

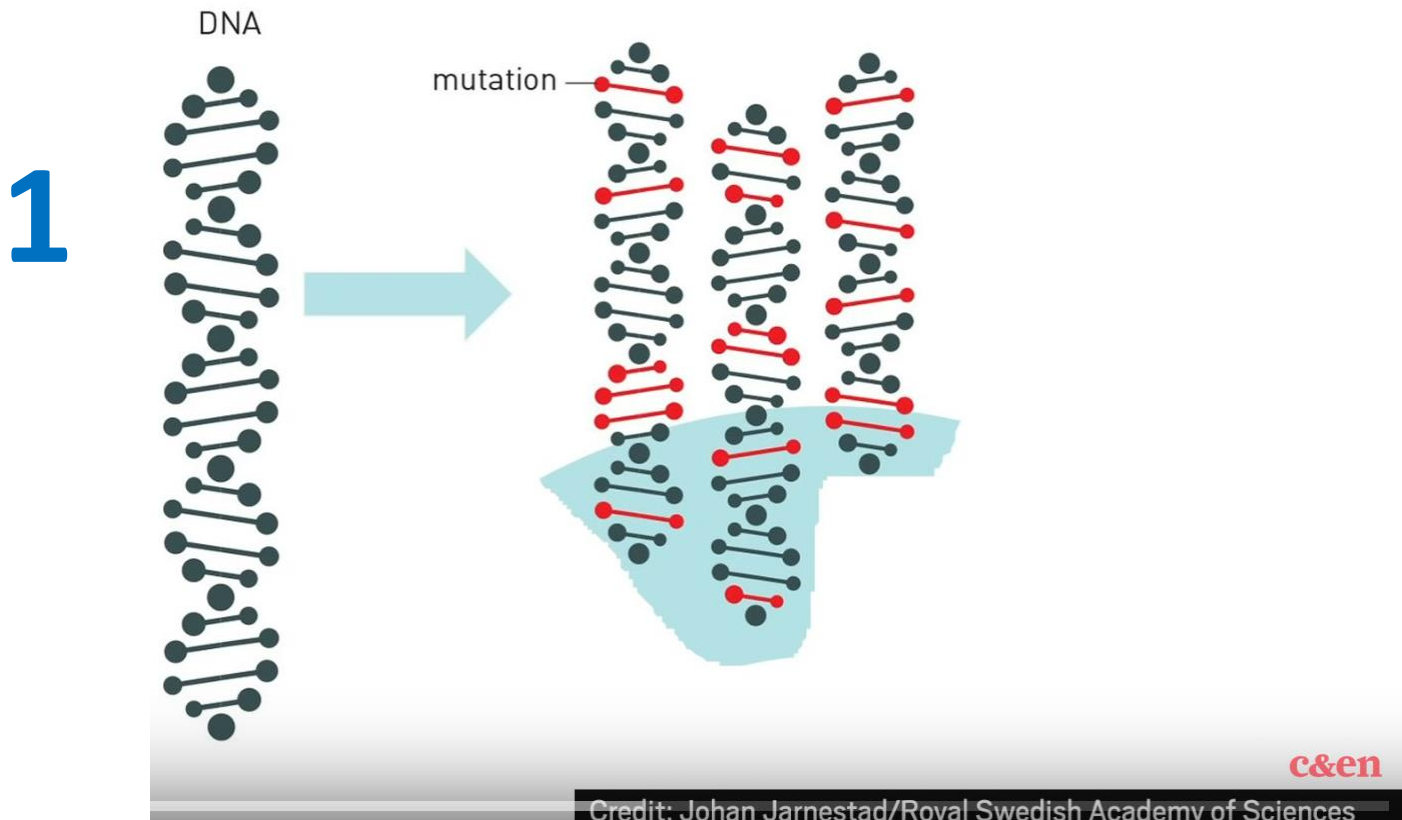
DIRECTED EVOLUTION

L'evoluzione diretta è una tecnica che in pratica permette di dirigere l'evoluzione di un'enzima verso una forma in grado di fare catalisi non-naturale e ottenere prodotti utili. La tecnica, che è valsa il 50% del Premio Nobel in Chimica nel 2018 a Frances Arnold, in pratica consiste in 4 fasi.

1. MUTAZIONE
2. ESPRESSIONE della proteina
3. SELEZIONE o SCREENING
4. Re-iterazione del processo

MUTAZIONE

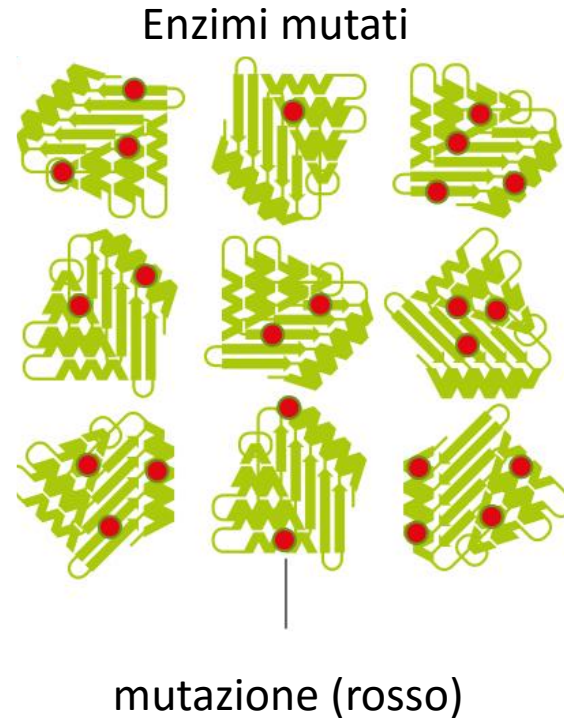
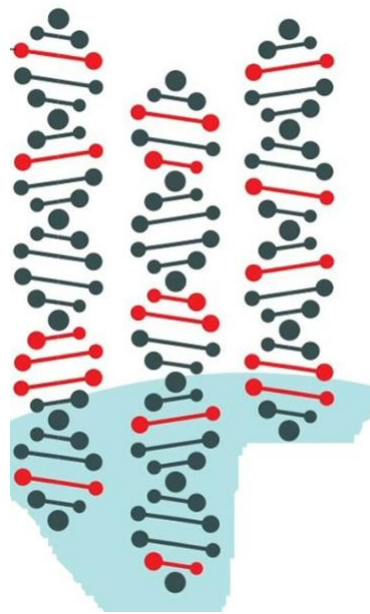
Un gene che codifica per un enzima viene MUTATO (in rosso nella figura), cioè la sequenza di basi (es. AAA...) viene cambiata in punti specifici (es. **GAA**...). Poiché ogni amminoacido dell'enzima è codificato da una sequenza di 3 nucleotidi (codone) nell'mRNA, che si ottiene copiando le informazioni dal DNA, mutando quest'ultimo varia anche la sequenza amminoacidica dell'enzima. Ad es. AAA = lisina; GAA = acido glutammico.



PRODUZIONE dell'ENZIMA

Il nuovo codice genetico, inserito all'interno di batteri (*Escherichia coli*), viene trascritto in mRNA e quindi tradotto in una proteina, che in questo caso è un ENZIMA. La proteina ricombinante viene quindi ESPRESSA (cioè prodotta) dai batteri.

2



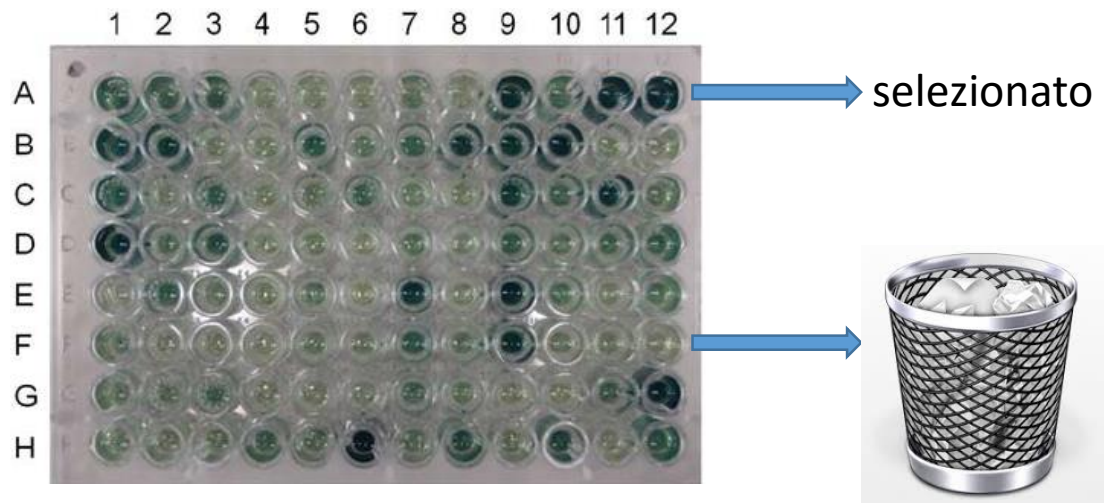
SELEZIONE o SCREENING

La proteina/enzima viene selezionata in vari modi, tipicamente usando piastre multi-pozzetto (quelle viste in COMBICHEM) in cui si possono analizzare simultaneamente molte condizioni sperimentali diverse (una per *pozzetto*). Lo screening si chiama HIGH-THROUGHPUT SCREENING (HTS).

Si può fare in vari modi, ad es. se si vuole selezionare una proteina che lega un certo TARGET, si usano pozzetti con il fondo RIVESTITO (coated) con un polimero che espone il target, per cui in seguito a lavaggi, solo le proteine che legano meglio il target restano nella piastra, mentre le altre sono lavate via.

Oppure l'enzima può essere testato per CATALISI della reazione desiderata che porta allo sviluppo di un colore la cui intensità è proporzionale alla quantità di prodotto ottenuta.

3



REITERAZIONE

Gli enzimi migliori selezionati nella fase **3** vengono quindi risottoposti al ciclo «evolutivo» in modo da migliorare l'attività sempre di più, quindi i passaggi 1-3 vengono ripetuti in sequenza.

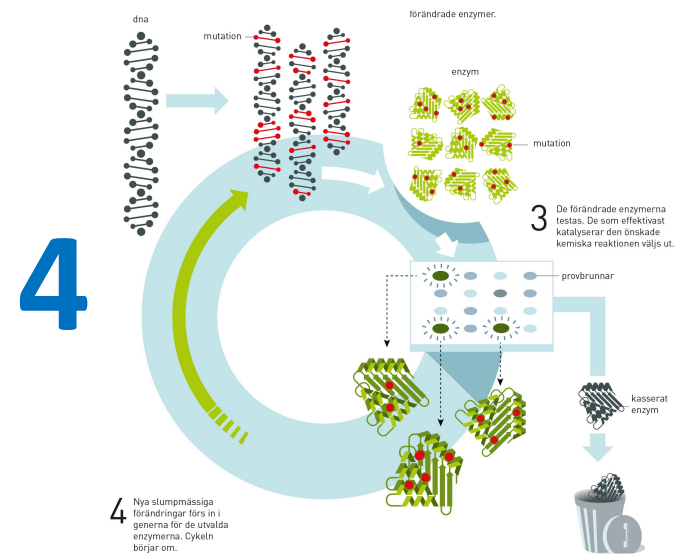
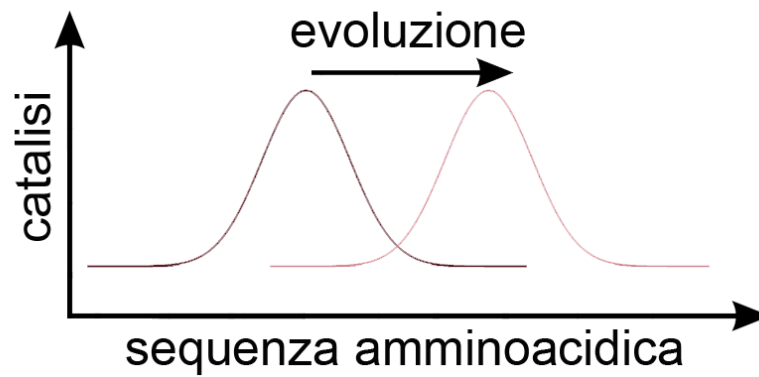
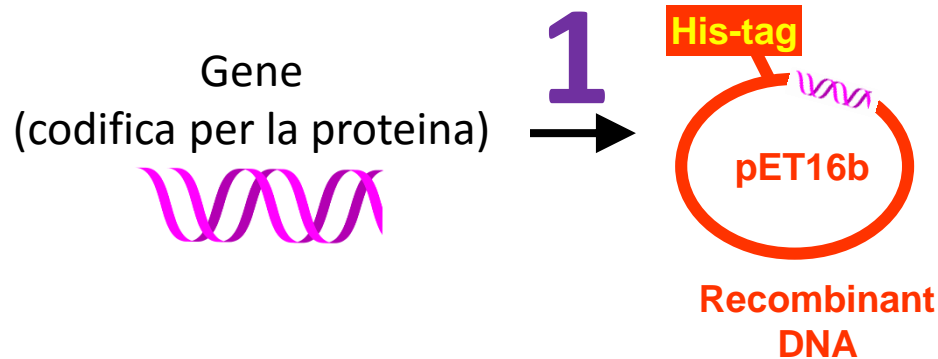


Immagine da www.nobelprize.org



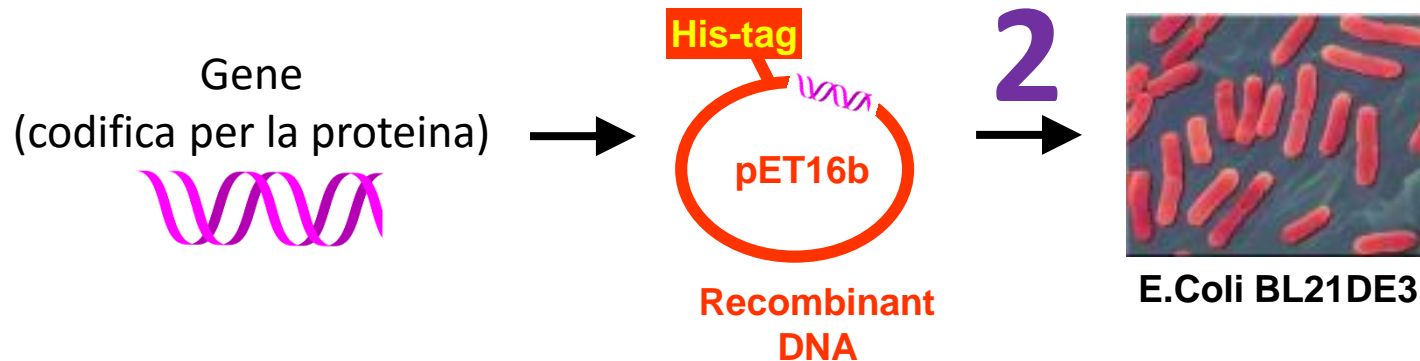
Un aspetto importante per ottenere buoni risultati è partire da ENZIMI PROMISCUI, idealmente provenienti da organismi poco complessi, come i batteri, che già possiedono un minimo dell'attività catalitica desiderata.

Produzione (espressione) di proteine ricombinanti



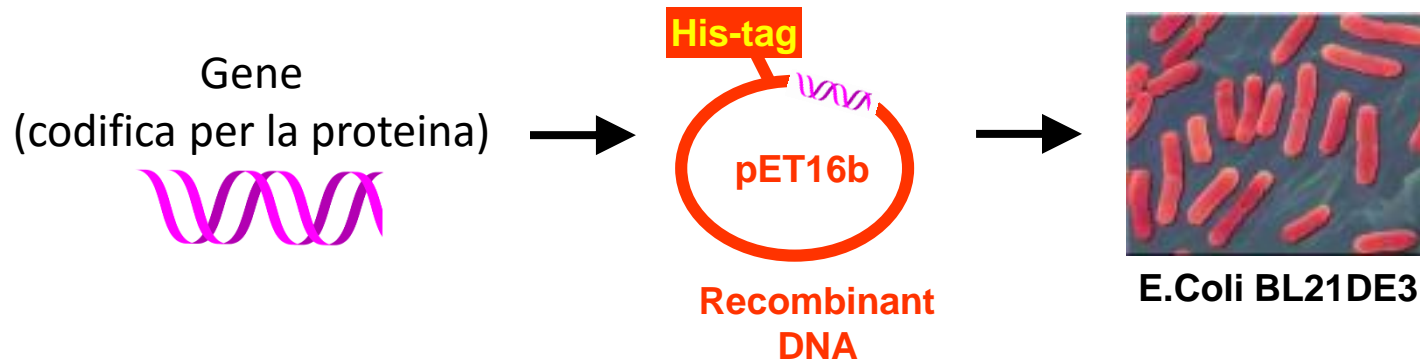
Tramite tecniche di ricombinazione del DNA e PCR*
Si inserisce il gene desiderato in un PLASMIDE (DNA circolare)

Produzione (espressione) di proteine ricombinanti



Si inserisce il DNA ricombinante (DNAr) all'interno di batteri *competenti* che produrranno la proteina. Il processo si chiama TRASFORMAZIONE. Si può fare in vari modi, uno dei più comuni consiste nell'indebolire le membrane cellulari del batterio (a freddo con CaCl_2) per renderle permeabili al DNAr.

Produzione (espressione) di proteine ricombinanti

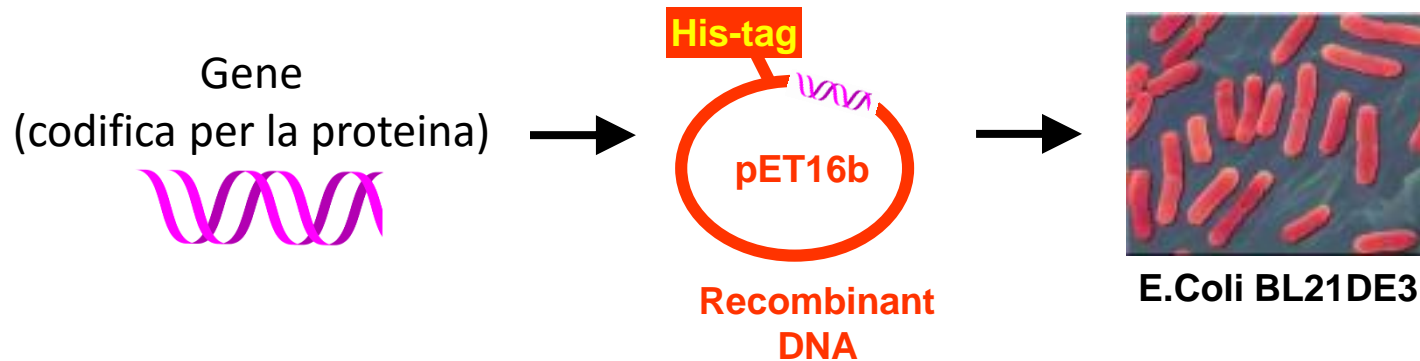


Si crescono i batteri in BRODO di coltura con un FATTORE DI SELEZIONE in modo che solo i batteri con il DNAr si duplicano. Il fattore di selezione è tipicamente un ANTIBIOTICO: il DNAr conferisce anche la resistenza all'antibiotico.

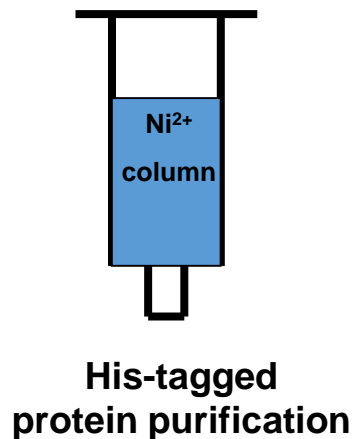
3



Produzione (espressione) di proteine ricombinanti



Si rompono le cellule dei batteri e si purifica la proteina ricombinante, ad es. tramite cromatografia di AFFINITA'

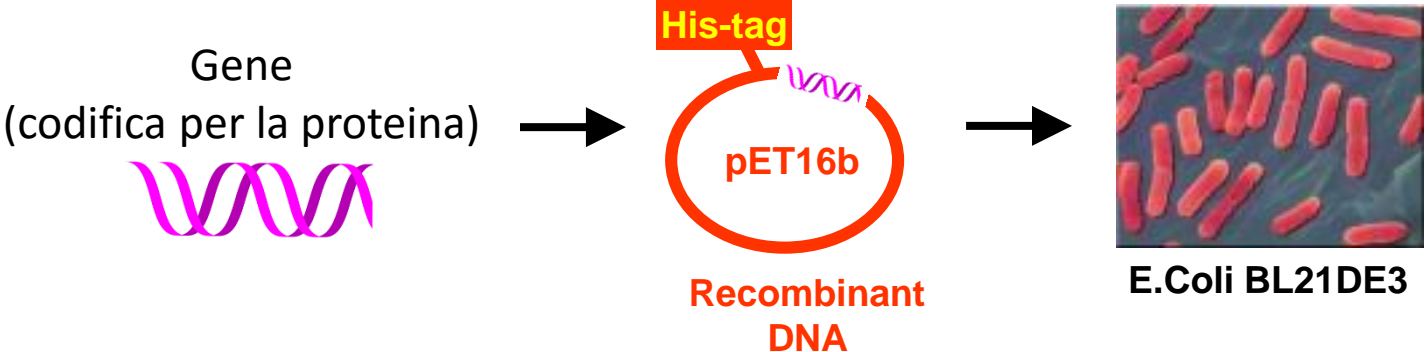


4



shutterstock.com · 543723892

Produzione (espressione) di proteine ricombinanti



Si analizzano le frazioni della cromatografia, ad es, tramite elettroforesi (SDS-PAGE) che separa per DIMENSIONI (PM) e Western Blot (che usa un anticorpo che riconosce la proteina di interesse)

