

PREMIO NOBEL PER LA CHIMICA 2018

assegnato a

George P. Smith and Gregory P. Winter:

«for the phage display of peptides and antibodies»

e

Frances H. Arnold:

«for the directed evolution of enzymes»

Di Sergio Riva*



* Direttore dell'Istituto di
"Chimica del Riconoscimento Molecolare" -
ICRM - del C.N.R.



Il potere dell'evoluzione. E' questo il tema che unifica le ricerche insignite con il premio Nobel per la Chimica del 2018.

Come spesso in passato, anche questo anno non è stata premiata una singola persona. Il Nobel è stato suddiviso e assegnato a tre eminenti scienziati le cui ricerche hanno preso ispirazione dai processi evolutivi presenti in Natura. Hanno «copiato» i principi che la Natura utilizza per l'evoluzione dei viventi – cambiamenti genetici e selezione – per ottenere in laboratorio nuove proteine con le caratteristiche

richieste per applicazioni utili per l'umanità.

Nello specifico, il premio è stato assegnato a due linee di ricerca. Metà del premio (e del prestigio a esso simbolicamente collegato e universalmente riconosciuto) è andato a George P. Smith (Università del Missouri, Columbia, USA) e a Gregory P. Winter (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK).

La Reale Accademia delle Scienze Svedese li ha premiati *for the phage display of peptides and antibodies*, un metodo che utilizza batteriofagi (virus che infettano batteri) per ottenere nuovi peptidi e nuove proteine.

È stato sviluppato da Smith a metà degli anni Ottanta del secolo scorso e utilizzato da Winter per ottenere anticorpi «evoluti» in grado di combattere malattie autoimmuni e alcuni tipi di tumore metastatico. Il primo farmaco basato su anticorpi identificati mediante questo approccio, chiamato *adalimumab*, è stato approvato più di quindici anni fa per il trattamento di artrite reumatoide e artrite psoriasica.

L'altra metà del premio Nobel 2018 è stata assegnata a Frances H. Arnold *for the directed evolution of enzymes*.

Frances, quinta donna nella centenaria storia del Nobel a ricevere il premio per la Chimica, è titolare della prestigiosa cattedra intitolata a Linus Pauling del California Institute of Technology di Pasadena (USA) dove insegna Ingegneria Chimica, Bioingegneria e Biochimica.¹ È anche cofondatrice di due



Frances H. Arnold, George P. Smith, Sir Gregory P. Winter (foto Niklas Elmehed, Nobel Media)

start-up, Gevo e Provivi, dirette emanazioni dei risultati ottenuti dalle sue ricerche. Per comprendere quale è stato ed è l'eccezionalità del suo contributo scientifico è necessaria una breve introduzione.

Ogni studente di scuola superiore sa che gli enzimi sono un gruppo numeroso di proteine presenti in tutti i viventi, dai più semplici organismi unicellulari all'uomo. La loro funzione biologica è quella di rendere possibili le reazioni chimiche indispensabili per la vita, accelerando la velocità di trasformazione dei corrispondenti substrati. Sono i catalizzatori naturali, prodotti e utilizzati dai viventi.

Tuttavia, prima ancora di comprendere la loro natura proteica, si è scoperto che potevano lavorare «a prescindere» dagli organismi e dalle cellule che li producono e si è cominciato a utilizzarli anche nei processi industriali. Non ce ne rendiamo conto, ma gli enzimi sono ampiamente utilizzati in moltissime applicazioni, dalla detergenza alle varie lavorazioni dell'industria tessile, dalla concia delle pelli alla mangimistica, a numerosi processi della filiera agroalimentare (enologia, panificazione, lattiero-caseario...).

Con l'incremento delle conoscenze scientifiche, questi biocatalizzatori, per la loro alta selettività ed efficienza, hanno smesso di essere solo oggetto di studio dei biochimici e hanno cominciato a attirare l'interesse dei chimici sintetici e degli ingegneri chimici di processo. E così, a cavallo tra gli anni Settanta e Ottanta del secolo scorso, si è cominciato a parlare di «biocatalisi», cioè dell'uso degli enzimi – isolati o tratti all'interno delle cellule che li avevano prodotti – in sintesi organica, principalmente per la trasformazione di substrati non naturali.

E quando una ventina di anni più tardi si è cominciato a ragionare in termini di «chimica sostenibile» e sono stati proposti i principi da seguire per avere un processo di «chimica verde» (12 *principles of green chemistry*),² è stato da subito evidente il ruolo significativo che poteva e può svolgere la biocatalisi.

Non stupisce quindi che uno dei tre pilastri su cui si «appoggia» la Piattaforma Tecnologica Europea di *Sustainable Chemistry* è la *Industrial Biotechnology*, una sigla che raccoglie tutti gli approcci sintetici di tipo «bio».

Nel tempo si è imparato a immobilizzare gli enzimi per aumentarne la stabilità e permettere il riutilizzo in cicli successivi, si è scoperto che potevano catalizzare le reazioni anche in presenza di cosolventi organici e perfino in assenza di una fase acquosa, semplicemente sospesi in un solvente organico come un qualunque catalizzatore eterogeneo.³

A questo si è aggiunta la sempre più evidente capacità di questi biocatalizzatori di trasformare in modo stereoselettivo molecole con strutture completamente diverse dai substrati per cui la Natura li aveva sviluppati, e di catalizzare reazioni differenti (una proprietà oggi chiamata *enzyme promiscuity*).

Per passare da risultati che restavano nell'alveo delle curiosità accademiche all'utilizzo sintetico su scala preparativa restavano aperte due problematiche: la disponibilità degli enzimi e la ottimizzazione delle loro prestazioni nei confronti dei substrati di interesse, in condizioni di reazione compatibili con i processi industriali.

Lo sviluppo della biologia molecolare ha permesso di risolvere il primo problema. Non è più necessario isolare, con fatica e tempi lunghi, gli enzimi di interesse dalle loro fonti naturali ma è possibile produrli nell'ospite desiderato (*E. coli*, *Aspergillus sp.*, *Pichia pastoris*, ...) clonando i geni che li esprimono, inserendoli in un plasmide e attivando gli opportuni sistemi di sovraespressione. Più recentemente lo sviluppo delle tecniche di sequenziamento del patrimonio genetico e di bioinformatica hanno permesso di svincolarsi anche dalla conoscenza dell'organismo produttore (approccio metagenomico).⁴

Più complesso si è rivelato trovare un approccio adeguato alla soluzione del secondo problema: come migliorare le prestazioni di un enzima, in termini di attività, stabilità e selettività, nei confronti di un substrato di interesse.

Inizialmente si è cercato di ottenere dei risultati con approcci di tipo empirico, cambiando le condizioni di reazione (temperatura, pH della soluzione, aggiunta di cosolventi miscibili con acqua) o l'ambiente di reazione, passando dall'acqua ai diversi solventi organici (il cosiddetto *medium engineering*).⁵

Parallelamente, aumentando le conoscenze sulla struttura e sul meccanismo catalitico degli enzimi, si è cercato di affrontare il problema in modo più razionale, sfruttando la tecnica della mutagenesi sito-diretta per cambiare la natura degli aminoacidi in posizioni definite della loro sequenza aminoacidica, sostituzioni preventivamente identificate sulla base di opportuni ragionamenti.

Per esempio, in una *review* del 1990 la Arnold riassumeva i risultati ottenuti da vari gruppi nel tentativo di ottenere enzimi in grado di fornire prestazioni migliori in solventi non acquosi, in particolare in termini di stabilità.⁶

Descriveva i significativi risultati ottenuti con una proteasi, la subtilisina BPN', a cui la mutazione di soli due aminoacidi (Asp248 in Asn e Asn218 in Ser) conferiva un aumento significativo di stabilità alla temperatura o alla presenza di 40 % v/v di un cosolvente, la dimetilformamide, rispetto al *wild type*.

Nonostante l'ottimismo mostrato nelle conclusioni (... *As the stabilization mechanisms discussed in this article are verified and estende through the study of mutant enzymes, a rational basis for designing enzymes with improve stability in non-aqueous solvents should emerge.*),⁶ questo approccio si è rivelato poco produttivo, poiché spesso le ipotesi utilizzate per pianificare le mutazioni venivano smentite sperimentalmente, solo però al termine di molti mesi di lavoro.

Nel pieno di questa *impasse* la Arnold ha avuto una geniale intuizione. Gli enzimi attuali sono il frutto di un processo di ottimizzazione evolutivo ottenuto mediante mutazioni casuali e successiva selezione del più adatto a sopravvivere. E nuove sfide per la vita (per esempio la necessità di non soccombere per la presenza di antibiotici o di pesticidi) spingono i microrganismi a produrre nuovi enzimi prima non esistenti.

La Arnold si è chiesta se questo processo non potesse essere riprodotto in laboratorio, ottenendo in poco tempo ciò che in Natura richiede anche migliaia o milioni di anni. Per rispondere a questa domanda ha inventato un approccio che ha chiamato *directed devolution*.

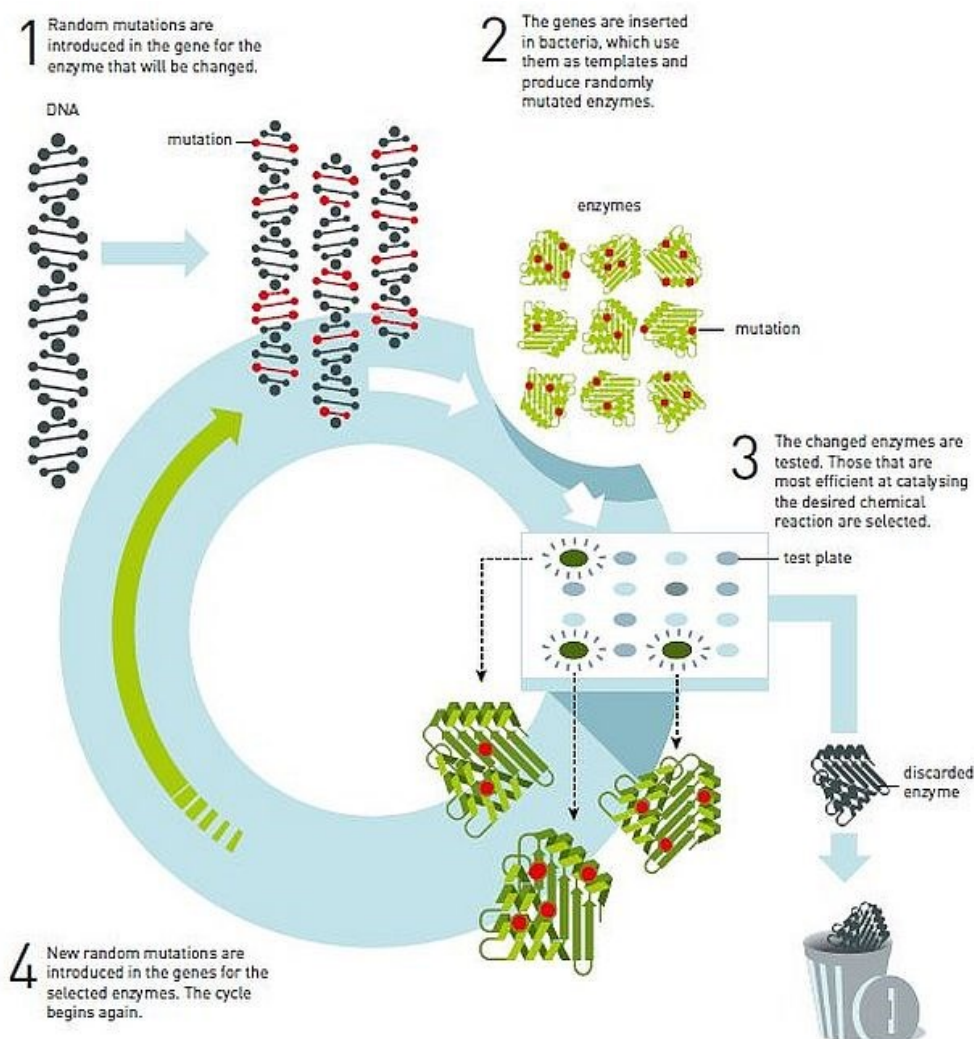
La sua geniale proposta si è basata su un principio molto semplice. In Natura la clonazione di un gene codificante un determinato enzima avviene attraverso la catalisi dell'enzima DNA polimerasi. In condizioni normali il processo di duplicazione deve concludersi senza errori, in modo da preservare l'informazione genetica che codifica una specifica sequenza aminoacidica che, a sua volta, determina la struttura e le proprietà catalitiche di un enzima.

Esistono però DNA polimerasi poco efficienti, intrinsecamente predisposte a commettere errori nella fase di replicazione del DNA, una imperfezione che può essere anche rafforzata giocando sui protocolli sperimentali (per esempio usando rapporti sbilanciati dei quattro nucleotidi).

Una sostituzione anche di una singola base nella sequenza genica può generare la sostituzione di un aminoacido, in termini assolutamente casuali sia di struttura sia di posizione nella sequenza primaria della proteina. In questo modo, duplicando il gene in modo imperfetto durante il processo di PCR *in vitro* (Polimerasi Chain Reaction),



Frances H. Arnold in laboratorio (foto Caltech)



Ciclo *Directed Evolution* degli enzimi
(foto Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences)

si ottengono facilmente e rapidamente centinaia, migliaia, perfino decine di migliaia di cloni che codificano enzimi mutati. Enzimi che devono poi essere analizzati per evidenziare, se sono stati generati, quelli in grado di dare prestazioni migliori relativamente al risultato che si vuole ottenere. *You get what you screen for* (Trovi quello che hai cercato) è la prima regola della *Directed Evolution* secondo Arnold.

Successivamente i cloni che codificano gli enzimi migliori possono essere sottoposti a un nuovo ciclo di mutazioni in una sequenza iterativa di ottimizzazione.

Utilizzando questo approccio, nel 1993 Arnold ha ottenuto in poco tempo una variante di subtilisina (una proteasi) contenente tre mutazioni e ben attiva in presenza del 60 % v/v di dimefilformammide,⁷ una prestazione superiore a quanto ottenuto con gli approcci puramente razionali prima citati.⁶

Negli anni successivi questa metodologia è stata validata in numerosi laboratori internazionali e le procedure di screening sono state migliorate in termini di affidabilità e velocità. Sono stati proposti e sviluppati protocolli che permettono di circoscrivere le parti di un enzima da sottoporre ai processi di random mutagenesi (per esempio se l'obiettivo è quello di modificare la selettività in genere ci si può limitare al gruppo di aminoacidi che costituiscono il sito attivo dell'enzima e che sono prossimi a esso).

E aggiungendo un po' di «razionalità» all'intero processo, è stata proposta, tra le altre tecniche, quella denominata *saturation mutagenesis*,⁸ che abbina cicli di mutagenesi casuale a esperimenti di mutagenesi sito specifica.

In breve si tratta di questo. Come detto, la random mutagenesi permette di evidenziare posizioni importanti (*hot spot*) della proteina, dove la sostituzione dell'aminoacido presente provoca un miglioramento delle prestazioni in senso desiderato. Per esempio si potrebbe trovare che in un determinato enzima la sostituzione di una serina in posizione 103 con una valina ne aumenta la enantioselettività nei confronti di un dato substrato.

Tuttavia, come detto, il processo è assolutamente casuale. La posizione 103 è sicuramente importante, ma non è detto che la sostituzione dell'aminoacido 103 con una valina sia la soluzione migliore. Anzi, quasi sicuramente non lo è, anche perché la sostituzione casuale di una singola base della tripletta che codifica per la serina 103 non può portare alla codifica di tutti gli altri 19 aminoacidi presenti nelle proteine.

Questo risultato si può invece facilmente ottenere generando per mutagenesi sito diretta alla posizione 103 i cloni che codificano per i rimanenti 18 aminoacidi, potendo così valutare sperimentalmente quale sia la soluzione migliore.

Questi protocolli sono stati validati anche in numerosi processi industriali. Un esempio classico è quello che ha portato le ditte Merck e Codexis a vincere nel 2010 il prestigioso premio che annualmente il Presidente degli Stati Uniti assegna ai migliori processi di Green Chemistry.

Attraverso una sequenza di 11 cicli di mutagenesi i ricercatori industriali sono riusciti, partendo da una transaminasi wild type che non era quasi in grado di effettuare la reazione di interesse (una aminazione stereoselettiva), a ottenere un enzima mutato (con 27 mutazioni) in grado di trasformare soluzioni iperconcentrate (20% peso su volume) del substrato, in presenza di quantità significative di cosolvente, nel prodotto desiderato in forma enantiopura. Il processo biocatalizzato è risultato così efficiente da sostituire il precedente approccio sintetico «classico», basato su una idrogenazione stereoselettiva catalizzata da derivati di rodio.⁹

Un premio Nobel assolutamente meritato quindi, assegnato a una ricercatrice non ancora stanca di affrontare nuove sfide (... *And take risks. I think it is important for people not to follow a recipe. There is no recipe for success...*). La duplice nuova frontiera che sta esplorando è quella di ottenere enzimi sempre più efficienti per degradare e valorizzare le biomasse di scarto (oggetto delle cosiddette «bioraffinerie» in un'ottica di economia circolare ecosostenibile) e, in una prospettiva ancora più ambiziosa, quella di ottenere enzimi che non hanno equivalenti in Natura, in grado di catalizzare reazioni puramente artificiali. E i risultati non si stanno facendo attendere.¹⁰

Sergio Riva

(Direttore dell'Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare - ICRM - del C.N.R.)

Indicazioni Bibliografiche

1. <http://fhalab.caltech.edu>
2. P. Anastas, J.C. Warner, *Green Chemistry: Theory and practise*, Oxford University Press (2008).
3. a) *Enzymatic reactions in organic media*, A.M.P. Koskinen and A.M. Klivanov Editors, Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, Great Britain, 1996. b) *Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media*, G. Carrea and S. Riva Editors, Wiley-VCH Verlag & GmbH & Co., Germany, 2008.
4. U.T. Bornscheuer, U.T. et al., *Engineering the third wave of biocatalysis*, *Nature* 485: 185-194. (2012).
5. G. Carrea, G. Ottolina, S. Riva, *Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media*, *Trends Biotechnol.*, 13: 63-70 (1995).
6. F.H. Arnold, *Engineering enzymes for non-aqueous solvents*, *Trends Biotechnol.*, 8: 244-247, (1990).
7. K. Chen, F.H. Arnold, *Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: Sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5618-5622, (1993).
8. M.T. Reetz, D. Kahakeaw, R. Lohmer, *Addressing the numbers problem in directed evolution*, *ChemBioChem*, 9: 1797-2004 (2008).
9. C. K. Savile et Al., *Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to Sitagliptin manufacture*, *Science*, 329: 305-309 (2010).
10. F.H. Arnold, *Directed evolution: Bringing new chemistry to life*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 57: 4143-4148 (2018).