

Sostenibilità e salvaguardia dell'ambiente

Si parla di sostenibilità e il salvaguardia dell'ambiente sulla lavorazione degli enzimi e ingegnerizzandoli in modo adeguato. Si possono fare alcuni passaggi che sostituiscono l'approccio chimico perchè difficilmente un enzima o organismo sopravvivono in ambienti solventi acidi o basi estremi. Serve quindi per la sintesi di molecole organiche attraverso processi che riducono o eliminano la produzione di molecole tossiche e l'uso di solventi. metaboliti di farmaci, farmaci bioplastiche e biocarburanti sono un esempio. affinché un farmaco venga messo in commercio deve essere approvato dalla FDA, che impone una serie di passaggi che includono anche il metabolismo di questi farmaci (devono essere identificati, mappati enzimi di quel farmaco, identificati anche i prodotti che si formano e testare i metaboliti che non siano loro stessi attivi. bisogna fare il metabolismo del metabolita. una volta fatto questo bisogna introdurlo).

Approcci dell'ingegneria proteica

1. Rational design, è un approccio razionale, ho un enzima che fa reazione x, voglio riconosca un substrato diverso e quindi mutare quegli amminoacidi, mutare specificatamente, sito specifico, lo mutare in modo che la loro capacità di formare legami idrogeno riconosca un substrato diverso rispetto all'inizio. se non ho la struttura delle proteine devo costruire la proteina tridimensionale (lo si può fare con il metodo ALFA FOLD). si deve avere quindi una struttura tridimensionale e decido quali amminoacidi mutare, faccio mutagenesi sito specifica sulla base di un ragionamento, sequenzio il DNA per capire se la mutazione è giusta e vedo se fa quello che è giusto, però non sempre funziona e quindi devo mutare un altro amminoacido. questo è un processo che può avere la directed evolution.

struttura - sito directed mutagenesis - sequenza dna - espressione - funzione - determinare struttura

1. directed evolution, evoluzione diretta, si basa sul processo di evoluzione naturale che consiste secondo darwin mutazioni casuali che ci sono quando gli organismi si duplicano e queste mutazioni danno un vantaggio evolutivo, svantaggio o no. per questo tipo non ci serve sapere la struttura tridimensionale perchè non è razionale, prendo il suo gene lo amplifico con la polimerasi e la metto in condizione di fare tanti errori. di queste copie ci possono essere errori deleteri, la polimerasi può formare codoni di stop e non ha senso che si esprima, può esserci una mutazione che non permette ripiegamento e quindi possono crearsi dei mutanti inutili rispetto a quello che mi serve, quindi devo fare uno screening, controllare tutti questi mutanti ed identificare quello buono. lo screening può essere fatto in vivo e in vitro, può essere più vantaggioso quello in vivo (abbiamo un enzima che riconosce

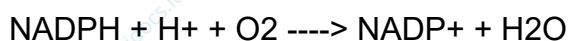
il glucosio e ha un'attività diversa dal galattosio, quindi devo fare un lavoro dove ingegnerizzo un batterio che non abbia enzimi che riconoscano il galattosio, ma io se metto un plasmide mutato nel batterio, siccome mi interessa l'ossidazione del galattosio, faccio una polimerizzazione e la converto in glucosio. metto un terreno solo con galattosio e metto quel batterio modificato e muoiono, però quelle colonie che crescono vuol dire che hanno il plasmide giusto), il sistema in vitro consiste nel fare in modo che invece di mettere il batterio nel terreno di galattosio, prendiamo tutte le colonie e le mettiamo nelle piastre in 97 posti. da capire.

2. de novo design, si tratta di sintetizzare proteine che prima non esistevano, è un sistema razionale che si basa sulla fiducia di quanto siamo brevi a prevedere la struttura. a una struttura tridimensionale corrisponde una funzione. questo processo prevede la sintesi della proteina.

Il bioetanolo, hartley, se prendiamo gli estremofili e lo ingegnerizziamo che abbia cellulasi e che sia capace di produrre etanolo per fermentazione e lo facciamo crescere a 60 70 gradi, man a mano che cresce, l'etanolo evapora e otteniamo il bioetanolo. primi fermentatori dove veniva prodotto il bioetanolo. non si parla di ingegneria di una proteina, ma ingegneria metabolica e da qui si forma il termine biotecnologie. oggi però parliamo di chimica verde.

Produzione dei metaboliti drug, FMO in escherichia coli

di FMO abbiamo 5 forme (FMO 1, 2, 3 del fegato, 4, 5). come tutti gli enzimi che metabolizzano i farmaci, gli FMO3 sono enzimi di membrana inserite sul reticolo endoplasmatico degli epatociti. partendo dal genoma umano possiamo clonare il gene che codifica per la FMO3, inserirla in un plasmide trasformato in escherichia coli e farlo crescere in un fermentatore, aggiungendo quel farmaco che arriva verso dove è prodotta la FMO3 e escherichia produce il metabolita umano. per funzionare ha bisogno di NADP ridotto e quello che fanno è un'ossidazione del substrato.



Questo processo può essere applicato ad altri farmaci, per produrre metaboliti, come ad esempio il citocromo P450, una buona parte è metabolizzato dal citocromo P450. abbiamo molte isoforme del P450, 55, quelle più importanti per il metabolismo dei farmaci sono 10, sono enzimi che sono pericolosi perché possono produrre metaboliti tossici. il P450 sono monossigenasi come FMO, serve NADPH, serve ossigeno molecolare scisso, un atomo di ossigeno fa acqua, l'altro viene inserito sulla sostanza che da prodotto. P450 dove p è pigmento e 450 è la lunghezza d'onda, quindi questi sono pigmenti (emoglobina e mioglobina, anello porfirinico con ferro 2+ per legare ossigeno). il ferro contenuto nel p450 è attivo, quando lega l'ossigeno gli dà l'elettrone e avviene una reazione, l'ossigeno viene attivato e forma un prodotto, il ferro può essere 2+ o 3+, 2+ cede gli elettroni e diventa 3+, gli elettroni vengono dal NADPH che può prendere o dare due elettroni, se io prendo P450 NADPH non succede niente,

P450 prende un elettrone ma quello può cedere due elettroni, quindi per il P450 c'è la reduttasi, quindi per funzionare c'è questa reduttasi che contiene FAD e FMN (possono prendere due o uno elettroni in una volta sola) che lega il NADPH che prende due elettroni). La reduttasi (formata da NADPH, FAD, FMN) funziona come trasformatore, prendendo due elettroni in una volta sola ma dandoli al P450 mano a mano. Devono comunicare quindi reduttasi e p450, e questo c'è perché p450 ha una corona di cariche positive, la reduttasi ha una corona negativa e quindi si riconoscono. Il trasferimento di elettroni è: $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{FMN} \rightarrow \text{P450} (\text{R-H} + \text{O}_2 \rightarrow \text{R-OH} + \text{H}_2\text{O})$.

La reazione generale è: $\text{R-H} + \text{O}_2 - 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{R-OH} + \text{H}_2\text{O}$

ci sono poi approcci artificiali di ingegneria to electron supply, in base ai costi.

Struttura P450

abbiamo gruppo eme, sequenze di amminoacidi che hanno un ruolo nel riconoscimento del substrato, sequenze abbastanza lontane dal sito attivo, diversi segmenti, 6, che concorrono ad agganciare il substrato da angolazioni diverse. P450 BM3 (bacillus megaterium, cresce nel suolo ed è stato uno dei batteri dove è stato evidenziato e sequenziato il P450) 3 è un P450 batterico. Il primo p450 cristallizzato e purificato è il P450CAM è l'abbreviazione della camfora, sia nella forma libera che legato e questo ha attivato una serie di cose. Il secondo P450 isolato e caratterizzato è il P450 BM3. Quello che ha colpito chi ha lavorato con questo enzima è che i vari P450 somigliano più a quelli batterici che quelli umani. Se prendiamo la sequenza di P450 BM3 (batteiroc) cade nel gruppo dei P450 umani, somiglia a quello umano e questo ha generato la domanda nell'albero evolutivo che magari rappresenta il punto di divisione tra l'evoluzione del p450 batterico rispetto a quello di mammifero? Si pensa che sia ancestrale questo p450 bm3, che è poi diventata precursore di quello umano. Le industrie farmaceutiche hanno interesse a produrre metaboliti di farmaci prodotti dagli p450 umani che sono legati alle membrane, instabili. Lavorare con questi è pericoloso. Il p450 bm3 essendo batterico è solubile, stabile e attivo, quindi se produciamo metaboliti di farmaci umani da un p450 batterico che funziona come gli enzimi umani, abbiamo un sistema che può funzionare in termini solubili, biotecnologico. Quindi si sono avviati delle ricerche su questo enzima per creare metaboliti di farmaci come l'omeprazolo (trattamento della pressione) e il suo metabolita, se facciamo demetilazione ossidativa, è la stessa molecola senza CH_3 . Il p450 bm3 non riesce a metabolizzare l'omeprazolo, perché il palmitolato è il substrato originario che il p450 mb3 lo ossida, e quindi come fa a metabolizzare l'omeprazolo? C'è un amminoacido dove c'è una tasca abbastanza capiente, una fenilalanina è ingombrante, l'omeprazolo quando arriva in prossimità del ferro c'è la fenilalanina che glielo impedisce, quindi con il disegno razionale se mutiamo la fenilalanina in valina (catena metile), il fenile viene ridotto a metile phe87val, quindi l'omeprazolo può entrare.

P450 BM3 (palmitolato è il substrato base) approcci:

1. omeprazolo con la rational design
2. diclofenac con la directed evolution, hanno fatto mutazioni a caso e hanno notato che c'è un mutante doppio che ossida il diclofenac, la mutazione è asp251gly e gln307his. il potere dell'approccio è trovare risposte dove la rational design non riesce, però rimane da capire come. queste due mutazioni sono lontane dal sito attivo, asp251 è mutato in glicina e l'acido aspartico è lontano, come la glutammina 307 istidina è dall'altro lato. come fa questa mutazione far avvenire la reazione quando non c'entra niente col sito attivo? si è riuscito a cristallizzare il mutante e si è visto l'impatto di queste mutazioni. questa mutazione glutammina non è molto importante, ma acido aspartico sì. l'acido aspartico ha una catena CH_2COO^- , carbossile dissociato, quindi carica negativa e l'acido aspartico, nella proteina nativa, si trova vicino ad una lisina 224, la lisina ha una catena laterale con 4 CH_2 e un NH_3 , la lisina è positivo e l'acido negativo, questi due si trovano su due diverse eliche in modo adiacente, sono vicine abbastanza dove le due cariche diverse formano un ponte salino, quindi formano un legame. nella proteina wild type queste due sono tenute insieme dal ponte salino nel mutante dove l'acido è diventato glicina il legame non c'è più. quindi può questo avere un impatto? la risposta è data dalla cristallografia. la mancanza del ponte permette una variazione conformazionale che nel wild type non c'è. senza la mutazione della fenilalanina da una mutazione dove il diclofenac può legarsi al sito attivo e il carbonio che ci interessa è vicino al ferro e quindi ossidato.

possiamo partire da un P450 facendo diversi mutanti che fanno ossidare la molecola, partendo dalla molecola di base si ottengono diversi prodotti con mutanti diversi che hanno punti di idrossilazione diversi, possiamo creare in laboratorio varie reazioni.

Produzioni statine

le statine sono molecole di origine vegetale che sono inibitori dell'enzima 3beta idrossi 3 metil glutaryl coa reduttasi (HMG coa reduttasi), sintesi del colesterolo. questo enzima quando è troppo attivo, l'individuo che ha l'enzima molto attivo tenderà a sintetizzare il colesterolo (ormoni sessuali, steroidi ecc), alcuni farmaci sono inibitori di questo enzima e quindi un po' di colesterolo si sintetizza con gli alimenti, però non avremo una sovrapproduzione. la statina base è prodotta dal fungo penicillium citrinum (compactina, inibitore reduttasi) e lo troviamo nel riso rosso. l'attività della compactina non è un'attività così alta, quindi si deve fare in modo che viene prodotta una variante idrossilata sul carbonio sei quindi si forma la pravastatina attraverso due passaggi di fermentazione, la prima è il fungo citrinum che produce compactina, poi il processo di sintesi prevede l'isolamento della compactina con cromatografia e poi la seconda fermentazione con idrossilazione della compactina sul carbonio numero 6.

1. compactina ----> pravastatina
2. idrossilazione

Produzione antimalarici

l'acido artemisinico è un antimalarico, partendo dall'acetil coenzima a attraverso enzimi che coinvolgono P450 si giunge al prodotto finale che è l'artemisina. il *saccharomyces* è stato ingegnerizzato per produrre l'acido. l'acido artemisinico viene isolato dalla fermentazione e dopo vari passaggi si arriva al farmaco finale.

Produzione di steroidi e vitamina D3

condividono l'anello del colesterolo e tra gli steroidi ci sono gli ormoni sessuali e corticosurrenali. la vitamina D3 può essere prodotta da un batterio con la p450.

Produzione bioplastiche

possono avere diverse strutture, le p450 posso idrossilare in posizione omega della bioplastica con acido oleico o stearico.