzate inizialmente le metodologie che sono alla base dell'evoluzione molecolare, al fine di comprendere le applicazioni di alcune di esse nell'evoluzione diretta della lipasi di *P.Aeruginosa*, che verrà descritta in seguito.

CAPITOLO 1

EVOLUZIONE MOLECOLARE ENZIMATICA

Le caratteristiche di buona reattività, elevata specificità di substrato, ed enantioselettività sono comuni tra gli enzimi naturali e li rendono spesso ottimi catalizzatori. Gli enzimi espressi dagli organismi viventi sono infatti il risultato dell'evoluzione biologica attraverso milioni di anni e le loro funzioni sono improntate ad una elevata specificità in ambienti cellulari o extracellulari. D'altra parte però molto raramente gli enzimi naturali sono direttamente utilizzabili per applicazioni biotecnologiche, dove la produzione di sostanze ad elevato valore aggiunto ed isomericamente pure, è auspicabile avvenga attraverso procedimenti e reazioni di tipo *mild*, ma comunque in condizioni lontane da quelle fisiologiche (ad esempio in presenza di solventi organici).

Sia che l'obiettivo consista nel migliorare le *performances* cinetiche e catalitiche di un enzima, o che gli intenti siano puramente conoscitivi e volti ad indagare su come alterazioni della sequenza aminoacidica influiscano su struttura e funzioni di una proteina, la tecnologia cui più frequentemente e con maggiori possibilità di successo si ricorre è "l'evoluzione diretta".

La tecnica di "evoluzione diretta" trae spunto dalla comprensione dei meccanismi che sono alla base dell'evoluzione biologica: la produzione di un gran numero di varianti geniche e quindi proteiche, attraverso sistemi di mutagenesi e la successiva selezione che consente di distinguere le varianti più adatte oltre che amplificare il corrispondente gene. Questo procedimento simula i processi evolutivi in una scala di tempi estremamente ridotta, ma confacentemente reiterabile e le sue possibilità di successo non dipendono dalla comprensione delle strutture o dei meccanismi catalitici, a differenza di tutti i processi di *rational design* di mutanti, i quali rappresentano uno strumento troppo limitato per eventuali modelli di conoscenza delle relazioni struttura-funzione. Il successo delle tecniche di *directed evolution* dipende invece dalle dimensioni, dalla quantità ed eterogeneità di librerie di mutanti, ed infine, ma in modo cruciale, dalla sensibilità, efficienza e potere discriminante della tecnica di *screening* o di selezione applicata

1.1 STRATEGIA GENERALE DI EVOLUZIONE DIRETTA

La strategia generale per isolare proteine o enzimi con nuove proprietà è riportata in figura 1.

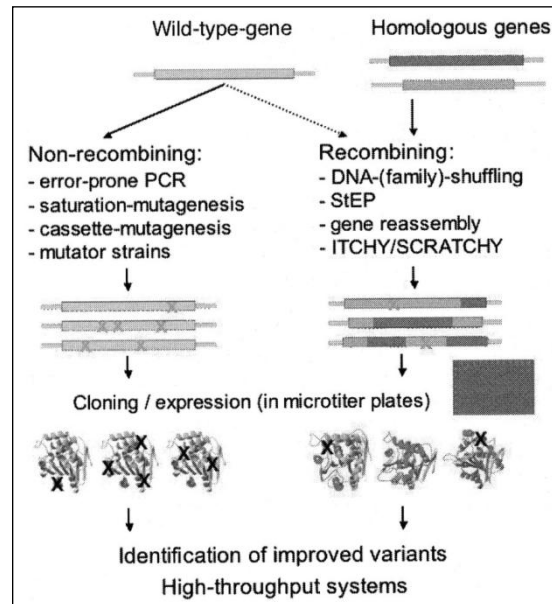


Figura 1

La diversità molecolare viene generata mediante o **mutagenesi random** che introduce variazioni all'interno della sequenza o **metodi diretti** che modificano solo specifiche posizioni, o **ricombinazione** tra sequenze diverse, ottenute mediante mutazione dalla stessa sequenza parentale o appartenenti a differenti sequenze omologhe,

L'efficace overespressione possibilmente in forma extracellulare negli esigui volumi di colture cellulari realizzate in piastre multipozzetto, è il passaggio limitante per la successiva applicazione di un sistema di selezione o di screening. Non appena vengono individuate varianti migliorate, i corrispondenti geni subiscono di solito un nuovo ciclo di mutagenesi. Sebbene la generazione e la over-espressione di una libreria di varianti possa essere in molti casi un lavoro semplice, per molte proteine si rende necessaria la messa a punto di complessi sistemi di clonaggio e di espressione che garantiscano la coespressione di tutti gli elementi che concorrono al corretto *folding* e quindi, in ultima analisi, alla espressione eterologa e secrezione nel mezzo di coltura della proteina di interesse.

1.1.1 LIBRERIE NON RICOMBINATIVE

La generazione di librerie mutanti mediante metodi non ricombinativi comprendono sistemi basati su tecniche di :

❖ ERROR-PRONE PCR

Le metodiche che prevedono la mutagenesi casuale in vitro di sequenze, sfruttano principalmente la cosiddetta *error-prone PCR*, (*epPCR*), una reazione di amplificazione condotta utilizzando Taq-polimerasi a bassa fedeltà dalla quale è stata rimossa l'attività di correzione *proof reading* (come la Taq polimerasi dal batterio *Thermos Aquaticus*). Questo determina, in presenza di condizioni non ottimali, come concentrazioni elevate di Sali Mg^{++} , aggiunta di Sali Mn^{++} , presenza di concentrazioni non bilanciate di nucleotidi, dNTP con analoghi delle basi, un incremento nel tasso di errore, espresso come sostituzioni, da $0,1-2 \times 10^{-4}$ a $1-5 \times 10^{-3}$. La diversità di una libreria di enzimi generata per *error-prone PCR* è di solito calcolata correlando il numero di sostituzioni in basi introdotte nel gene con il numero di sostituzioni a livello aminoacidico introdotte nella sequenza della proteina .

I valori del numero di varianti possono essere calcolati utilizzando l'algoritmo:

$$N = E^M * X * [(X - M * M)]^1 \text{ con } E = 19, \text{ dove:}$$

N = numero di varianti al grado massimo di diversità;

E = numero di possibili sostituzioni aminoacidiche per singola posizione;

M = numero totale di sostituzioni aminoacidiche per molecola di enzima;

X = numero di aminoacidi per molecola di

L'efficienza di generazione delle mutazioni mediante *epPCR* non è omogenea per tutti gli amminoacidi a causa della degenerazione del codice .Ad esempio, sarà molto più probabile alterare un residuo di triptofano (UGG) o di metionina (AUG),specificati da un'unica tripletta, di quanto non lo sia per Leu,Ser o Arg, ciascuno codificato da 6 triplette diverse. Il risultato medio della degenerazione del codice è che circa un terzo di tutte le sostituzioni introdotte mediante *epPCR* non comportano alcuna sostituzione amminoacidica. Questo problema può essere parzialmente superato con la mutagenesi sito specifica a saturazione di alcuni regioni . Questa metodica si basa sull'impiego di oligonucleotidi sintetici che permettono, in modo deliberato, di generare tutte e 19 le sostituzioni amminoacidiche possibili su una determinata tripletta sempre con l'ausilio di reazioni PCR. L'individuazione delle posizioni da sottoporre a sostituzione intensiva (*hot spot* mutazionali

) segue generalmente i primi esperimenti di epPCR ed è inoltre conseguente alla fase di *screening* /sequenziamento dei primi mutanti, da cui si evinca appunto l'importanza di una determinata regione ai fini della specifica alterazione che si vuole introdurre.

Negli esperimenti di *directed evolution*, le varianti enzimatiche identificate nei singoli cicli di mutagenesi casuale sono sottoposte nuovamente a cicli successivi di mutagenesi per cercare di ottenere una ulteriore ottimizzazione delle proprietà dell'enzima come mostrato in figura 2.2.

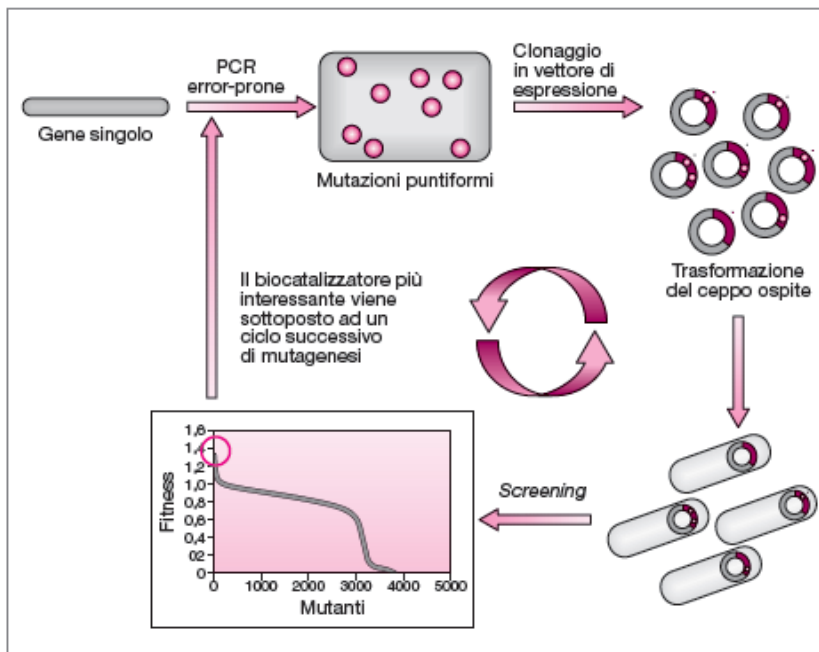
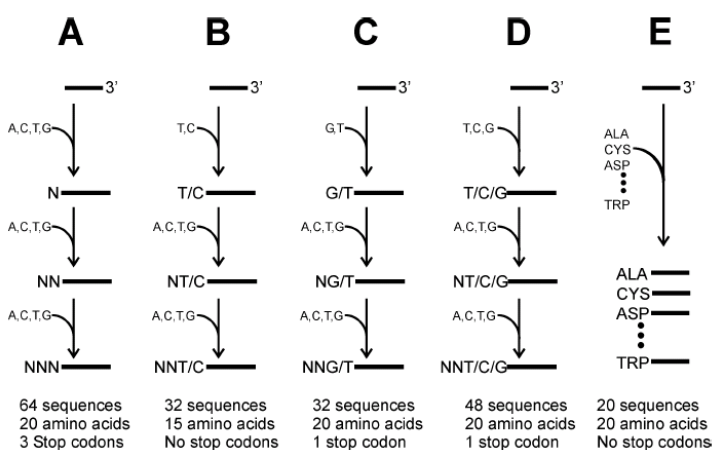


figura 2 : Rappresentazione schematica di un esperimento di *directed evolution* con mutagenesi casuale.

❖ METODI BASATI SU OLIGONUCLEOTIDI



Questo tipo di tecniche si basa sull'utilizzo di oligonucleotidi sintetici contenenti le mutazioni desiderate come prime in reazioni di PCR. Gli oligonucleotidi contenenti codoni random vengono sintetizzati in modo che all'estremità 5' del primer venga incorporata la sequenza random impiegando tutti e quattro i nucleotidi

(figura 3 A) , o una miscela di T/C (figura 3 B) ,G/T(figura 3C) o T/G/C (figura 3D) per ultima posizione . Alternativamente l'utilizzo di trinucleotidi fosforamide permette di introdurre direttamente la miscela di codoni desiderati all'estremità del primer (figura 3E)

I metodi utilizzati per l'incorporazione della mutazione prevedono le tecniche di PCR asimmetrica con *megaprimer* o la *strand overlap extension*.

Il metodo del **Megaprimer** usa tre oligonucleotidi *primers* e due step di PCR. Uno degli oligonucleotidi è mutagenico, mentre gli altri due si appaiono rispettivamente all'inizio e alla fine della regione da amplificare.

Questo metodo di mutagenesi può essere utilizzato quando la mutazione da introdurre si trova ad una delle estremità del gene clonato.

Il *primer* mutagenico insieme al *primer* che si appaia con la regione di DNA più vicina alla mutazione sono utilizzati in un primo step di PCR per amplificare quella regione che prende il nome di *megaprimer*. Quest'ultimo è utilizzato in un secondo step di PCR, nella stessa provetta dove è avvenuto il primo step, in presenza dell'altro *primer*, per amplificare l'intero gene (fig. 4). Il vantaggio di questo metodo è proprio la possibilità di evitare passaggi di purificazione intermedi del DNA che comporterebbe una enorme perdita di materiale e anche di tempo. Tutto questo è possibile giocando sulle diverse temperature di *annealing* dei diversi *primer*.

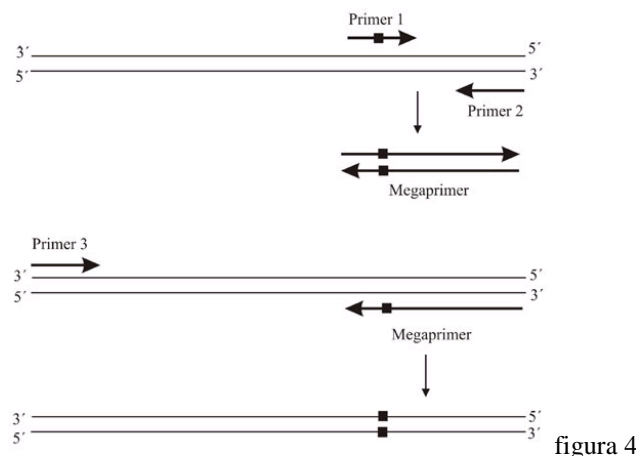


figura 4

La **strand overlap extension** si applica quando la mutazione da introdurre si trova nella zona centrale del gene mutato. Questo metodo utilizza quattro *primer* (figura5). Il *primer 2* viene posto all'estremità sinistra della sequenza che si vuole amplificare il *primer 4* all'estremità destra. Due altri *primers*, 3m e 1m sono complementari al DNA bersaglio tranne nel punto in cui si vuole creare la mutazione (m) ; 3m e 1m sono complementari tra loro. Prima viene fatta una PCR con i *primers 2* e 1m, quindi si amplifica dall'estremità sinistra alla mutazione; in seguito viene fatta una seconda PCR con i *primers 3m* e 4 amplificando dalla mutazione all'estremità destra. Poi i *primer* vengono rimossi e i due prodotti A e B ottenuti dalle due prime PCR vengono mischiati denaturati e riassociati. In alcuni casi una molecola a singola elica di A può appaiarsi con una singola elica di B .La DNA polimerasi potrà quindi allungare l'estremità 3' della molecola creando un DNA a doppia elica di lunghezza totale. Questa molecola sarà amplificata utilizzando i *primer 3* e 4.

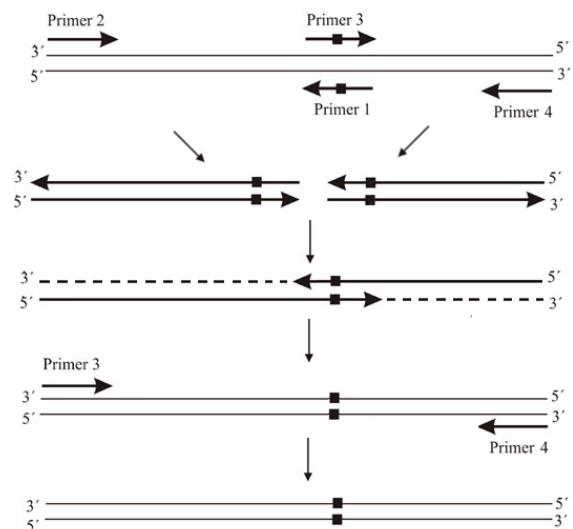


figura 5

❖ RANDOM INSERTION-DELETION (RID)

Nella RID il DNA contenente il gene è convertito in DNA circolare a singolo filamento e tagliato casualmente con Ce (IV)-EDTA (taglio ossidativo). Due cassette linker sono appaiate alle estremità attraverso code a singolo filamento di 10 nucleotidi a sequenza random. Il prodotto è amplificato mediante PCR utilizzando primer la cui sequenza è presente nelle due cassette. Le cassette sono rimosse utilizzando un enzima di restrizione come BciVI (il cui sito di legame è compreso nella cassetta mentre il sito di taglio può essere esterno) ed il DNA viene circularizzato. IL DNA può essere nuovamente linearizzato usando i siti iniziali di restrizione, clonato e sottoposto a screening.

1.1.2. LIBRERIE RICOMBINATIVE

❖ DNA SHUFFLING

La generazione di librerie di mutanti mediante metodi ricombinativi in vitro è stata ottenuta a partire dalla prima metà degli anni 90 (Stemmer 1994) con la tecnica del DNA *shuffling*. Nel procedimento di DNA *shuffling* (figure 6 e 7) i DNA di geni correlati (quindi presumibilmente dotati di sequenze omologhe) sono tagliati con DNasi in modo da generare frammenti di 50-100pb e successivamente riasssemblati in una reazione di *self priming* e di allungamento dell'innesco di DNA catalizzata da una polimerasi. Come risultato i frammenti appartenenti a varie sequenze simili, ma non identiche, vengono riasssemblati in sequenze geniche integre ricombinate poiché è altamente probabile che un frammento di un gene indirizzi su un DNA templato proveniente da un altro gene e funga da innesco per una reazione di allungamento della sequenza. Ulteriore fonte di variabilità è rappresentata dalla introduzione di errori di replicazione dei frammenti: si tratta generalmente di mutazioni puntiformi che subentrano con una sequenza relativamente alta (0.7%),

ma che possono essere evitate dalla applicazione di protocolli ad alta fedeltà di replicazione. Una variante del protocollo di DNA *shuffling* si basa sull'utilizzo di geni omologhi provenienti da specie diverse e sulla esclusione di qualsiasi altra fonte di variabilità che non derivi dal *molecular breeding*.

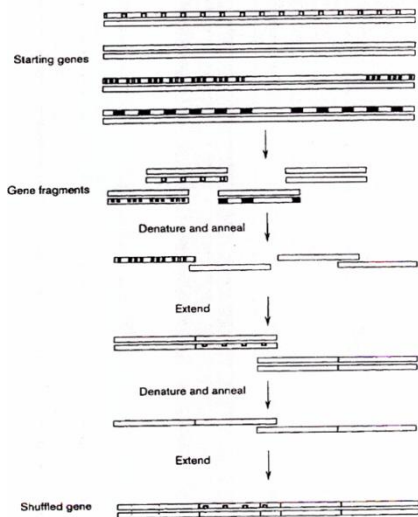


Figura 6

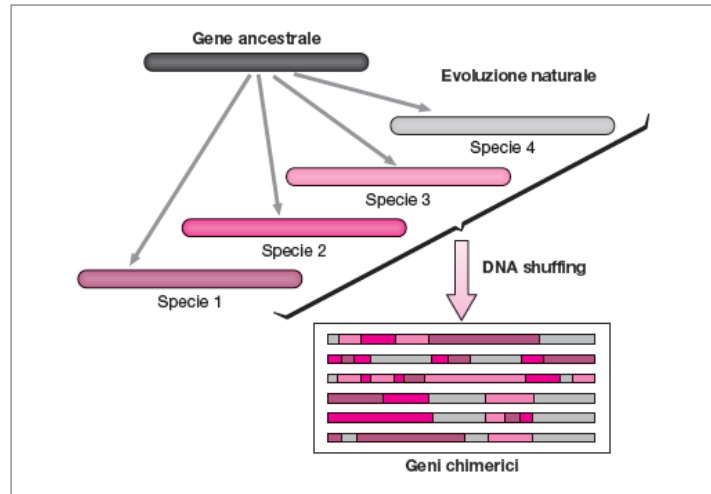


Figura 7: Rappresentazione schematica di un esperimento di evoluzione Diretta con *DNA shuffling*.

❖ STAGGERED EXTENSION PROTOCOL (stEP)

Metodica introdotta da Zhao et al. nel 1998 (figura 8).

In questa tecnica la reazione di PCR viene condotta con una fase di estensione limitata associata a multiple reazioni di scambio tra sequenze stampo e quelle di allungamento. DNA stampo è incubato con uno o più primer e sottoposto a cicli di denaturazione e brevi step di ibridazione/estensione. Tra i vantaggi che questa tecnica offre vediamo la diminuzione della quantità di DNA di partenza e l'assenza della richiesta la frammentazione con una DNAasi.

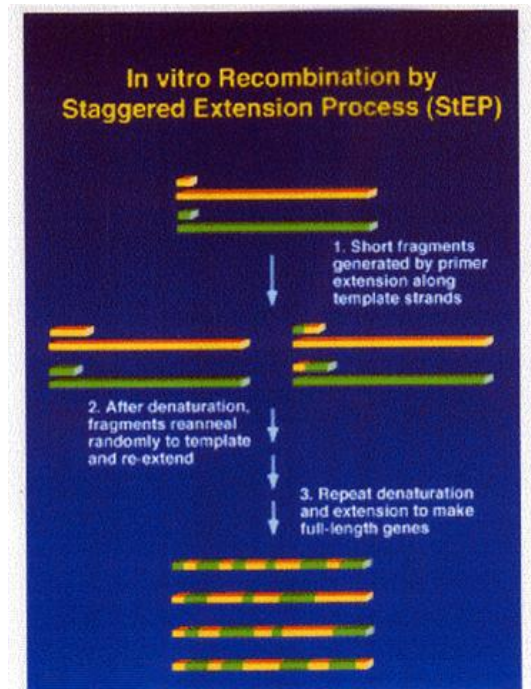
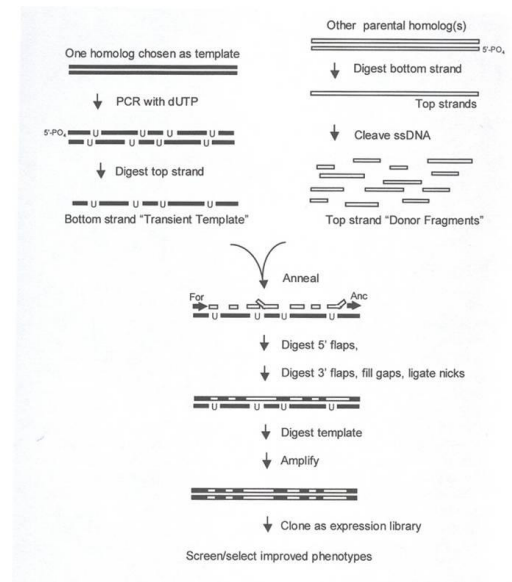


Figura 8

❖ RANDOM CHIMERAGENESIS ON TRANSIENT TEMPLATE (RACHITT Coco et al., 2001)

Tecnica nella quale uno stampo transiente (contenente dU) viene usato per assemblare frammenti ottenuti da più sequenze omologhe parentali seguito da rimozione di flap, riempimento di interruzioni, ligasi e distruzione dell'elica transiente(figura 8)



❖ INCREMENTAL TRUNCATION FOR THE CREATION OF HYBRID ENZYMES (ITCHY)

Questa tecnica (figura 10) ideata da Ostermeier e coll (1999) utilizza due geni parentali completamente diversi che vengono digeriti con ExoIII in modo strettamente controllato in modo da generare librerie di geni troncati con delezioni progressivamente più lunghe e differenti per 1pb. Dalla ligazione dei frammenti 5' e 3' generati a partire dai due geni si ottengono librerie di geni chimerici che vengono espressi e sottoposti successivamente a *screening* o selezione. Tra i vantaggi di questa tecnica vi è soprattutto la possibilità di ricombinare sequenze che non abbiano nessuna grado di somiglianza.

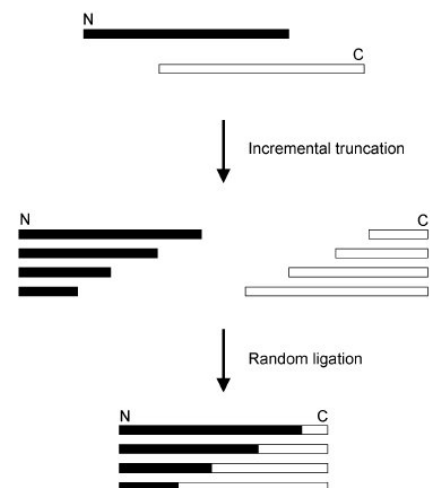


Figura 10

Va notato che il fatto che la ricombinazione riguardi solo due geni per volta e che si formino molecole ricombinanti a seguito di un singolo evento di *cross-over*, riducendo così la diversità eterogeneità delle librerie. Si può ritenere che questi aspetti negativi

possano essere superati dalla applicazione combinata di DNA shuffling e ITCHY (vedi SCRATCHY)

❖ SEQUENZE HOMOLOGY INDEPENDENT PROTEIN RICOMBINATIO (SHIPREC)

In questa tecnica introdotta da Seber et al nel 2001(figura 11), due copie geniche (unite attraverso un sito di restrizione) sono digerite con DNAasi ed i frammenti ottenuti sono circolarizzati e linearizzati di nuovo attraverso il sito di restrizione di collegamento. La reazione utilizza una legazione diretta e non richiede omologia tra le sequenze parentali.

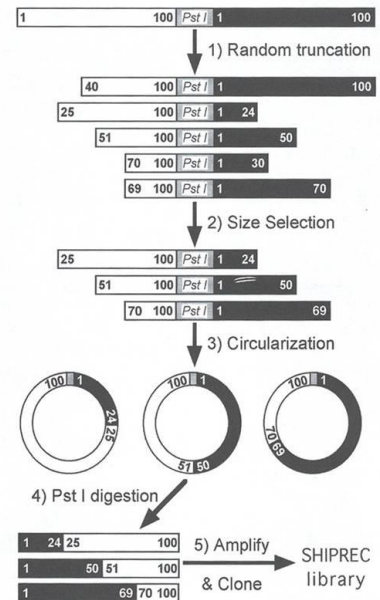


Figura 11

❖ SCRATCHY

E' una combinazione tra ITCHY e DNA shuffling per creare librerie di scambio tra geni con bassa omologia. La tecnica ITCHY introduce *cross over* tra geni non omologhi in entrambe le orientazioni e le librerie così ottenute sono combinate, frammentate con DNAsil e riassemblate mediante tecnica di DNA shuffling (figura 12).

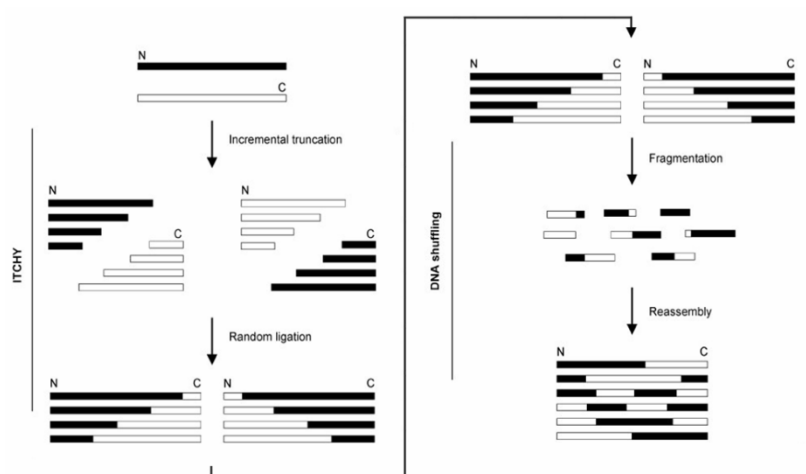


Figura 12

CAPITOLO 2

EVOLUZIONE DIRETTA DELLA LIPASI P.AERUGINOSA PER LA RISOLUZIONE DI ENANTIOMERI

Attraverso la metodologia di evoluzione diretta è stato possibile per *Reetz e coll* ideare un nuovo approccio per lo sviluppo di enzimi enantioselettivi, che risulti indipendente dagli aspetti strutturali e dai meccanismi enzimatici. L'idea di fondo è stata quella di combinare appropriati metodi di mutagenesi *random*, *gene expression*, e *screening* per la selezione di enzimi ad elevata enantioselettività.

Essi ipotizzarono, infatti, che l'esecuzione di queste tecniche in cicli ripetitivi, avrebbe creato una pressione evolutiva, in grado di indurre un miglioramento nell'enantioselettività di un dato enzima. Il concetto è stato illustrato, quindi, applicando le metodiche di evoluzione diretta alla lipasi di *P. Aeruginosa*. I primi risultati mostrarono, nella risoluzione cinetica dell'estere α chirale, catalizzata dalla lipasi, un aumento di enantioselettività espressa in termini di fattore di selettività da $E=1$ a $E=25$. Con l'affinarsi delle metodologie si è riusciti ad arrivare ad una risoluzione con un $E = 51$.

2.2 EVOLUZIONE DIRETTA IN VITRO

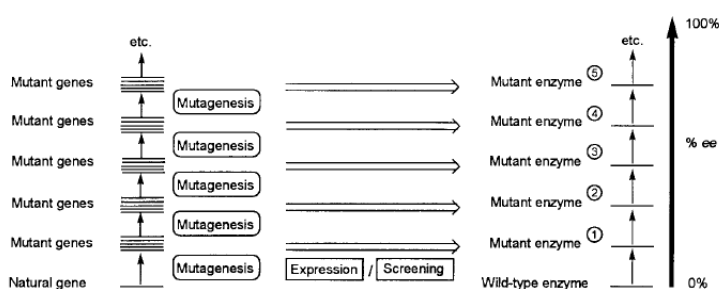
Come primo passo del processo globale (figura 13), il gene naturale che codifica per l'enzima specifico viene sottoposto a mutagenesi casuale, come ad esempio, *PCR errore-prone (epPCR)*, *DNA shuffling* etc.

La biblioteca dei geni mutanti è poi inserita

nel sistema di espressione batterico più adatto. Con l'aiuto di un sistema robotico le colonie batteriche sono, infine, trasferite nei pozzetti di piastre di microtitolazione, e dopo l'aggiunta dei nutrienti, le singole colonie batteriche vengono fatte crescere. Ognuna di esse è in grado di produrre l'enzima mutante nei rispettivi sopranatanti.

Attraverso l'ausilio della robotica e attraverso il sistema adeguato per la selezione, viene identificato il mutante a più alta enantioselettività. Il gene corrispondente mutante è sottoposto, quindi, ad un altro ciclo di mutagenesi casuale. Il processo viene ripetuto, tante volte quanto è necessario. Gli enzimi e i geni non adatti vengono scartati, e le informazioni genetiche dei geni

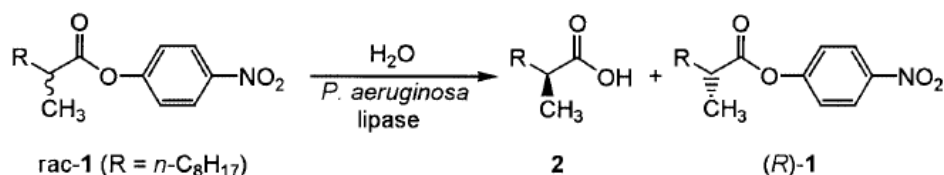
(Figura 13)



migliori che codificano per l'enzima più enantioselettivo, vengono trasferite alla nuova generazione. A seconda se si cerchi per varianti (R) - o (S)-selettive di un particolare enzima, la direzione (senso) di enantioselettività può, in linea di principio, essere stabilita dallo sperimentatore.

2.3 EVOLUZIONE DIRETTA DELLA LIPASI PER LA RISOLUZIONE ENANTIOSELETTIVA DEL p-NITROFENIL ESTERE DELL'ACIDO 2 METILECANOICO

Come precedentemente affermato, il sistema, studiato da *Reetz e col.*, riguarda la risoluzione idrolitica del rac 2-metil decanoato (*schema 1*)¹, da parte della lipasi di *P. Aeruginosa*, che in *wilde type* mostra una risoluzione con un valore di *ee* (eccesso di enantiomero) del solo 5% a favore della formazione dell'acido (S) al 50% di conversione, **E = 1.1**.



Schema 1

E rappresenta il rapporto di attività per i due enantiomeri. Esso è un fattore di selettività e una misura della enantioselettività in termini cinetici, definita dal rapporto delle costanti k_{cat}/K_m per i due competitivi enantiomeri. Il valore di **E** è spesso usato per descrivere l'efficienza della reazione enzimatica. Il valore può essere calcolato dall'eccesso enantiomerico del substrato (*ees*) e del prodotto (*eep*) secondo la seguente formula :

$$E = \frac{\ln\left(\frac{1 - ee_s}{1 + ee_s/ee_p}\right)}{\ln\left(\frac{1 + ee_s}{1 + ee_s/ee_p}\right)}$$

Le lipasi (triglicerol acil-idrolasi) sono classificate come idrolasi, e agiscono sopra i legami esteri presenti negli acilgliceroli, liberando acidi grassi e glicerolo, costituendo una classe speciale di esterasi. Tutte le lipasi sono caratterizzate da una struttura tipica di tutte le idrolasi: una struttura in α/β comune anche alle proteasi, esterasi e alle perossidasi. Le lipasi sono qualificate da una ampia versatilità delle strutture del loop in contatto con i substrati e esibiscono una versatilità nella

¹ Se non altrimenti specificato le foto e le fonti provengono : Manfred T. Reetz† “Application of directed evolution in the development of enantioselective enzymes” *Pure Appl. Chem.*, Vol. 72, No. 9, pp. 1615–1622, 2000

specificità di substrato. La tipica struttura di una lipasi prevede una zona centrale β -sheet con la serina del sito attivo localizzata in un loop chiamato gomito catalitico.

Il sito catalitico è formato per la triade catalitica Ser-His-Asp/Glu, che si ripete in tutte le strutture ed è sempre protetto da una molecola che funge da “tappo” idrofobico o “lid” che quando interagisce con l’interfaccia lipide/acqua subisce una modifica conformazionale, esponendo il sito attivo. Più recentemente, si è osservato che la presenza del “tappo” non è necessariamente correlazionata con l’attivazione interfacciale per le lipasi di *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica B*, che presentarono il “tappo” con una struttura particolare che non subisce attivazione interfacciale.

Nel caso specifico della lipasi di *pseudomonas aeruginosa* (figura 14) la struttura è costituita da un dominio centrale tipico della struttura α/β e da un coperchio (*lid*, costituito dai residui 109-163 figura 14 in giallo) formato da quattro corte α -eliche collegate alla struttura della lipasi da segmenti flessibili.

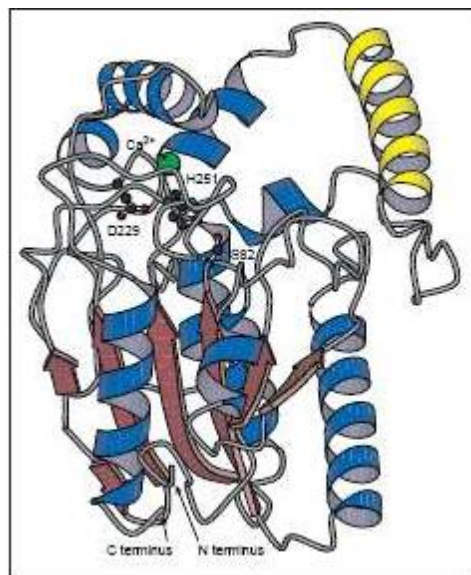


Figure 2

Figura 14

Il primo passo compiuto da Reetz, fu quello di considerare la frequenza di mutagenesi,. La lipasi di *Pseudomonas aeruginosa* dispone di 285 aminoacidi. La completa randomizzazione avrebbe comportato la produzione di 20.285 enzimi mutanti diversi. L'importo minimo di cambiamento strutturale, e cioè la sostituzione di un singolo aminoacido per molecola di enzima, porterebbe, invece, alla produzione di una libreria di mutanti che teoricamente dovrebbe avere 5.415 membri. Tuttavia, quando si utilizza *epPCR* come metodo di mutagenesi casuale, una libreria di 5.000-6.000 membri non dovrebbe contenere tutte le permutazioni teoricamente possibili essendo il codice genetico degenerare. Se, invece, venissero scambiati due aminoacidi per molecola enzimatica ($M = 2$), allora

il numero di enzimi mutanti aumenterebbe notevolmente (circa 14 milioni). Nel caso di $M = 3$, è più di 52 miliardi.

$$N = 19M \cdot 285! / [(285 - M)! \cdot M!] = 5415, \text{ dove } M = \text{numero di amino acidi sostituiti per molecola enzimatica}$$

Venne scelto, quindi, inizialmente di indurre un basso tasso di mutagenesi in modo da provocare una media di circa un solo scambio aminoacidico per molecola enzimatica. L'esperienza in questo campo aveva fino a quel momento dimostrato, infatti, che frequenze di mutagenesi relativamente basse costituivano una strategia di successo. A tal fine usarono il sistema di mutazione casuale *epPCR*. Il DNA codificante la lipasi venne isolato attraverso l'uso di enzimi di restrizione. Dopodichè il gene della lipasi *lip A* insieme al gene della proteina attivatore della lipasi *lip B* vennero inseriti nel vettore di espressione pUCPL6A. Il frammento clonato proveniente da pUCPL6 e contenente l'intera sequenza genica codificante la lipasi fu utilizzato come template per *epPCR*. Due primer furono sintetizzati per l'amplificazione del gene: il *primer Lip A* (5'-GCG-CAA-TTA-ACC-CTC-ACT-AAA-GGG-AAC-AAA-3') e *primer Lip B* (5'-GCG-TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GGC-GAA-3') complementari rispettivamente alle regioni a monte e a valle della sequenza codificatrice l'enzima. L'*error-prone PCR* fu eseguita in condizioni tali da indurre una frequenza di mutazione di 1-2 sostituzioni di base per 1000 pb. I prodotti della PCR vennero purificati e separati tramite elettroforesi su gel d'agarosio.

A seguito di espressione in *E. coli* / *P. aeruginosa*, fu impiegato, un sistema di screening, per l'identificazione dei prodotti, basato sull'assorbimento nell'UV / Vis a 410 nm del p-nitrofenolato liberato dalla reazione di risoluzione catalizzata dalla lipasi. Gli esperimenti, condotti, su una piastra di microtitolazione a 96 pozzetti vennero eseguiti in modo tale che gli esteri otticamente attivi (R) e (S) potessero agire in coppie separate, permettendo l'analisi di 48 enzimi mutanti diversi, in pochi minuti. In questo modo la quantificazione approssimativa, mediante lettura fotometrica, del prodotto delle due reazioni, come funzione di un particolare enzima mutante, sarebbe stata in grado di consentire l'identificazione del mutante più enantioselettivo.

In ogni *round* di mutagenesi, circa 2000 cloni vennero esaminati, e diverse varianti migliorate vennero costantemente rilevate. Tali mutanti vennero studiati finemente al fine di ottenere valori di *ee* esatti e dati precisi riguardanti il fattore di selettività *E*.

Come conseguenza del primo ciclo di mutagenesi e di *screening*, fu individuato un enzima mutante in grado di catalizzare la reazione con una percentuale di *ee* pari al 31% ed un $E = 2.1$. Il gene corrispondente mutante venne poi, sottoposto, ancora una volta, a mutagenesi *epPCR*, e l'intero processo fu ripetuto più volte. I risultati

dopo quattro generazioni di mutanti portarono ad un valore di *ee* pari all' 81% corrispondente a un fattore di selettività di $E = 11.3$ (Fig. 15).

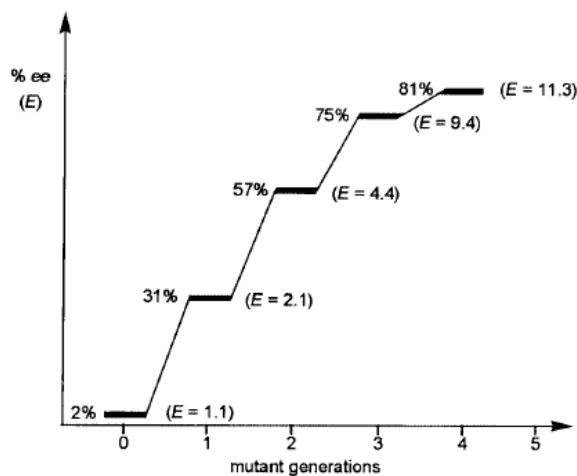


Figura 15 Increasing the enantioselectivity of the lipase-catalyzed hydrolysis of the model ester 1.

Anche se questi risultati erano in grado di dimostrare la validità del principio ideato da *Reetz e col.*, tuttavia, il fattore di selettività $E = 11.3$ non poteva essere considerato industrialmente valido. Così, un quinto *round* di mutagenesi venne effettuato, portando alla produzione di una libreria di mutanti che mostrava attività enantioselettive ulteriormente migliorate.

Nonostante questo progresso, divenne chiara la necessità di sviluppare metodi che permettessero di ricercare ancora più efficientemente la struttura proteica più adatta rispetto alla enantioselettività.

Di conseguenza, come primo passo, fu determinata la sequenza amminoacidica mutanti “migliori”.

I mutanti più efficaci prodotti nelle prime tre generazioni, vale a dire **P1B01-E4**, **P2B08-H3**, e **P3B13-D10** risultarono avere le seguenti sostituzioni di aminoacidi mostrate in figura 16.

Best mutant of the first generation ($E = 2.1$):

P1B01-E4: S149G (Ser₁₄₉→Gly₁₄₉)

Best mutant of the second generation ($E = 4.4$):

P2B08-H3: S149G (Ser₁₄₉→Gly₁₄₉), S155L (Ser₁₅₅→Leu₁₅₅)

Best mutant of the third generation ($E = 9.4$):

P3B13-D10: S149G(Ser₁₄₉→Gly₁₄₉), S155L (Ser₁₅₅→Leu₁₅₅), V47G (Val₄₇→Gly₄₇)

Figura 16

Dall'analisi amminoacidica delle proteine mutanti vennero tratte le seguenti conclusioni :

- 1) Il processo di mutagenesi *random* e *screeneng* permette l'identificazione negli enzimi di posizioni “sensibili”, *hot spot*, responsabili dell'enantioselettività.

- 2) La particolare sequenze amminoacidica anche se efficiente potrebbe non essere ottimale
- 3) Attraverso tecniche di mutazione sito specifica a saturazione nei siti di *hot spot* si potrebbero generare mutanti con enantioselettività migliore.

A questo punto, quindi, invece di continuare con ulteriori cicli di mutagenesi random, *Reetz e col* decisero di utilizzare appropriate combinazioni di varie tecniche di mutagenesi, iniziando con la mutazione a saturazione degli *hot spot*.

La *mutazione a saturazione* è il metodo molecolare biologico attraverso il quale, possono essere introdotte mutazioni, in determinate posizioni all'interno della sequenza proteica dell'enzima. È sufficiente una piccola libreria di 300 400 mutanti ad assicurare che tutti i rimanenti 19 amminoacidi vengano introdotti. Si scelse, quindi di applicare di questa strategia in uno dei punti caldi (ad esempio, alla posizione **155** del mutante **S155L** ottenuto nella seconda generazione).

A questo scopo, il gene codificante l'enzima mutante S155L, fu utilizzato come template nell'applicazione della PCR "*Megaprimer*". La prima reazione di PCR fu eseguita utilizzando due primer: un *primer* mutagenetico, nel quale fu sintetizzato un codone random ; e il *primer* Lip A . Il *primer* mutagenico insieme al *primer* in grado di appaiarsi con la regione di DNA più vicina alla mutazione, (*primer* LipA), vennero utilizzati per l'amplificazione del cosiddetto *megaprimer*. Dopo la separazione dal template tramite elettroforesi su gel di agarosio, il *megaprimer* venne purificato e utilizzato come *primer* nella seconda reazione di PCR. Quest'ultima reazione fu condotta utilizzando il *megaprimer* il *primer* LipA e un terzo *primer* Lip B. Si produssero in questo modo geni amplificati contenenti mutazioni diverse nel sito desiderato.

Si scoprì, attraverso questo metodo, che fenilalanina (F) è il "miglior" aminoacido ovvero, i mutanti che portano la fenilalanina in posizione 155, S155F possiedono i più alti gradi di enantioselettività.

La mutagenesi a saturazione, applicata ai geni migliori ottenuti nella terza generazione, confermò che l'enzima mutante con il fattore di selettività più alto e $E = 20$ era l'**S155F**.

Successivamente, questi geni mutanti vennero sottoposti ad un ulteriore ciclo di *epPCR*, portando un aumento di enantioselettività pari a $E = 25$.

La combinazione di metodi di mutagenesi, vale a dire *epPCR* e mutagenesi a saturazione, risultò un metodo efficace per la determinazione della sequenza proteica più corretta rispetto alla enantioselettività. Esperimenti simili, vennero condotti con successo utilizzando altri mutanti e altre posizioni. Così, una piccola famiglia di enzimi venne creata. Tutti mostrarono valori di $E = 20-25$ e valori di *ee* del 90-93% per la reazione enantioselectiva del 2-metil decanoato illustrata nello schema 1.

Reetz e col scoprirono, in seguito, che raddoppiando la frequenza di mutagenesi, in modo da provocare una media di due mutazioni per molecola enzimatica, si potevano ottenere risultati ancora

migliori. Nel primo ciclo di mutagenesi furono trovati due mutanti che mostravano un $E=3$ e $E=6.5$. Tuttavia la ripetizione del processo di *epPCR*, non produsse aumenti, in termini di enantioselettività, significativi.

Risultò, inoltre, possibile invertire il senso di enantioselettività della reazione modello. In soli due cicli di mutagenesi, è stato ottenuto un mutante R-selettivo con una $E = 4.4$ e una $ee = 68\%$. I risultati di questo studio sono riassunti in fig. 18.

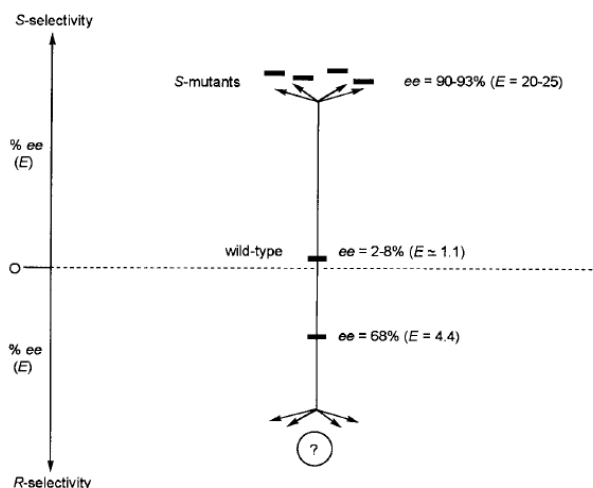


Figura 18 Optional (S)- or (R)-selectivity in the lipase-catalyzed reaction of ester 1.

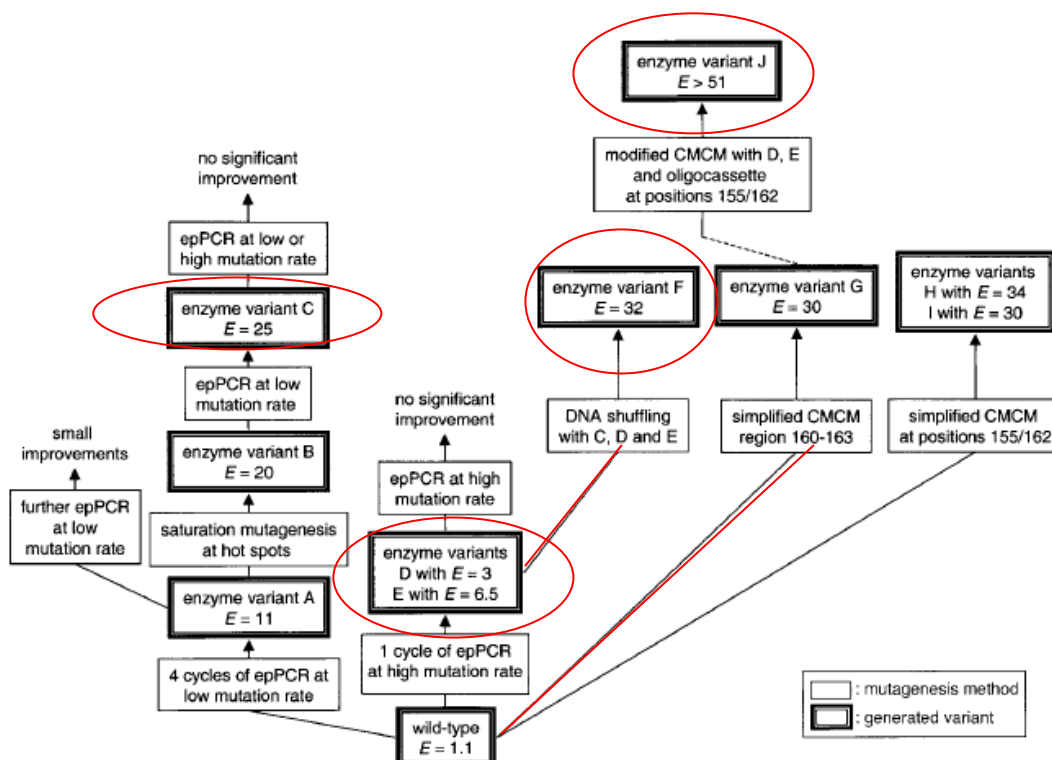
A questi primi approcci di evoluzione diretta dell'enzima lipasi di *P.Aeruginosa*, sono seguiti numerosi altre combinazioni di metodi di mutagenesi al fine di aumentare l'enantioselettività dell'enzima (fig 20 (schema1)). Si è visto, in particolare, che l'utilizzo di metodi mutagenici ricombinanti sono in grado di indurre modificazioni tali da ottenere una risoluzione enantioselettiva con un $E > 51$.

Poiché la variante enzimatica migliore **C** (figura 20 schema 1) fu sviluppata sulla base di sostituzioni di singoli amminoacidi nella sequenza proteica, si suppose che la tecnica del DNA *shuffling* avrebbe potuto indurre miglioramenti ulteriori alle proprietà funzionali dell'enzima.

Tuttavia, applicando la tecnica di ricombinazione di DNA *shuffling* al gene *wild-type* e al gene mutante che codifica la variante **C**, non si ottennero risultati soddisfacenti. I geni da ricombinare vennero frammentati con DNAsil e quindi riassemblati in una reazione di PCR senza *primer*.

Il passo successivo, quindi, al fine di incrementare la variabilità, è stato quello sottoporre il gene di *wildtype* a *epPCR* con un tasso di mutazione elevato, corrispondente a circa tre sostituzioni amminoacidiche per molecola enzimatica. Lo screening di circa 15 000 varianti diverse, portò all'individuazione di tre mutazioni responsabili di una maggiore S selettività rispetto al *wild-type*. Per esempio, la variante **D** con le mutazioni **S53P**, **C180T**, e **G272A** mostrava valori di $E=3$; la variante **E** con le mutazioni **D20N**, **S161P** e **T234S** mostrava valori di $E= 7$.

Si è proceduto, quindi, con l'applicazione della tecnica del *DNA shuffling* ai geni codificanti per C, D, N. Questo esperimento si è rivelato essere molto più di successo rispetto al *DNA shuffling* precedente. Si è riusciti a produrre in questo modo, un piccolo pool di varianti enzimatiche con buone caratteristiche enantioselettive. La migliore (variante **F**), presentava cinque mutazioni (**V47G, S149G, S155F, S199G e T234S**) e mostrava un valore di $E = 32$ (Schema 1, a destra).



Scheme 1. Schematic representation of the directed evolution of enantioselective enzymes (lipase variants) which catalyze the hydrolytic kinetic resolution of ester **1**.

Figura 20².

La strategia ottimale con aumento del fattore di selettività fino a $E > 51$ risultò essere la combinazione di *epPCR* ad elevata frequenza di mutazione, con una forma semplificata di mutagenesi combinatoriale a cassette multiple (CMCM).

La forma originale di CMCM come descritto da *Cramer e Stemmer*, è un particolare tipo di *DNA shuffling*, applicato nel settore degli anticorpi funzionali, e che permette la generazione di librerie di mutanti del gene, in cui il gene *wild-type* e oligocassette composte da sequenze nucleotidiche definite vengono randomizzati. Sulla base degli esperimenti precedenti si è potuto concludere che posizioni intorno all'amminocido numero 160 costituiscono una regione *hot spot*. Dal momento che

² Immagini e testo tratto da *Angew.Chem.Int. Ed* 2001,40,No19 Manfred T. Reetz et al "Directed Evolution of an Enantioselective enzyme Through combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis"

la mutagenesi a cassetta non può essere applicata a regioni eccessivamente grandi, si è presa in considerazione la regione dall'amminoacido 160 all'amminoacido 163. La mutagenesi è stata eseguita utilizzando solo il gene *wild-type* e una singola oligocassetta sintetizzata utilizzando una miscela con quantità equimolari nucleotidi (CMCM semplificata). Ciò ha assicurato la saturazione a tutte e quattro le posizioni. Dopo lo screening di una libreria di 5000 varianti, diversi enzimi enantioselettivi sono stati trovati, il migliore (variante **G** con $E=30$) è risultato essere caratterizzato dalle mutazioni **E160A**, **S161D**, **L162G**, e **N163F** (Schema 1, a destra). Poiché dall'analisi del mutante **F** si era visto che l'introduzione della glicina produceva effetti benefici, si è concentrata l'attenzione sulla mutazione **L162G**. Inoltre, avendo precedentemente individuato, nella posizione 155 un altro punto a caldo, è stata inserita, tramite la tecnica semplificata della mutagenesi CMCM, una oligocassetta (dimensioni: 69 bp) con saturazione doppia nelle posizioni 155 e 162 nel gene *wild-type*. L'espressione e lo *screening*, portarono all'identificazione di due varianti: il variante **H** (**S155S**, **L162G**) e **I** (**S155V**, **L162G**), che mostrarono valori di $E=34$ e $E=30$, rispettivamente (Schema 1, a destra). In entrambi i casi è stato visto che la mutazione L162G rimane conservata, a conferma delle precedenti ipotesi che ne indicavano il ruolo positivo nell'enantioselettività.

Un ulteriore studio è stato condotto al fine di massimizzare la possibilità di resa enantioselettiva. Si è deciso di sviluppare una strategia basata su un'estensione del principio della CMCM. Ciò è stato realizzato mediante il DNA *shuffling* dei geni che codificano le forme mutanti **D** e **E** e delle oligocassette contenenti simultaneamente le saturazioni in posizione 155 e 162 (figura 21)

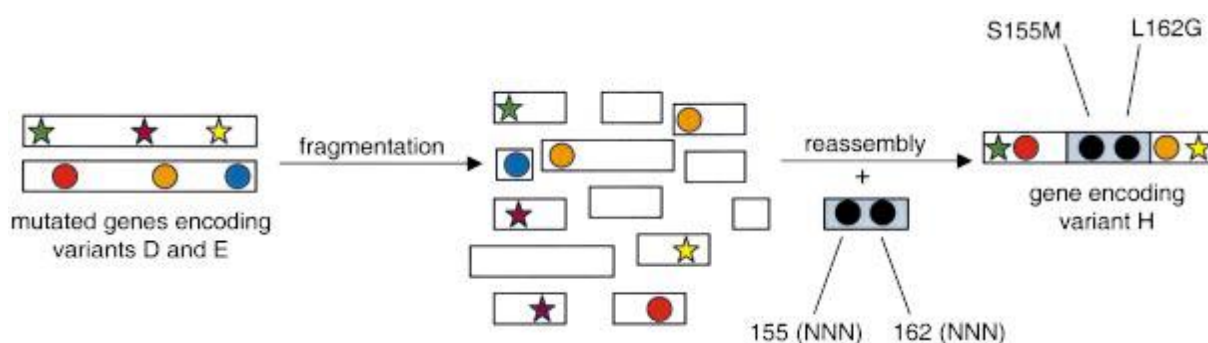


Figura 21²: Extended CMCM in the evolution of an S-selective lipase variant J; (green star: position 20; purple star: position 161; yellow star: position 234; red circle: position 53; orange circle: position 180; blue circle: position 272).

Ciò ha garantito la possibilità di ricombinazione massima. In effetti, questo approccio si è rivelato di successo perché diversi enzimi altamente enantioselettivi sono stati trovati, tra cui la variante **J** con 6 mutazioni aminoacidiche con un $E>51$. Il valore di $E>51$ (ee del 95% al 24% di conversione) sta a significare che la enantioselettività è stato quasi raddoppiata (Schema 1, in alto a destra).

La variante **J**, è caratterizzata da sei mutazioni, chiamate **D20N**, **S53P**, **S155M**, **L162G**, **T180** e **T234S**. Sfortunatamente non è stato possibile ottenere la struttura cristallina mediante analisi ai raggi X di questo mutante. E' stato possibile comunque utilizzare la struttura cristallina della lipasi *wilde type* per localizzare la posizione spaziale delle sei mutazioni (Figura 19³)

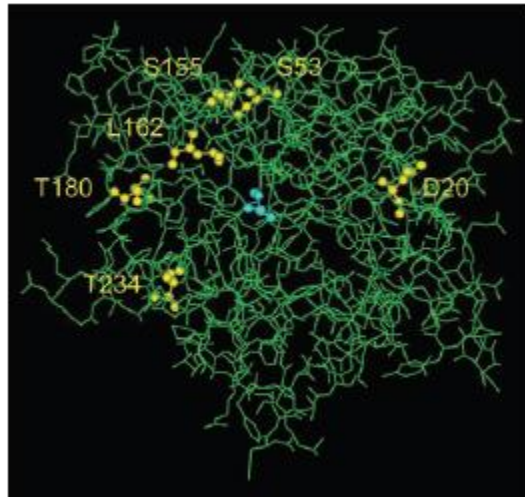


Figura 19³ : Lipasi di *P. Aeruginosa* 1X-ray structure of the WT lipase from *P. aeruginosa* (green) showing the active-site serine at position 82 (blue) and the six amino acids that were substituted for the generation of mutant X, namely D20, S53, S155, L162, T180, and T234

3 Immagine tratta da : ChemBioChem 2007,8,106-112.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dagli studi di *Reetz e col* hanno dimostrato chiaramente come la combinazione di una mutagenesi random e una mirata strategia ricombinativa permettano di raggiungere dei risultati ragguardevoli. In particolare è stato appurato che la selezione della sequenza proteica migliore ai fini di un aumento di enantioselettività consta di tre fasi :

- 1) Produzione di una generazione di mutanti mediante *epPCR* ad elevata frequenza di ricombinazione
- 2) Identificazione degli *hot spot* , applicazione della *epPCR* nelle zone calde e conseguente applicazione della forma semplificata della mutagenesi combinatoriale a cassette CMCM.
- 3) Estensione del processo di CMCM .

Sebbene la PAL sia stata evoluta attraverso l'idrolisi del p-nitrofenil estere dall'acido 2-metildecanoico, l'enzima mostra simile enantioselettività in reazioni con etil esteri. Questo risultato indica che p-nitrofenil esteri la cui idrolisi può essere facilmente valutata da misure spettrofotometriche possono essere utilizzati per evolvere enzimi che idrolizzano con enantioselettività i corrispondenti acidi carbossilici chirali alchil esteri.

BIBLIOGRAFIA

Liebeton, Reetz , Jaeger et al... Chem Biol. 2000 Sep;7(9):709-18.

Molinari, Ruzzi biotecnologie microbiche, cap 9 .

Reetz Manfred Pure Appl.Chem,vol 72,No 9,1615-1622,2000.

Reetz Manfred et al Angew.Chem.Int vol 40,No 19, 3589-3591,2001.