



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : BIOSCIENZE E BIOTECNOLOGIE

INDIRIZZO: BIOTECNOLOGIE

CICLO: XXII

STUDIO DI ENZIMI D'INTERESSE MEDICO ED INDUSTRIALE

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Coordinatore d'indirizzo : Ch.mo Prof. Giorgio Valle

Supervisore : Dr.ssa Elisabetta Bergantino

Dottorando : Stefano Fogal

“...da grande voglio fare lo scienziato...”

31 Gennaio 2010

Indice

Indice	1
Indice delle figure e delle tabelle	3
Summary	6
Riassunto	9
1 Sintesi biocatalitica della Moxifloxacin	12
1.1 Introduzione	12
1.1.1 Stato dell'arte	12
1.1.2 Sintesi chimica della Moxifloxacin	13
1.1.3 La biocatalisi nella sintesi di principi farmaceutici	15
1.1.4 Sintesi biocatalitica del (S,S)-2,8-diazabicyclononano	17
1.1.5 Putativi enzimi utilizzabili	18
1.2 Scopo del progetto	26
1.3 Risultati	28
1.3.1 Studio degli enzimi	28
1.3.2 Studio dei substrati	30
1.3.3 Preliminare screening enzimatico	35
1.3.4 Modifica del substrato	39
1.3.5 Miglioramento delle condizioni di reazione	48
1.4 Conclusioni	52
2 Sintesi biocatalitica del testosterone	53
2.1 Introduzione	53
2.1.1 Sintesi del testosterone: stato dell'arte	53
2.1.2 Sviluppo di una nuova via di sintesi	55
2.1.2.1 La biocatalisi	55
2.1.2.2 L'impiego delle chetoreduccasi	55
2.1.2.3 Sintesi chemoenzimatica del testosterone	57
2.1.3 Individuazione degli enzimi	58
2.1.3.1 Le 17 β -idrossisteroide deidrogenasi	58
2.1.3.2 La 17 β -idrossisteroide deidrogenasi di tipo 5 umana	61
2.1.3.3 La 17 β -idrossisteroide deidrogenasi di tipo 5 murina	65
2.1.3.4 Una putativa 17 β HSD da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
2.1.3.5 <i>Screening</i> bioinformatico del genoma di <i>S. cerevisiae</i>	69
Scopo del progetto	73
Risultati	75
2.3.1 Pianificazione dello studio	75
2.3.2 Clonaggio degli enzimi	76
2.3.2.1 17 β -HSD5 di topo in forma nativa	76
2.3.2.2 17 β -HSD5 di topo in forma <i>Histidine Tagged</i>	77
2.3.2.3 Clonaggio di YMR226c in forma nativa e HT	78
2.3.3 Espressione degli enzimi	79
2.3.4 Studio dell'attività enzimatica	82
2.3.4.1 L'attività della 17 β HSD5 murina	82
2.3.4.2 L'attività della YMR226c	85
2.3.4.3 Approfondimento dello studio sulla 17 β HSD5 HT murina	87
2.3.5 Scale up della fermentazione	95
2.3.6 Conversione enzimatica dell'AD in TS	96
2.3.6.1 Individuazione del pH ottimale	99

2.4	Conclusioni.....	100
3	Tirosinasi umana: espressione ricombinante e caratterizzazione.....	102
3.1	Introduzione.....	102
3.1.1	La Melanina.....	102
3.1.1.1	Eumelanina e feomelanina.....	103
3.1.1.2	Il modello “ <i>casting</i> ”	105
3.1.2	La tirosinasi: una proteina a rame di tipo 3	106
3.1.2.1	Le proteine a rame	106
3.1.2.2	La tirosinasi	108
3.1.2.3	Il meccanismo catalitico	109
3.1.2.4	La tirosinasi umana.....	113
3.1.2.5	Modelli strutturali della tirosinasi umana.....	114
3.1.2.6	La maturazione della tirosinasi umana	117
3.1.3	Il ruolo della tirosinasi umana in patologie e trattamenti	120
3.1.3.1	L’albinismo.....	121
3.1.3.2	Discromie cutanee e trattamento dell’iperpigmentazione	122
3.1.3.3	Il morbo di Parkinson	125
3.1.3.4	La tirosinasi come target per il trattamento del melanoma.....	127
3.2	Scopo del progetto	129
3.3	Risultati.....	130
3.3.1	Espressione della tirosinasi mediante il sistema baculovirus	130
3.3.1.1	Il sistema baculovirus	130
3.3.1.2	Clonaggio nel vettore pFastBac ®.....	132
3.3.1.3	Trasformazione delle cellule di E. coli DH10Bac ®.....	134
3.3.1.4	Trasfezione delle cellule sf9 e amplificazione del virus.....	136
3.3.1.5	Espressione proteica	137
3.3.2	Individuazione di un protocollo di purificazione	139
3.3.3	Controllo negativo	147
3.3.4	Miglioramento dell’espressione della tirosinasi	150
3.3.4.1	Aggiunta di rame	150
3.3.4.2	Infezione con baculovirus.....	152
3.3.4.3	<i>Scale up</i> in fermentatore	153
3.3.4.4	Condizioni di conservazione dell’enzima.....	154
3.3.5	Miglioramento della purificazione	154
3.3.5.1	Digestione con proteinasi K	156
3.3.5.2	Isolamento della tirosinasi in gel nativo	161
3.4	Conclusioni prima parte	165
3.5	Caratterizzazione strutturale del sito attivo dell’enzima	166
3.5.1	Individuazione di substrati ed inibitori.....	166
3.5.2	Determinazione delle costanti cinetiche	168
3.6	Conclusioni seconda parte	172
4	Discussione.....	177
5	Materiali e metodi.....	180
5.1	Materiali	180
5.2	Tecniche di biologia molecolare	180
5.3	Metodologie biochimiche	184
5.4	Metodologie spettroscopiche.....	186
	Bibliografia.....	188
	Ringraziamenti	196

Indice delle figure e delle tabelle

Figura 1.1	12
Figura 1.2	14
Figura 1.3	16
Figura 1.4	17
Figura 1.5	18
Figura 1.6	19
Figura 1.7	20
Figura 1.8	21
Figura 1.9	22
Figura 1.10	22
Figura 1.11	23
Figura 1.12	24
Figura 1.13	25
Figura 1.14	27
Figura 1.15	28
Figura 1.16	32
Figura 1.17	34
Figura 1.18	36
Figura 1.19	37
Figura 1.20	38
Figura 1.21	39
Figura 1.22	41
Figura 1.23	43
Figura 1.24	44
Figura 1.25	44
Figura 1.26	45
Figura 1.27	46
Figura 1.28	49
Figura 1.29	52
Figura 2.1	54
Figura 2.2	56
Figura 2.3	58
Figura 2.4	60
Figura 2.5	60
Figura 2.6	62
Figura 2.7	63
Figura 2.8	64
Figura 2.9	64
Figura 2.10	65
Figura 2.11	66
Figura 2.12	66
Figura 2.13	69
Figura 2.14	70
Figura 2.15	71
Figura 2.16	72
Figura 2.17	73

Figura 2.18.....	75
Figura 2.19.....	76
Figura 2.20.....	77
Figura 2.21.....	78
Figura 2.22.....	79
Figura 2.23.....	80
Figura 2.24.....	80
Figura 2.25.....	81
Figura 2.26.....	81
Figura 2.27.....	83
Figura 2.28.....	84
Figura 2.29.....	85
Figura 2.30.....	86
Figura 2.31.....	87
Figura 2.32.....	89
Figura 2.33.....	90
Figura 2.34.....	91
Figura 2.35.....	91
Figura 2.36.....	92
Figura 2.37.....	93
Figura 2.38.....	94
Figura 2.39.....	98
Figura 2.40.....	99
Figura 3.1.....	103
Figura 3.2.....	104
Figura 3.3.....	105
Figura 3.4.....	108
Figura 3.5.....	112
Figura 3.6.....	114
Figura 3.7.....	115
Figura 3.8.....	116
Figura 3.9.....	117
Figura 3.10.....	120
Figura 3.11.....	122
Figura 3.12.....	124
Figura 3.13.....	126
Figura 3.14.....	128
Figura 3.15.....	131
Figura 3.16.....	132
Figura 3.17.....	133
Figura 3.18.....	134
Figura 3.19.....	135
Figura 3.20.....	136
Figura 3.21.....	138
Figura 3.22.....	138
Figura 3.23.....	140
Figura 3.24.....	141
Figura 3.25.....	142
Figura 3.26.....	145

Figura 3.27	145
Figura 3.28	147
Figura 3.29	149
Figura 3.30	151
Figura 3.31	155
Figura 3.32	158
Figura 3.33	161
Figura 3.34	162
Figura 3.35	163
Figura 3.36	167
Figura 3.37	168
Figura 3.38	172
Tabella 1.1	20
Tabella 1.2	29
Tabella 1.3	47
Tabella 1.4	50
Tabella 1.5	50
Tabella 1.6	50
Tabella 2.1	59
Tabella 2.2	61
Tabella 2.3	67
Tabella 2.4	68
Tabella 2.5	95
Tabella 2.6	99
Tabella 3.1	151
Tabella 3.2	156
Tabella 3.3	157
Tabella 3.4	159
Tabella 3.5	160
Tabella 3.6	171

Summary

Three main projects were carried out in the time span of my doctorate. Two of them consist in the identification of enzymes necessary to perform mid- or final steps in drugs preparation; the third is related to recombinant human tyrosinase expression, partial purification and characterization.

In collaboration with Fabbrica Italiana Sintetici (FIS), a critical step in the synthesis of a Moxifloxacin building block has been identified. An alternative enzymatic route is proposed that allows the resolution of a dicarboxylic esters racemic mixture. To this aim an enzyme that selectively hydrolyse one of the two enantiomers was searched. More precisely we aimed to use this enzyme to produce an enantiopure acid form, easy to separate from the unreacted enantiomer by organic phase extraction and used the desired enantiomer to prepare the Moxifloxacin building block (4*as*,7*as*)-ottaidro-1H-pirrolo[3,4-*b*]piridina.

After trying several commercially available enzymes that have as substrates racemic mixtures, using different analytical approaches (NMR and HPLC-MS techniques), we succeeded in finding *Candida antarctica* lipase B as a highly selective enzymes that partially hydrolysed the mixture of dimethyl 1-acetylpiperidine-2,3-dicarboxylate in aqueous buffer. Enantiomer selectivity was evaluated by chiral HPLC analysis on a preparative scale, confirming that hydrolysis produces a high enantiomeric excess of the 2*R*, 3*S* form. Furthermore, MS analysis confirmed that only one of the two methyl esters was hydrolyzed by the lipase, conferring at the enzyme regioselectivity too. The reaction product was further characterized by NMR techniques (COSY, HMQC, HMBC), which indicate that hydrolysis take place on methyl group in position 3. Kinetics analysis by NMR was used to estimate the values of K_m and V_{max} of the hydrolysis reaction. The enzyme was used by FIS for grams-scale Moxifloxacin precursor synthesis. This process has been submitted for patent¹.

A second project, again in collaboration with FIS, was focus on overcoming a critical step in the organic synthesis of the hormone testosterone (TS) by a regio- and stereo-specific conversion from 4-androstene-3,17-dione (AD). According to literature, no commercially available enzymes have been found that properly catalyse this transformation. Since both the substrate and the product are natural

compounds, we focused the research on identification of natural enzymes that catalyze analogous reactions. The enzymatic category that catalysed this transformation is generally classified as 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (E.C.:1.1.1.51). However these enzymes, in different organisms, differ in terms of region-selectivity and rate on catalysis. A combined bioinformatics and literature *screening* resulted in two candidates that were selected for recombinant expression: the 17 β -hydrosteroid dehydrogenase type 5 from mouse^{2, 3} and the YMR226c⁴ gene product of *Saccaromyces cerevisiae*. The coding sequence of enzymes were cloned in suitable vectors for expression, in fusion with an histidine-tag, in *E.coli*. Small scale preparations of the recombinant enzyme were initially set up and activity tests on the desired substrate were performed. Only the mouse enzyme showed activity towards AD and it was subjected of further studies. A small scale purifications allowed verification of the product obtained in terms of regio- and stereo-selectivity and yield, evaluation of thermal stability of the enzyme, kinetic analysis, cofactor preference (NADPH or NADH), and choice of an adequate partial organic mixture to work with, for increase substrate solubility in water. A protocol for purification of the enzyme from medium scale cultures was then designed and performed. The amount of enzyme obtained from these preparations, in combination with the commercially available D-glucose dehydrogenase required for the recycling of the cofactor NADPH, allowed the conversion of milligrams of androstendione. Also this process was submitted for patent⁵.

The third project is on the membrane associate human tyrosinase. This enzyme is implicated in different pathologies and it is a potentially targets for drugs aimed to treat melanin synthesis disorder, melanoma and ROS associated diseases. The protein was expressed in two recombinant forms using insect cell sf9 and baculovirus system (Bac to Bac ®, Invitrogen), a system capable of glycosilation. Both forms were efficiently expressed by the cells: the wild type and a form lacking the signal sequence and the transmembrane domain. The two proteins are observed initially by western blot. The effort to define a purification protocol was focused on wild type form. It appears as a membrane associated protein and a *screening* with several detergents indicates that only Triton 100X, n-dodecyl- β -D-maltoside and SDS were able to solubilize the protein. Following

solubilisation, tests were performed in order to check its activity towards natural substrate L-DOPA and L-tyrosine, by spectrophotometric analysis. This activity absent in not infected cells or expressing human tyrosinase in soluble form. This latter control confirmed the importance of glycosilation in correct folding of the protein.

The low efficiency in the purification of protein expressed and its instability forced us to try to improve the purification protocol, cell expression and activity test. However, the low expression level of tyrosinase remained the critical point of the procedure. For this reason we decided to directly purify the protein using SDS-PAGE gel techniques.

An activity test was developed using 96 well plate to determine kinetic constants of natural or artificial substrates, as well as known inhibitors. The *screening* was run in parallel using soluble extract of human tyrosinase and the purified tyrosinase from *S. Antibioticus*, an enzyme with a high level of homology with the crystallized tyrosinase from *S. castaneoglobusporus*⁶. This will allow to directly compare kinetics data obtain for the two tyrosinases.

Riassunto

Tre principali progetti sono stati condotti durante il periodo di dottorato. Due di questi consistono nell'individuazione di enzimi utili a catalizzare passaggi intermedi o finali nella sintesi di principi attivi; il terzo riguarda l'espressione ricombinante della tirosinasi umana, la sua parziale purificazione e caratterizzazione.

Nel primo progetto, in collaborazione con Fabbrica italiana sintetici (FIS) è stato individuato un passaggio critico nella sintesi di un *building block* della Moxifloxacina e n'è stata proposta un'alternativa via enzimatica che prevede la risoluzione di una miscela racemica di un diestere precursore. A questo scopo è stato ricercato un enzima che fosse in grado di idrolizzare selettivamente uno dei due enantiomeri al fine di generare la relativa forma acida enantiomericamente pura, facilmente separabile dall'enantiomero non reagito, ed utilizzare successivamente l'enantiomero con configurazione desiderata per la preparazione del (4*as*,7*as*)-ottaidro-1H-pirrolo[3,4-*b*]piridina, elemento costitutivo della Moxifloxacina.

Dopo aver testato diversi enzimi commerciali, già utilizzati in letteratura per effettuare risoluzioni racemiche, ed utilizzando diversi approcci analitici (tecniche NMR e HPLC-MS), è stato identificato con successo nell'enzima lipasi B di *Candida Antarctica* un valido strumento per idrolizzare selettivamente una miscela racemica di dimetil 1-acetilpiperidina-2,3-dicarbossilato in ambiente acquoso. La selettività enantiomerica è stata determinata mediante HPLC chirale, confermando che l'idrolisi procede solo sull'enantiomero con configurazione 2*R*,3*S*. In più l'analisi HPLC-MS ha evidenziato che solo uno dei due gruppi metilici viene idrolizzato dalla lipasi, conferendo all'enzima anche regioselettività. Il prodotto di reazione è stato ulteriormente caratterizzato mediante tecniche NMR (COSY, HMQC, HMBC) le quali hanno indicato che l'idrolisi avviene al metile in posizione 3. Uno studio cinetico condotto mediante NMR ha poi permesso di stimare le costanti cinetiche K_m e V_{max} della reazione di idrolisi. L'enzima è stato utilizzato da FIS per la sintesi in scala di alcuni grammi del precursore della Moxifloxacina. Il processo è stato sottoposto a domanda di brevetto¹.

Un secondo progetto, condotto ancora in collaborazione con FIS, si è focalizzato sul tentativo di superare un passaggio critico nella sintesi organica del testosterone (TS) che consiste in una riduzione regio- e stereo-specifica dal 4-andro-3,17-dione (AD). In accordo con la letteratura non esistono enzimi commercialmente disponibili in grado di catalizzare in modo appropriato questa trasformazione. Dal momento che sia il substrato che il prodotto sono composti naturali, è stata focalizzata la ricerca nell'individuazione di un enzima che in natura effettuasse l'analoga trasformazione. La categoria enzimatica che catalizza questa trasformazione è generalmente classificata come 17 β -idrossisteroide deidrogenasi (E.C.:1.1.1.51). Tuttavia questi enzimi, nei diversi organismi, si differenziano in termini di regioselettività e velocità di catalisi. La combinazione di uno *screening* bioinformatico e bibliografico ha permesso di individuare due candidati che sono stati selezionati per l'espressione in forma ricombinante: 17 β -idrossisteroide deidrogenasi tipo 5 murina^{2, 3} e il prodotto genico YMR226c⁴ di *Saccharomyces cerevisiae*. Le sequenze codificanti degli enzimi sono state clonate in vettori adatti per l'espressione in *E.coli*, anche in fusione con una coda di istidine. Una preparazione in piccola scala degli enzimi ricombinanti ha permesso di effettuare tests di attività sul substrato desiderato. Solo l'enzima murino ha mostrato attività nei confronti dell'AD ed è stato oggetto di ulteriori studi. Una preparazione in piccola scala ha permesso di analizzare il prodotto ottenuto dalla reazione, in termini di regio- e stereo-selettività e resa, così come la valutazione della stabilità termica dell'enzima, la preferenza per il cofattore (NADPH o NADH) e la scelta dell'adeguata frazione di cosolvente da utilizzare per incrementare la solubilità del substrato in acqua. Un protocollo di purificazione dell'enzima in scala più consistente è successivamente stato identificato e migliorato. La quantità di enzima ottenuta dalle preparazioni, in combinazione con l'utilizzo di una D-glucosio deidrogenasi commerciale, per riciclare il cofattore, ha permesso di convertire alcuni milligrammi di AD. Anche per questo processo è stata effettuata richiesta di brevetto⁵.

Il terzo progetto riguarda l'enzima tirosinasi umano. Questo enzima è implicato in diverse patologie e rappresenta un potenziale bersaglio farmaceutico per trattare disordini nella sintesi della melanina, melanoma e patologie associate a specie ROS. L'enzima è stato espresso in due forme ricombinanti utilizzando

cellule di insetto sf9 e il sistema baculovirus (Bac to Bac ®, Invitrogen), un sistema in grado di effettuare la glicosilazione. Entrambi le forme, la prima nativa e la seconda priva di sequenza segnale e regione transmembrana, sono state espresse dalle cellule ed inizialmente osservate mediante analisi *western blot*.

Il protocollo di purificazione si è focalizzato sulla forma nativa, che appare associata alle membrane. Diversi detergenti sono stati utilizzati per solubilizzare l'enzima ma solo Triton 100X, *n*-dodecyl- β -D-maltoside and SDS si sono dimostrati efficaci. A seguito della solubilizzazione, test di attività sono stati condotti con i substrati naturali L-DOPA e L-tirosina, mediante saggi spettrofotometrici. Questa attività era assente in cellule di insetto non infettate o esprimenti la tirosinasi umana in forma solubile. Quest'ultimo controllo ha confermato l'importanza della glicosilazione nel corretto *folding* della proteina.

Un primo protocollo di purificazione della proteina in forma nativa risultato poco efficiente ha costretto ad effettuare una serie di miglioramenti non solo nella purificazione, ma anche nelle condizioni di espressione e nei test di attività adottati. Tuttavia il basso livello di espressione è rimasto il punto critico della procedura, che ha obbligato a tentare di isolare l'enzima direttamente su gel SDS-PAGE.

Un sistema di test di attività, sviluppato utilizzando piastre da 96 pozzetti, ha permesso di determinare le costanti cinetiche di substrati naturali ed artificiali, così come di inibitori noti. Lo *screening* è stato condotto in parallelo utilizzando l'estratto solubile contenente la tirosinasi umana e l'enzima tirosinasi di *S. Antibioticus* un enzima con un elevato livello di omologia con la tirosinasi di *S. castaneoglobusporus* la cui struttura è stata recentemente determinata⁶. Questo ha permesso di confrontare direttamente i dati ottenuti per le due tirosinasi e proporre un modello per la tirosinasi umana.

1 Sintesi biocatalitica della Moxifloxacin

1.1 Introduzione

1.1.1 Stato dell'arte

La Moxifloxacin è un antibatterico appartenente alla classe dei fluorochinoloni ad ampio spettro, impiegato per il trattamento delle infezioni respiratorie (polmonite, sinusite cronica, bronchite cronica), della pelle e dei tessuti molli. Viene inoltre commercializzata in una forma a basso dosaggio per uso oftalmico. Sono in corso anche studi clinici in cui la Moxifloxacin viene utilizzata nel trattamento della tubercolosi. Essa, più in generale, risulta efficace nel trattamento contro batteri Gram-negativi, Gram-positivi, batteri atipici e anche anaerobi⁷. L'attività battericida della Moxifloxacin deriva dalla sua abilità di inibire la DNA girasi (topoisomerasi II) e la topoisomerasi IV batterica, enzimi essenziali coinvolti nella replicazione del DNA, nella trascrizione e nella ricombinazione⁸.

La Moxifloxacin, come 8-metossichinolone, viene sintetizzato dalla Bayer AG (Leverkusen, Germania) ed è chimicamente definito come acido 1-ciclopropil-7-[(S,S)-2,8-diazabicyclo [(4.3.0)] non-8-il]-6-fluoro-8-methoxy-1,4-dihydro-4-oxo-3-chinolino carbossilico idroclorato (Figura 1.1).

La molecola è caratterizzata da uno scheletro fluorochinolone, comune a quello di altri due antibiotici della stessa categoria (Gatifloxacin e Balofloxacin), e da una catena laterale S,S-diazabicyclononano.

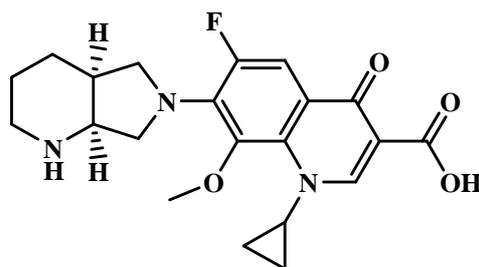


Figura 1.1
Struttura chimica della Moxifloxacin.

Questo principio attivo ha un'attività incrementata, rispetto ad altri fluorochinoloni, grazie ad un gruppo ciclopropilico all'N-1 e fluorinico al C-6. La sostituzione azabicyclica al C-7 è poi associata ad un sostanziale incremento dell'attività contro i Gram-positivi. Di ulteriore importanza è la presenza la C-8 di un gruppo metossi, che è associato sia ad una minore propensione dei batteri a sviluppare resistenza, sia a ridurre le fototossicità data dalla presenza di C-8 alogenossostituito, come per altri fluorochinoloni (es. Sparfloxacin).

In questi anni, in cui stanno emergendo sempre più patogeni delle vie respiratorie resistenti a cefalosporine e altri β -lattamici, macrolidi e tetracicline, è molto importante che la Moxifloxacin mostri un'eccellente doppia attività inibitoria nei confronti di enzimi batterici fondamentali: la possibilità, infatti, che si generi una ceppo resistente implica la contemporanea generazione di mutanti della topoisomerasi II e della topoisomerasi IV, nelle relative forme insensibili al principio attivo, un evento estremamente improbabile, che giustifica la peculiare caratteristica di questo antibiotico cioè quella di dare origine difficilmente a ceppi resistenti⁷.

Le vendite mondiali annue di questo farmaco è si aggirano attorno alle 62 tonnellate per un valore di 1100 milioni di USD (2009, fonte IMS).

1.1.2 Sintesi chimica della Moxifloxacin

L'intermedio fluorochinolone (CAS RN=112811-72-0), con o senza il gruppo metossile, è un prodotto commerciale, la cui sintesi richiede undici passaggi. La chimica coinvolta è comune alla maggior parte dei fluorochinoloni.

L'S,S-diazabicyclononano (CAS RN=151213-40-0) rappresenta invece l'intermedio più critico, in quanto possiede due centri chirali, entrambi con configurazione S, otticamente attivo (levogiro). Anch'essa è una sostanza commerciale, ma la sua sintesi e risoluzione ottica non è al momento soddisfacente. La sintesi di questo intermedio comprende la reazione di anidride di acido piridin-2,3-dicarbossilico con benzilammina a dare N-benzil-2,3-piridin-dicarbossamide, la riduzione dell'anello piridinico a dare 6-benzil-5,7-diossoottaidropirrolo[3,4-b]piridina, la riduzione dei gruppi ammidici a dare 6-benzilottaidropirrolo[3,4-b]piridina e la sua risoluzione ottica per formazione del

sale diastereoisomero con acido L-tartarico, seguito da debenzilazione (Figura 1.2). Questa via di sintesi è descritta ad esempio in alcuni brevetti (EP 0550903, EP 1077979), tuttavia l'eccesso enantiomerico è relativamente basso.

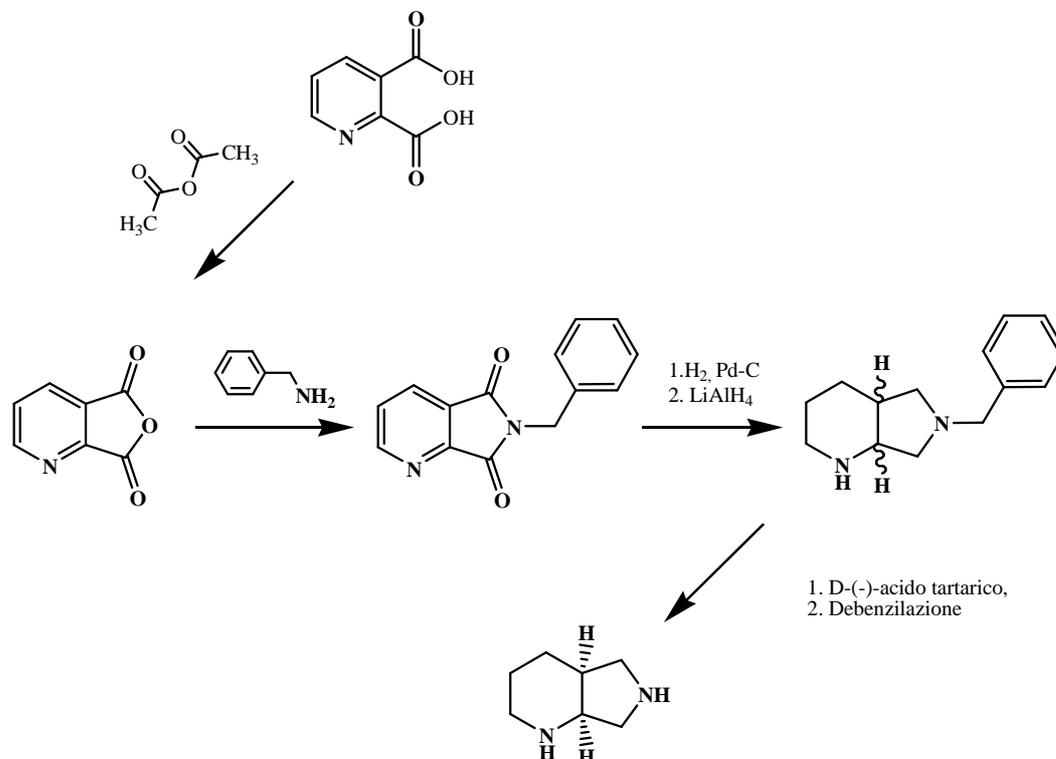


Figura 1.2
Schema di preparazione dell'intermedio (S,S)-2,8-diazabicyclononano, importante *building-block* della Moxifloxacina.

Alternativamente, è stata descritta la risoluzione ottica dell'intermedio 6-benzil-5,7-diossoottaidropirrolo[3,4-b]piridina con acido D-tartarico, seguito dalla riduzione dei gruppi ammidici e quindi da debenzilazione. Il procedimento è descritto in altri brevetti (EP 0550903, EP 1067129, EP 1192153 ed EP 1375501) ed anche in questo caso porta a bassi eccessi enantiomerici. Infine, nel brevetto EP 1003902 viene descritta la risoluzione enzimatica del diazabicyclononano racemo per mezzo di una reazione di trans esterificazione con etil-acetato in presenza di una lipasi da *Candida antarctica*. La reazione procede tuttavia molto lentamente, richiedendo 14 giorni alla temperatura di 40°C.

La condensazione dei due sintoni, l'intermedio fluorochinolone, con o senza sostituente metossilico e l'intermedio S,S-diazabicyclononano, viene operata con metodiche note.

1.1.3 La biocatalisi nella sintesi di principi farmaceutici

La biocatalisi, cioè l'utilizzo di enzimi come catalizzatori nella sintesi chimica, è diventata uno valido strumento per i chimici sintetici, non solo per il minor impatto ambientale che deriva dalla loro applicazione, ma sempre più spesso essa rappresenta un'alternativa economicamente vantaggiosa rispetto ai processi chimici classici. Le trasformazioni enzimatiche effettuate mediante enzimi parzialmente purificati o cellule intere come catalizzatori, sono sempre più utilizzate per la produzione di una moltitudine di prodotti chimici.

Le più nota trasformazione effettuate mediante biocatalisi è rappresentato dalla produzione di acrilammide mediante la nitrile idratasi di *Rhodococcus rhodochrous* in scala di 30.000 t/a (Mitsubishi Rayon). Analogamente il fruttosio viene prodotto, da diverse compagnie, a partire da glucosio mediante l'utilizzo della glucosio isomerasi per una totale produzione di 1.000.000 t/a. La produzione di latte senza lattosio avviene mediante l'idrolisi di questo in glucosio e galattosio mediante l'utilizzo della β -galattosidasi (250.000 L/giorno).

Nel campo della chimica fine la maggiore applicazione deriva dalla chemoselettività, la regioselettività e specialmente la stereoselettività che questi enzimi spesso possiedono, necessaria per la produzione di prodotti enantiomericamente puri. Una delle trasformazioni più note, nella preparazione di prodotti farmaceutici, è rappresentata dall'idrolisi selettiva della penicilina G, mediante penicilina amidasi, a dare il precursore fondamentale per la preparazione di un'ampia categoria di antibiotici, l'acido 6-amminopenicilannico.

La risoluzione biocatalitica sfrutta la selettività degli enzimi per uno dei due enantiomeri di una molecola chirale: mentre un enantiomero rimane virtualmente non reagito, l'altro viene convertito in un prodotto, generando così due molecole chimicamente diverse, substrato e prodotto, enantiomericamente pure e con proprietà chimico-fisiche differenti. Quella delle idrolasi, in questo contesto, rappresentano di gran lunga la categoria enzimatica industrialmente più utilizzata (60%), anche nella produzione di principi farmaceutici.

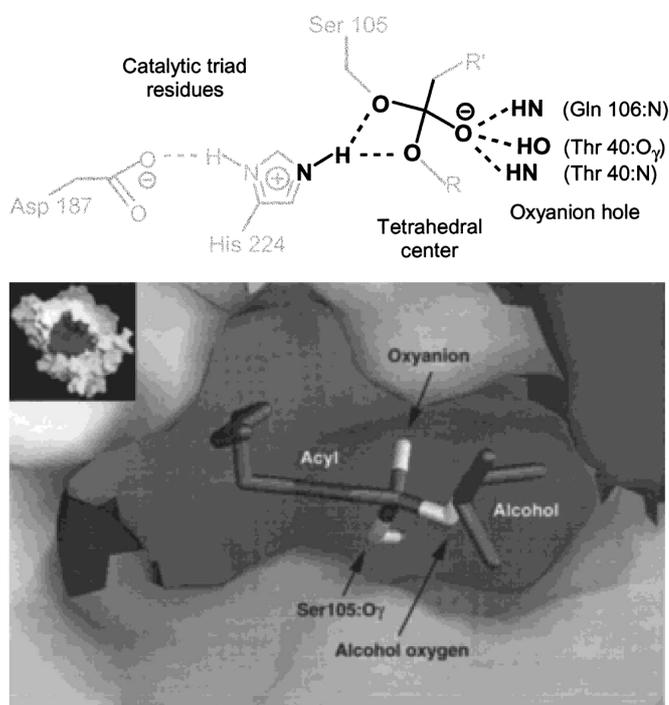
In genere le idrolisi che coinvolgono legami esterici o ammidici sono le più facili da effettuare mediante l'utilizzo di enzimi come lipasi, esterasi, proteasi o

amidasi. Il fatto poi che questi enzimi non necessitano di un cofattore, come invece è nel caso delle ossidoreduttasi, e la loro ampia disponibilità commerciale ha reso l'utilizzo di questa categoria enzimatica molto diffusa in ambito industriale.

Il meccanismo di idrolisi enzimatico è simile a quello chimico, catalizzato da una base: un gruppo nucleofilo che costituisce il sito attivo dell'enzima attacca il gruppo carbonilico del substrato estereo o ammidico. Questo gruppo nucleofilo può essere costituito dal gruppo idrossilico della serina (vedi esempio in Figura 1.3), il gruppo carbonilico di un residuo aspartico o la funzione tiolica di una cisterna.

Figura 1.3

Sopra meccanismo catalitico proposto per la lipasi di *Candida antarctica* tipo B, dove il sito attivo è rappresentato dall'idrossile serinico di una triade catalitica. Sotto, la tasca enzimatica dell'enzima associato al substrato 3-metil-2-butil-octanoato, in stato di transizione. Immagini adattate da Raza *et al.* 2000⁹.



Uno degli approcci più classici nella risoluzione enantiomerica è rappresentato dalla idrolisi selettiva dell'estere relativo all'enantiomero desiderato. Un esempio di risoluzione mediante idrolisi selettiva di una miscela racemica di esteri è rappresentata in Figura 1.4, dove la miscela del fenil-glicidil-estere trattata mediante lipasi consente di ottenere un importante *building block* nella preparazione di un farmaco cardiovascolare, il diltiazem (Tanabe, Osaka, Giappone).

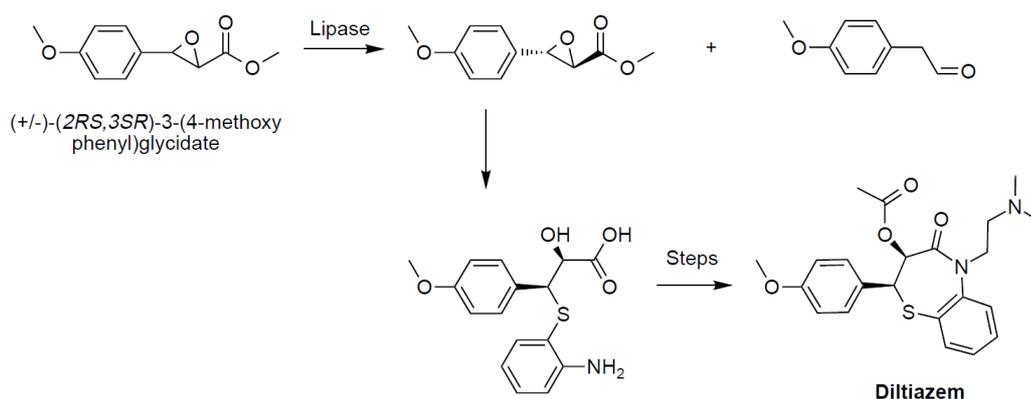


Figura 1.4
Sintesi mediata de lipasi del principio farmaceutico Diltiazem. Immagine adattata da Schulze & Wubbolts 1999¹⁰.

La sintesi mediante risoluzione enzimatica ha però l'inconveniente di avere una produttività massima del 50% del prodotto iniziale. Diversi approcci sono stati sviluppati dalla comunità scientifica per superare questo ostacolo, come ad esempio la racemizzazione del substrato non reagito, anche *in situ*, così come l'utilizzo dell'enantiomero non desiderato in altri processi dove è richiesta la particolare configurazione enantiomerica della molecola¹⁰⁻¹².

1.1.4 Sintesi biocatalitica del (S,S)-2,8-diazabicyclononano

Come precedentemente descritto l'intermedio (S,S)-2,8-diazabicyclononano nella sintesi della Moxifloxacina rappresenta l'intermedio più critico da preparare, a causa della sua particolare configurazione enantiomerica.

È stato così proposto un nuovo approccio nella sua preparazione che prevede l'utilizzo di enzimi per la risoluzione enantiomerica di un precursore del sintone. Attraverso la riduzione, mediante idrogenazione Pd/C, del diestere dell'acido-2,3-carbossipiridinico è possibile ottenere una miscela racemica costituita solo da i due enantiomeri in conformazione *cis*, esteri dell'acido-2,3-carbossipecolico (2*S*,3*R* e 2*R*,3*S*).

Un enzima in grado di idrolizzare solo uno dei due enantiomeri *cis*, indipendentemente dalla posizione dell'estere idrolizzato, 2, 3 o entrambi, consentirebbe di separare facilmente i due enantiomeri, mediante estrazione con solventi, e successivamente di procedere nella preparazione del (S,S)-2,8-diazabicyclononano.

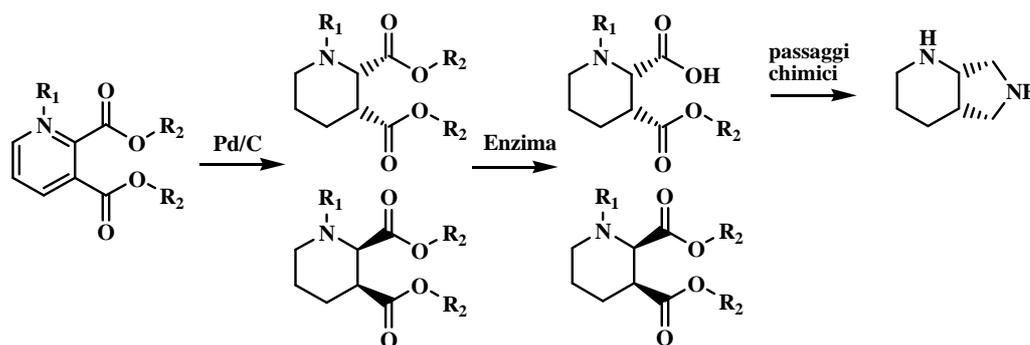


Figura 1.5
Sintesi ipotetica del (S,S)-2,8-diazabicyclononano, mediante risoluzione racemica biocatalizzata.

Come mostrato in Figura 1.5, l'enzima da individuare deve quindi essere in grado di riconoscere uno solo dei due enantiomeri derivati dalla riduzione dell'anello piridinico. Tuttavia non è strettamente necessario che l'enantiomero idrolizzato sia quello in seguito utilizzato per la preparazione del sintone, così come è ininfluenza la posizione dell'idrolisi. Infatti, una volta raggiunta la completa idrolisi di un enantiomero, questo può essere separato dall'altro, che, a sua volta, risulterà ugualmente enantiomericamente puro. La molecola con desiderata configurazione sterica sarà poi utilizzata per preparare il *building block* di interesse, mediante una serie di passaggi chimici, da definire in base alla molecola ottenuta.

Oltre all'enzima utilizzato, anche il tipo di estere ed eventuali sostituenti al gruppo amminico dell'anello piperidinico potranno rappresentare elementi fondamentale per consentire di ottenere un'idrolisi enantioselettiva.

1.1.5 Putativi enzimi utilizzabili

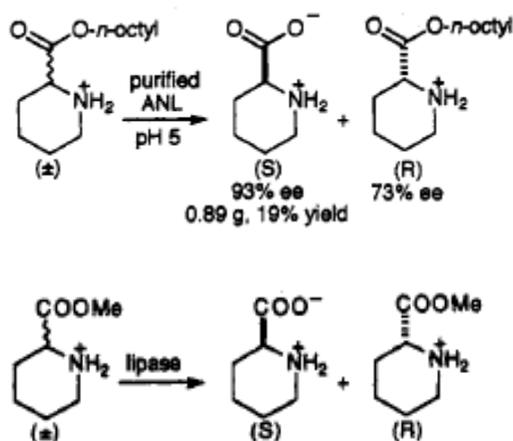
L'individuazione di un valido enzima da utilizzare nel processo biocatalitico descritto richiede, innanzitutto, di disporre di una libreria di enzimi idrolitici e, non dimeno, di una serie di putativi substrati variamente sostituiti.

Esistono diversi kit commerciali che forniscono una serie di enzimi idrolitici con documentata enantioselettività. Tuttavia, oltre al notevole costo, questi sistemi spesso non permettono di conoscere il tipo di enzima utilizzato, che rimane segreto in modo da costringere, dal punto di vista della futura fornitura enzimatica, alla dipendenza dalla ditta detentrica della libreria.

L'approccio che è stato utilizzato consiste, invece, nel partire da una raccolta d'informazioni riguardo alla disponibilità di enzimi e/o microrganismi, commercialmente disponibili o meno, che dimostrano enantioselettività con substrati analoghi al diestere precedentemente descritto in Figura 1.5. Mediante uno studio bibliografico sono, quindi, stati individuati alcuni enzimi ed microrganismi già utilizzati per la risoluzione racemica di strutture analoghe a quella di interesse.

La lipasi di *Aspergillus niger* (ANL) commercialmente disponibile (Amano) come estratto grezzo è stato utilizzato per la risoluzione racemica dell'estere metilico dell'acido pipecolico (Figura 1.6), con un $E=20\pm4$ in favore dell'enantiomero (S). La sostituzione del gruppo estere con *n*-pentile o *n*-octile non ha determinato un incremento della selettività, mentre l'aggiunta di un'acetilazione all'N ha notevolmente ridotto la selettività. La purificazione dell'enzima dall'estratto grezzo ha infine determinato un aumento della selettività ($E>100$)¹³.

Figura 1.6
Risoluzione di esteri dell'acido pipecolico mediata dalla lipasi di *A. niger* (ANL). Immagine adattata da Ng-Youn-Chen *et al.* 1994¹³.



Analogamente utilizzando sempre lo stesso enzima è stata condotta una risoluzione racemica del sintone 1 Figura 1.7, con un eccesso enantiomerico (e.e.)>98% in favore del prodotto con configurazione assoluta (2R,6S) al fine di sintetizzare, mediante successivi passaggi chimici, il derivato acido cis-6-idrossimetilpipecolico¹⁴.

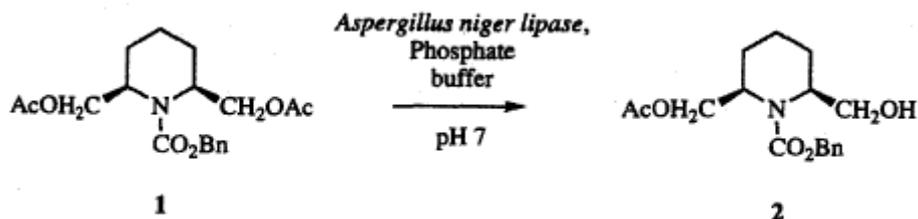
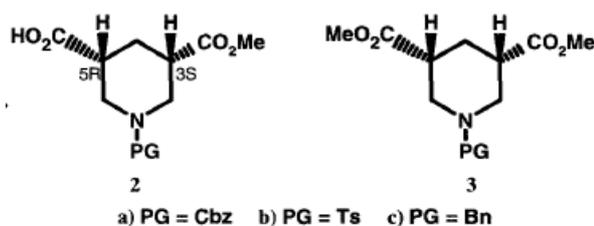


Figura 1.7

Risoluzione enzimatica mediata dalla ANL, step che precede la preparazione dell'acido cis-6-idrossimetilpiperidico. Immagine adattata da Couty 1999¹⁴.

Uno studio su substrati analoghi è stato condotto anche da Danieli *et al.*¹⁵ utilizzando rispettivamente la lipasi commerciale di *Candida cylindracea* (CCL), l'esterasi di fegato di maiale (*porcine liver esterase*, PLE) e la lipasi pancreatica di maiale (*porcine pancreatic lipase*, PPL).



Substrate	Enzyme	Reaction time (h)	Product, %	% e.e.
3a	PLE ^a	1	2a , 28	44
		6	96	27
	CCL ^b	6	20	78 ^c
		20	58	57
		12	5	-
3b	PLE ^a	1	2b , 31	14
		6	88	11
3c	PLE ^a	1	2c , 16	55
		4	33	34
	CCL ^b	6	25	80 ^d
		20	61	47
		1	14	-
		7	28	12

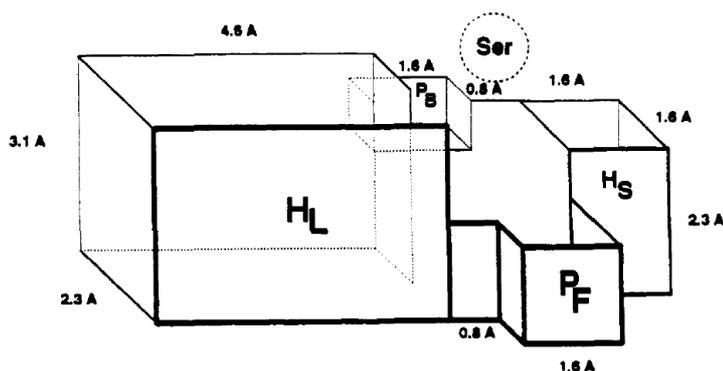
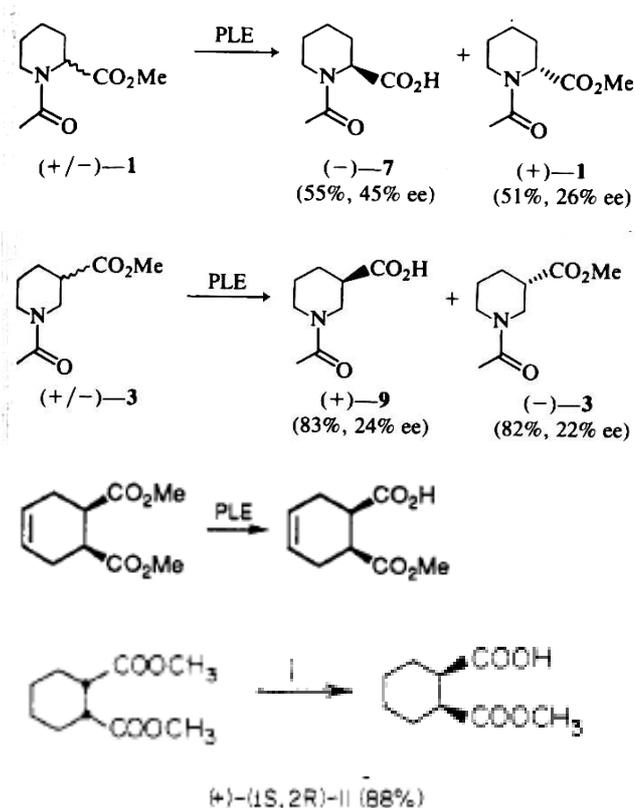
Tabella 1.1

Risultati della risoluzione racemica effettuata utilizzando rispettivamente la *Candida cylindracea* lipase (CCL), la *pig liver esterase* (PLE) e la *porcine pancreatic lipase* (PPL) con il substrato 3 variamente protetto. Immagine tratta e modificata da Danieli *et al.* 1996¹⁵.

Il livello di selettività ottenuto è in tutti i casi relativamente contenuto, sia variando il tipo di enzima utilizzato che il gruppo protettivo dell'azoto piperidinico (Tabella 1.1).

Tra questi enzimi la PLE è stata anche intensamente studiata con tutta una serie di altri substrati che hanno permesso di ipotizzare le dimensioni del sito catalitico e di definire a priori la selettività rispetto a nuovi substrati. Tra i substrati analizzati rientrano anche diesteri del cicloesano, del cicloesene e monesteri della piperidina acetilata¹⁶⁻²⁰ (Figura 1.8).

Figura 1.8
Alcune delle reazioni di risoluzione racemica catalizzate dalla PLE, con relativi valori di e.e. e un modello del sito attivo dell'enzima, con evidenziate le dimensioni ed il residuo di serina responsabile dell'idrolisi. Immagini adattate e modificate¹⁶⁻²⁰



Una serie di lavori più recenti, svolti sulla lipasi di *Candida antarctica* di tipo A e B (CAL-A e CAL-B), hanno dimostrato l'abilità di questi due enzimi di determinare la risoluzione di miscele racemiche di derivati esteri dell'acido 1-

pipecolico, mediante selettiva acetilazione dell'azoto pipecolico o sostituzione selettiva del gruppo estere in presenza di opportuni solventi²¹ (Figura 1.9).

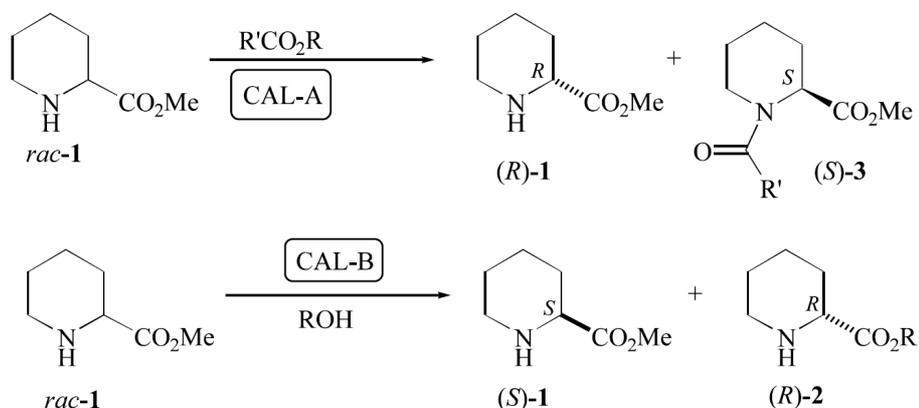


Figura 1.9

Risoluzione racemica dell'estere metil-pipecolico mediata dalla lipasi di *Candida antartica* A (CAL-A) e *Candida antartica* B (CAL-B). Immagine adattata da Liljeblad *et al.* 2002²¹.

La CAL-B rappresenta attualmente uno dei più promettenti enzimi utilizzabili per la risoluzione e la sintesi di molecole enantiomericamente pure. Essa è stata utilizzata anche nella preparazione di acido-N-Boc-3,5-carbossipiperidinico, in forma enantiomericamente pura come mostrato in Figura 1.10.

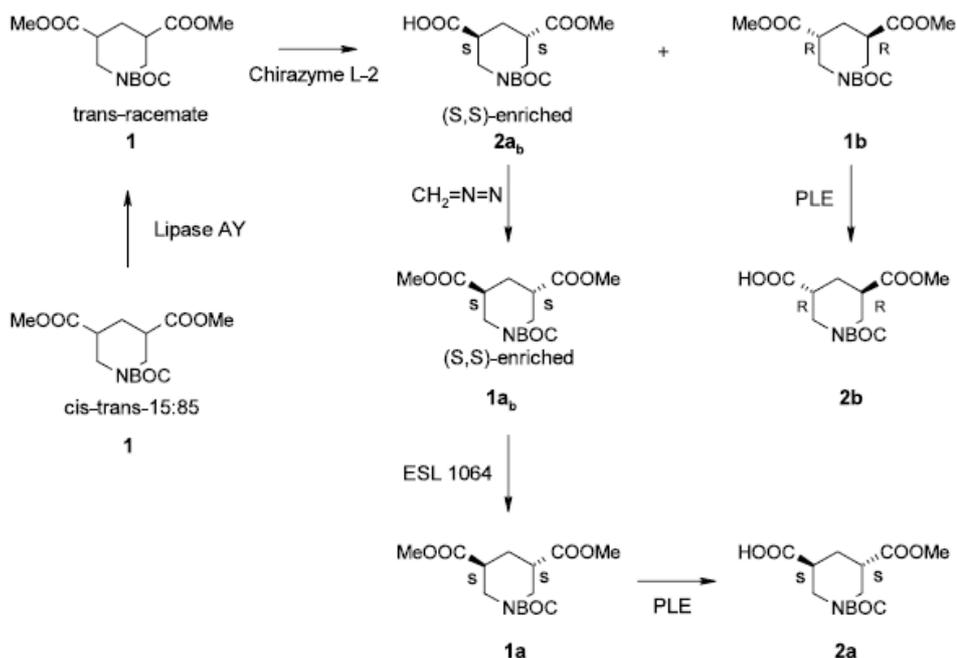


Figura 1.10

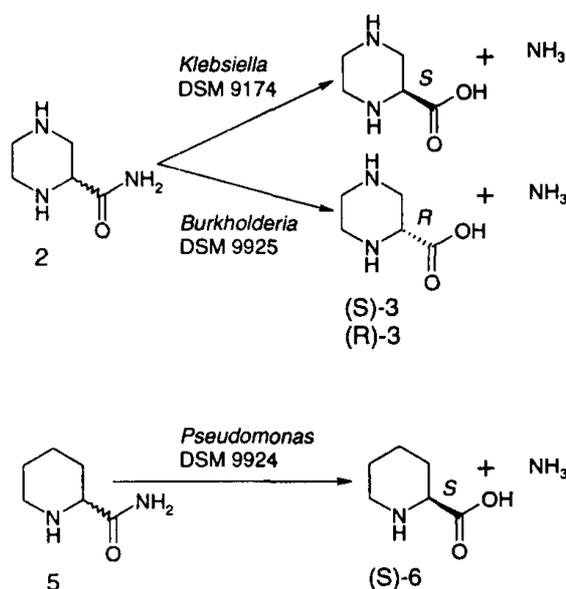
Preparazione di entrambi i monometil-esteri 2a e 2b dalla miscela racemica di esteri *cis/trans* 1 mediante il consecutivo utilizzo di diversi enzimi idrolitici, tra cui la CALB (Chirazyme L-2) e la PLE. Immagine tratta da Iding *et al.* 2003²².

In questo lavoro²² una serie di enzimi tra cui, la CALB (chiamata Chirazyme L-2), la PLE e una lipasi di *Candida rugosa* (Lipasi AY), vengono utilizzate in serie al fine di preparare acidi dicarbossilici della piperidina con una particolare configurazione enantiomerica.

Come molte esterasi e lipasi dimostrano di possedere stereoselettività, anche diverse amidasi si sono dimostrate ugualmente interessanti al fine di determinare la risoluzione racemica di relative miscele ammidiche. Non di meno questi enzimi catalizzano anche reazioni di trasferimento ammidico, acido o di esteri, così come la relativa idrolisi di esteri, anche se la velocità di reazione con acidi o esteri come donatori acilici è molto più lenta rispetto a quella ottenuta con ammidi come donatori acilici. Un esempio è rappresentato dalla amidasi estratta da *Citrus sinensis* che ha dimostrato la capacità di idrolizzare selettivamente amidi C-terminali di peptidi o di singoli L-amminoacidi²³.

Diversi ceppi cellulari sono stati invece studiate nel lavoro di Eichhorn *et al.* 1997²⁴, che ne ha individuato le relative attività amidasiche nei confronti di substrati racemi (Figura 1.11).

Figura 1.11
Selettiva attività
ammidasica esercitata da
diversi microrganismi su
monoammidi dell'anello
piperazinico e
piperidinico. Immagine
adattata da Eichhorn *et al.*
1997²⁴.



In particolare, le cellule di *Klebsiella terrigena* DSM 9174 sono state utilizzate per preparare l'acido 2(S)-piperazina, mentre l'enantiomero opposto è stato ottenuto mediante cellule di *Burkholderia sp.* DSM 9925, partendo in

entrambi i casi da una racemato di 2(R,S)-amide-piperazina, sempre con e.e.>99%. Usando invece il ceppo di *Pseudomonas fluorescens* DSM 9924, la miscela racemica della 2(R,S)-piperidina-carbossilammide è stata risolta in favore dell'enantiomero S, sempre con elevati e.e. (99%).

Un'amidasi di *Pseudomonas sp.* MCI3434, espressa in forma ricombinante in *E.coli* purificata e caratterizzata è stata utilizzata nel lavoro di Komeda *et al.* 2004²⁵, dove si è dimostrata la sua capacità di idrolizzare R-selettivamente una miscela racemica di 2-*tert*-butilcarbossammide piperazina ed altri substrati come descritto in Figura 1.12.

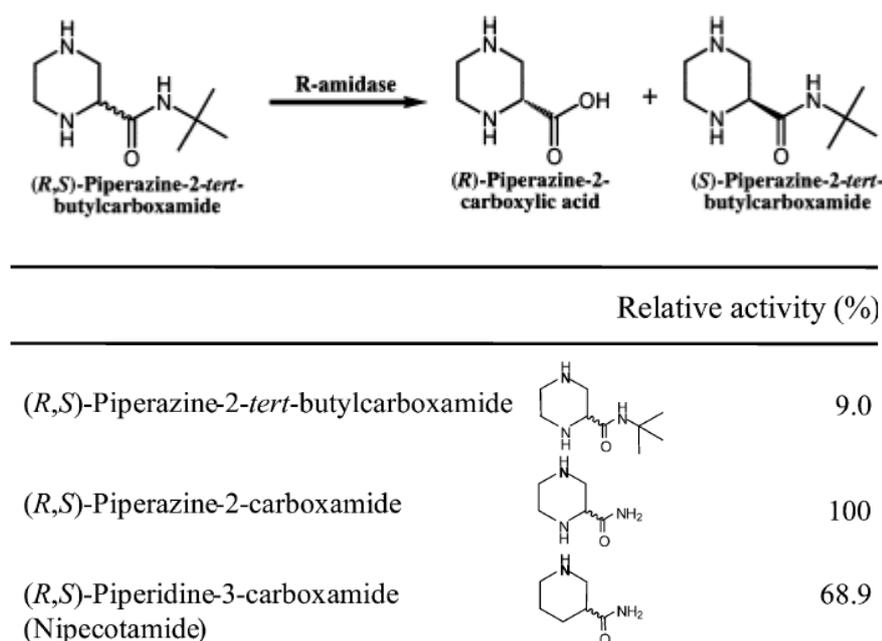


Figura 1.12
Selettività R specifica dell'amidasi di *Pseudomonas sp.* MCI3434 nei confronti di diversi substrati. Immagine adattata da Komeda *et al.* 2004²⁵.

Sempre lo stesso gruppo²⁶ ha poi individuato una seconda amidasi in *Pseudomonas azotoformans* IAM 1603, con selettività opposta, anche in questo caso espressa in forma ricombinante in *E. coli* e testata con una serie di substrati, tra cui ancora la (R,S) 2-*tert*-butilcarbossammide piperazina e la (R,S) 2-carbossammide piperidina, dimostrando in ambedue i casi selettività S (Figura 1.13).

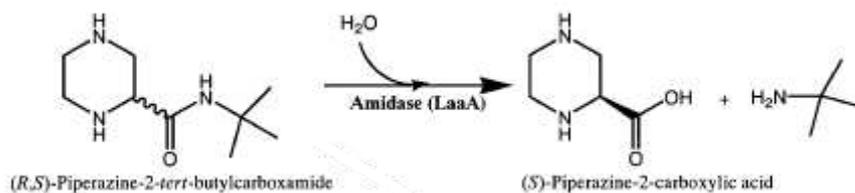


Figura 1.13

Selettività R specifica dell'amidasi di *Pseudomonas azotoformans* IAM 1603 nei confronti della (R,S) 2-*tert*-butilcarbossammide piperazina. Immagine adattata da Komeda *et al.* 2004²⁶.

Infine è nota e spesso utilizzata la selettività di molte proteasi, che naturalmente si sono evolute per riconoscere gli L-amminiacidi, per idrolizzare selettivamente miscele racemiche di esteri mediante idrolisi selettiva. Una *review* di Miyazawa 1998²⁷ descrive una serie di soluzioni che sono comunemente adottate per la sintesi chimica di amminoacidi o strutture analoghe. Tra questi, la Subtilisina Carlsberg, una serina proteasi, è stata oggetto di *screening* con diversi substrati.

1.2 Scopo del progetto

L'individuazione di una nuova via sintetica per la preparazione della Moxifloxacin mediante un passaggio biocatalitico rappresenterebbe un'interessante alternativa, dal punto di vista ambientale, energetico e quindi economico, all'attuale processo di sintesi.

Sono stati dunque proposti una serie di steps alternativi, per la preparazione del sintone (S,S)-2,8-diazabicyclononano, che prevedono la risoluzione racemica di esteri mediata da un enzima, che deve essere individuato. Sono quindi stati identificati, in letteratura, una serie di enzimi o microrganismiche hanno dimostrato attività enantioselettiva con substrati analoghi. Tra questi, evitando di utilizzare microrganismi interi, data la sensibilità del prodotto da ottenere, e l'espressione di enzimi in forma ricombinante, motivato da un basso rapporto vantaggio/rischio, è stato deciso di selezionare gli enzimi commercialmente disponibili e di testarli con due tipi substrati, rispettivamente la miscela racemica rappresentata dal diestere metilico e dal diestere etilico dell'acido (*cis*) 2,3-dicarbossipiperidinico (Figura 1.14).

Gli enzimi utilizzati sono di seguito elencati: lipasi di *Aspergillus niger* (ANL), lipasi di *Candida antarctica* tipo A (CALA) e tipo B (CALB), lipasi di *Candida cylindracea* (CCL), lipasi pancreatica di maiale (PPL), esterasi di fegato di maiale (PLE), la proteasi Subtilisina Carlsberg (SUB) e l'amidasi di *Citrus sinensis* (CSA).

In base ai risultati ottenuti dallo *screening* potrà essere valutata la modifica dei substrati utilizzati, l'utilizzo di enzimi mutagenizzati o l'espressione di enzimi non commercialmente disponibili in forma ricombinante, così come l'utilizzo di microrganismi interi. Si procederà dunque per passaggi successivi, iniziando da quelli più semplici ed economici a quelli più complessi e dispendiosi.

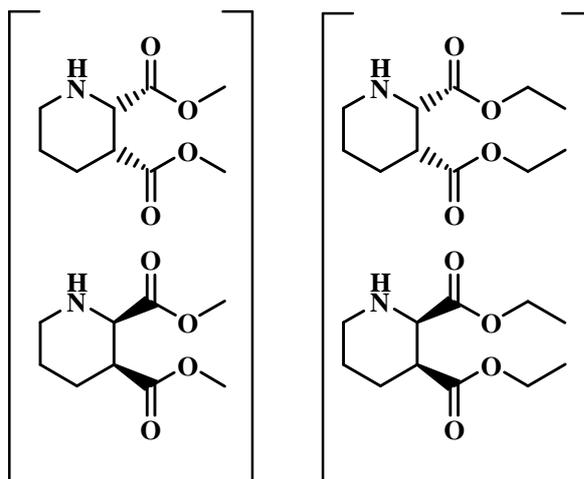


Figura 1.14

Iniziali miscele racemiche oggetto di *screening* enzimatico in questo studio: diestere metilico, a destra ed etilico, a sinistra, dell'acido (*cis*) 2,3-dicarbossipiperidinico.

1.3 Risultati

1.3.1 Studio degli enzimi

Come descritto nella parte introduttiva (paragrafo 1.1.5), una serie di enzimi sono stati individuati mediante ricerca bibliografica. Alcuni di questi, commercialmente disponibili ed economicamente accessibili, sono stati acquistati ed oggetto di *screening* nei confronti dei substrati diestere metilico e diestere etilico dell'acido-(*cis*)-2,3-dicarbossipiperidinico (Figura 1.14).

Innanzitutto è stato valutata, mediante analisi SDS-PAGE, il livello di purezza di ciascun enzima (Figura 1.15). A parte alcuni casi, come per la CALB e la SUB, il cui livello di purezza appare elevato, gli altri enzimi sono contenuti all'interno di un estratto cellulare grezzo o poco purificato e rappresentano spesso solo una modesta parte dell'intero contenuto proteico del preparato.

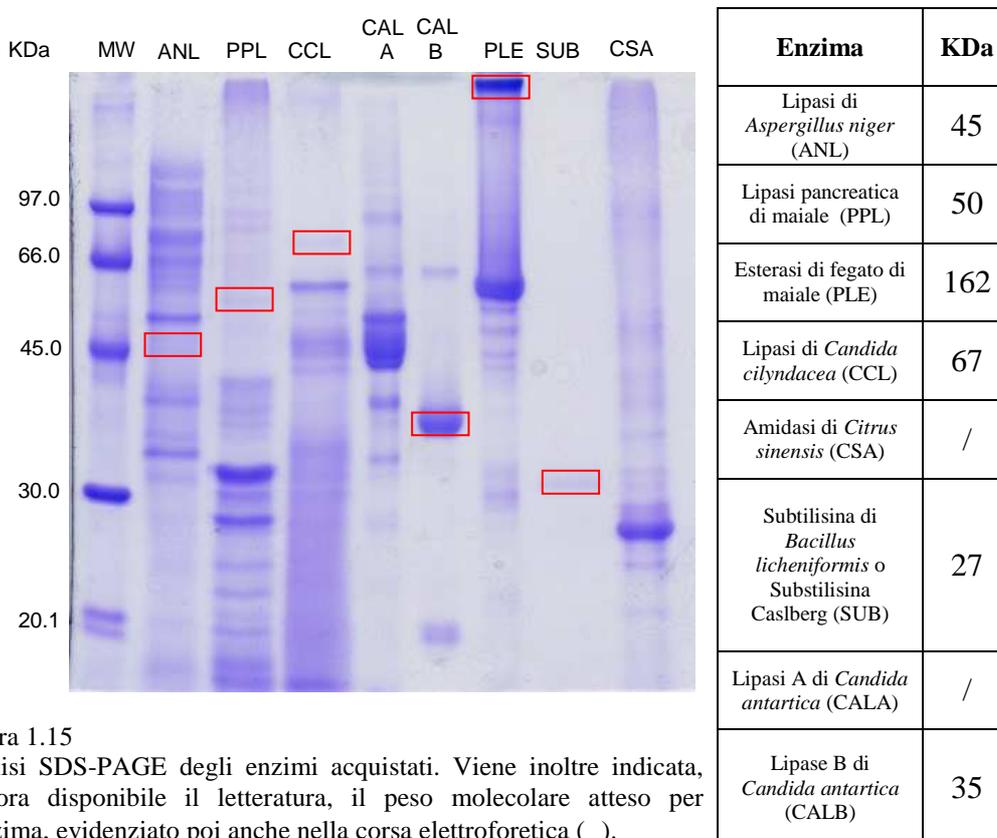


Figura 1.15
Analisi SDS-PAGE degli enzimi acquistati. Viene inoltre indicata, qualora disponibile in letteratura, il peso molecolare atteso per l'enzima, evidenziato poi anche nella corsa elettroforetica ().

Un primo approccio al loro utilizzo, è stato quello di normalizzare la relativa attività idrolitica nei confronti di un singolo substrato di riferimento, poiché dai fornitori, venivano date indicazioni sull'attività enzimatica utilizzando substrati molto diversi tra loro, rendendo difficile confrontare tra loro i vari enzimi e valutare la quantità di enzima da utilizzare nello screening successivo. Riferendosi, dunque, al lavoro di Ny-Youn-Chen *et al.* 1994¹³ è stato individuato un substrato standard per stimare in modo semplice l'attività idrolitica di un enzima.

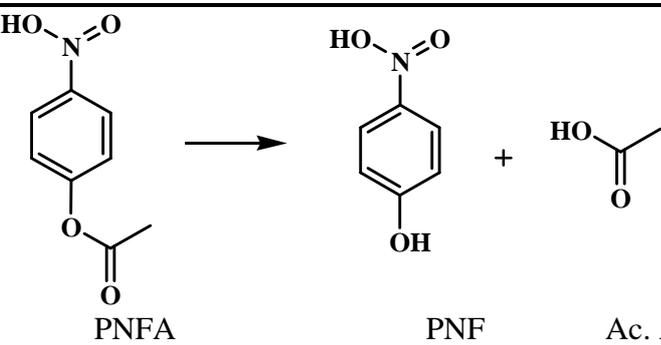
			
Enzima	Substrato	Attività Specifica	Attività specifica con PNPA
Lipasi di <i>Aspergillus niger</i> (ANL)	Acido acetico Trioleina	200 U/g 4 U/g	10,27 U/mg
Lipasi pancreatica di maiale (PPL)	Olio di oliva	27,4 U/mg	2,39 U/mg
Esterasi di fegato di maiale (PLE)	Etil-valerate	> 130 U/mg	28,2 U/mg
Lipasi di <i>Candida cilyndacea</i> (CCL)	Trioleina	15-25 U/mg	131,3 U/mg
Amidasi di <i>Citrus sinensis</i> (CSA)	Z-gly-tyr-NH2	2 U/ml	0,33 U/ul
Subtilisina di <i>Bacillus licheniformis</i> o Substilisina Caslberg (SUB)	Caseina	12 U/mg	8,78 U/mg
Lipasi A di <i>Candida antartica</i> (CALA)	Tributirina	30 U/mg	7,25 U/mg
Lipase B di <i>Candida antartica</i> (CALB)	Tributirina	34 U/mg	9,83 U/mg

Tabella 1.2

Schema riassuntivo degli enzimi utilizzati nello *screening* con i relativi valori di attività specifica dichiarati dai fornitori e normalizzati mediante il substrato standard *p*-nitrofenilacetato (PNFA), che idrolizzato genera acido acetico e *p*-nitrofenolo (PNF).

Il *p*-nitrofenilacetato (PNFA) in soluzione acquosa, se analizzato mediante spettrometria UV-vis., non assorba a 404 nm; tuttavia quando idrolizzato in acido acetico e *p*-nitrofenolo (PNF), quest'ultimo specie mostra un particolare picco di assorbimento a quella lunghezza d'onda ($\epsilon_{404}=11600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). L'incremento d'assorbimento a 404 nm può dunque essere utilizzata per valutare l'attività enzimatica nei confronti del PNFA.

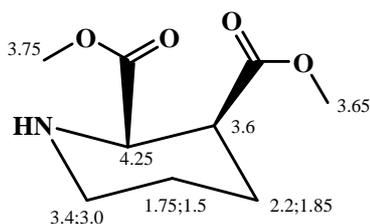
Per ciascun enzima è riportato in Tabella 1.2, i valori di attività specifica come dichiarati dal fornitore e normalizzati poi con il substrato PNFA.

1.3.2 Studio dei substrati

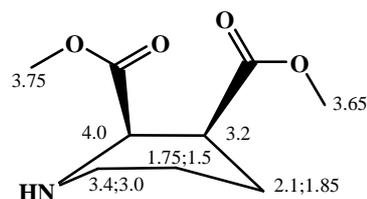
I diesteri metilici ed etilici dell'acido 2,3-carbossipiperidinico non assorbono significativamente nella regione UV/visibile. La loro eventuale idrolisi mediante enzimi, se valutata mediante HPLC associata ad Uv/vis., diventerebbe assai complessa dal momento che le proteine assorbono nel *range* di lunghezza d'onda compreso tra 210-280nm, così come molti composti in cui gli enzimi vengono conservanti. Il fatto poi di non disporre dei relativi esteri mono- o di-idrolizzati, non ci permette di valutare con sufficiente sicurezza l'eventuale idrolisi da parte di un enzima durante lo *screening*.

È stato dunque optato per un sistema analitico più informativo, $^1\text{H-NMR}$ che consente non solo di osservare obiettivamente l'eventuale idrolisi delle specie indagate, ma anche di valutare quantitativamente il livello di trasformazione. Le due specie "substrato" sono dunque state inizialmente caratterizzate mediante $^1\text{H-NMR}$ monodimensionale, COSY e TOCSY al fine di associare i picchi osservati a ciascun protone delle molecole. Gli spettri effettuati per le due specie e la relativa assegnazione protonica sono riassunte in Figura 1.16 e Figura 1.17.

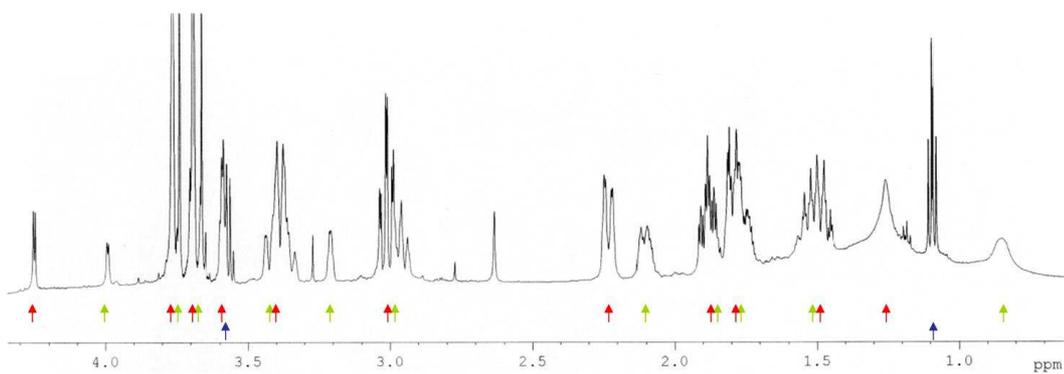
a)



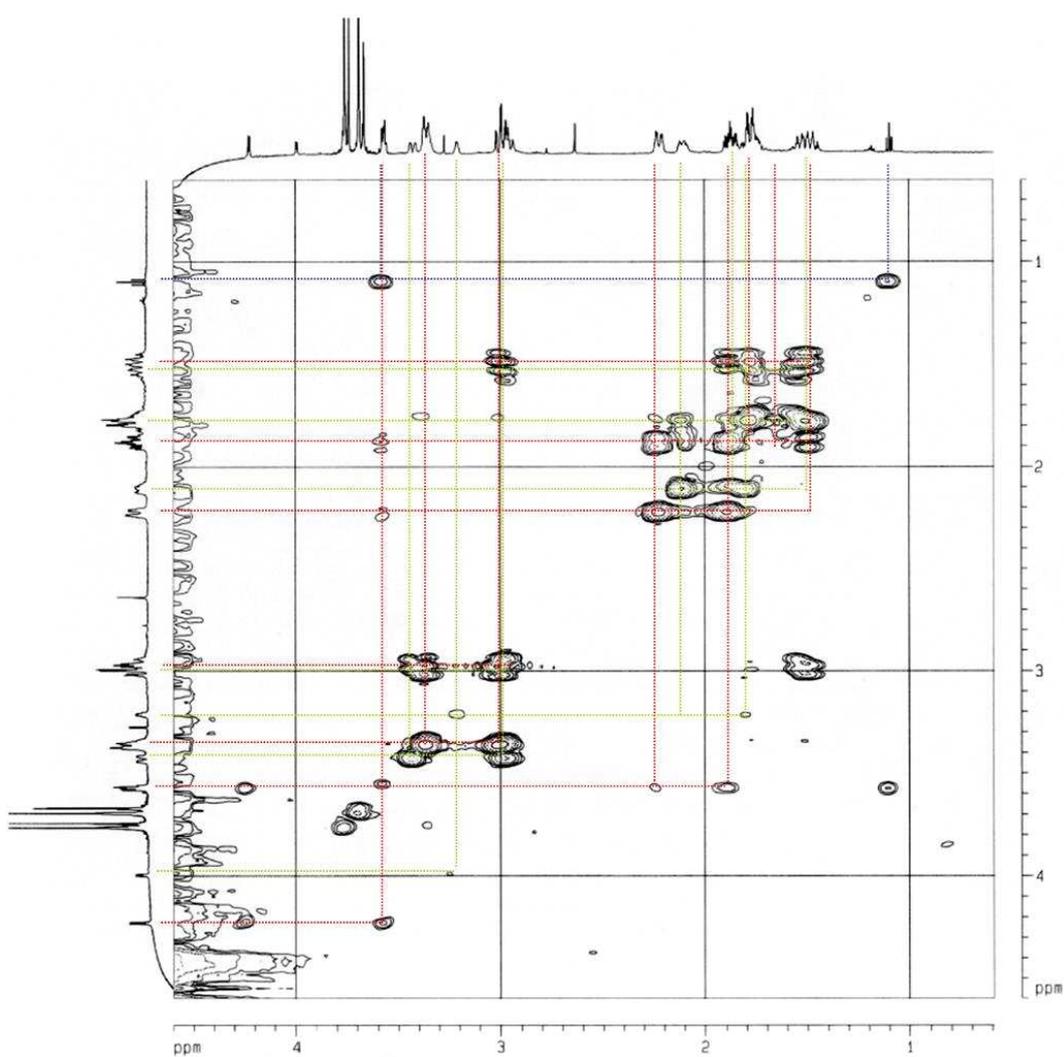
b)



c)



d)



e)

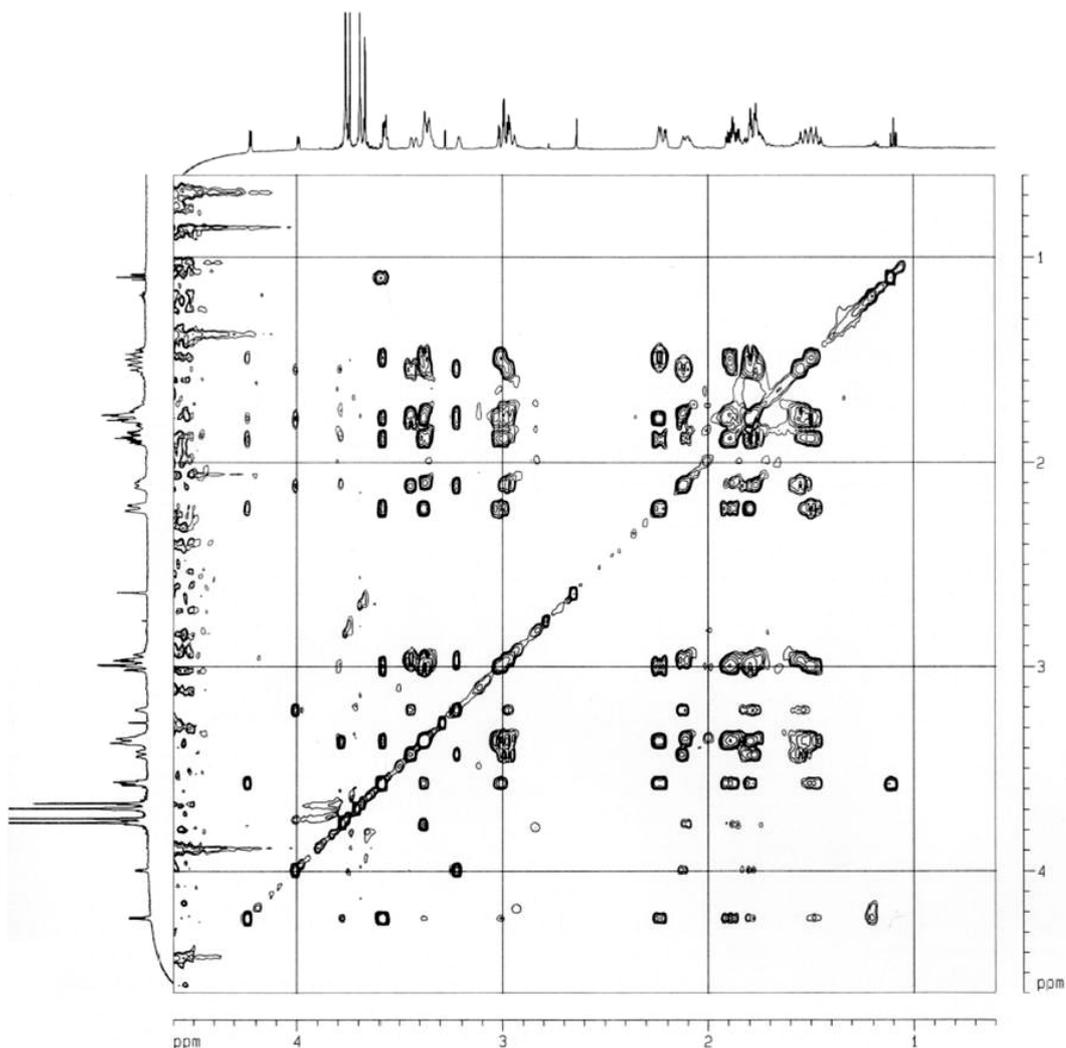
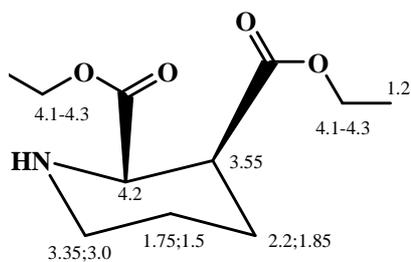


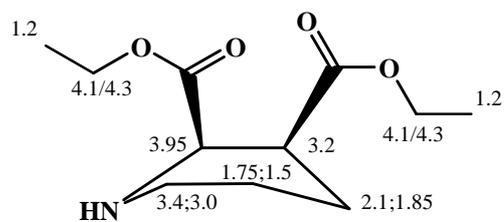
Figura 1.16

Assegnazione protonica dei picchi relativi alla specie racemica diastere (*cis*) 2,3-carbossidipiperidina, di una soluzione acquosa 20 mM assegnata mediante interpretazione del relativo spettro $^1\text{H-NMR}$ monodimensionale (c), COSY (d) e TOCSY (e). La specie si presenta in due distinte popolazioni, probabilmente con l'anello piperidinico con conformazione a sedia (a) ed a barca (b). L'assegnazione dei picchi, evidenziati in rosso ed in verde, ad una o all'altra configurazione è solo indicativa. Sono presenti anche tracce di etanolo (in blu).

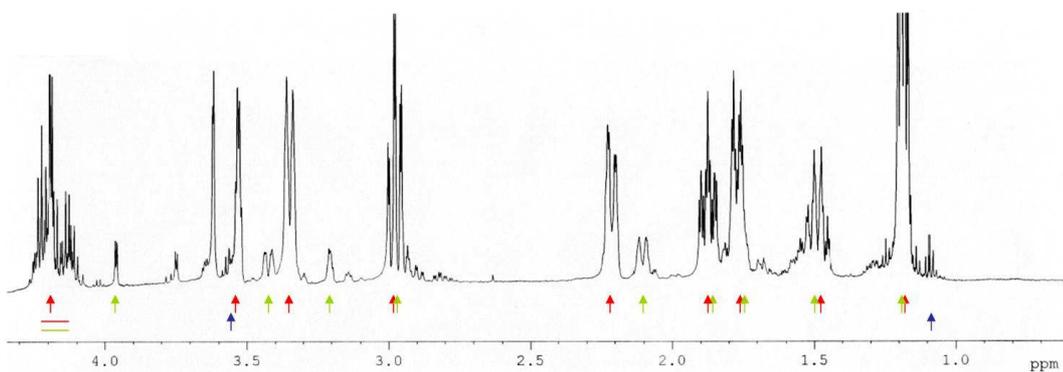
a)



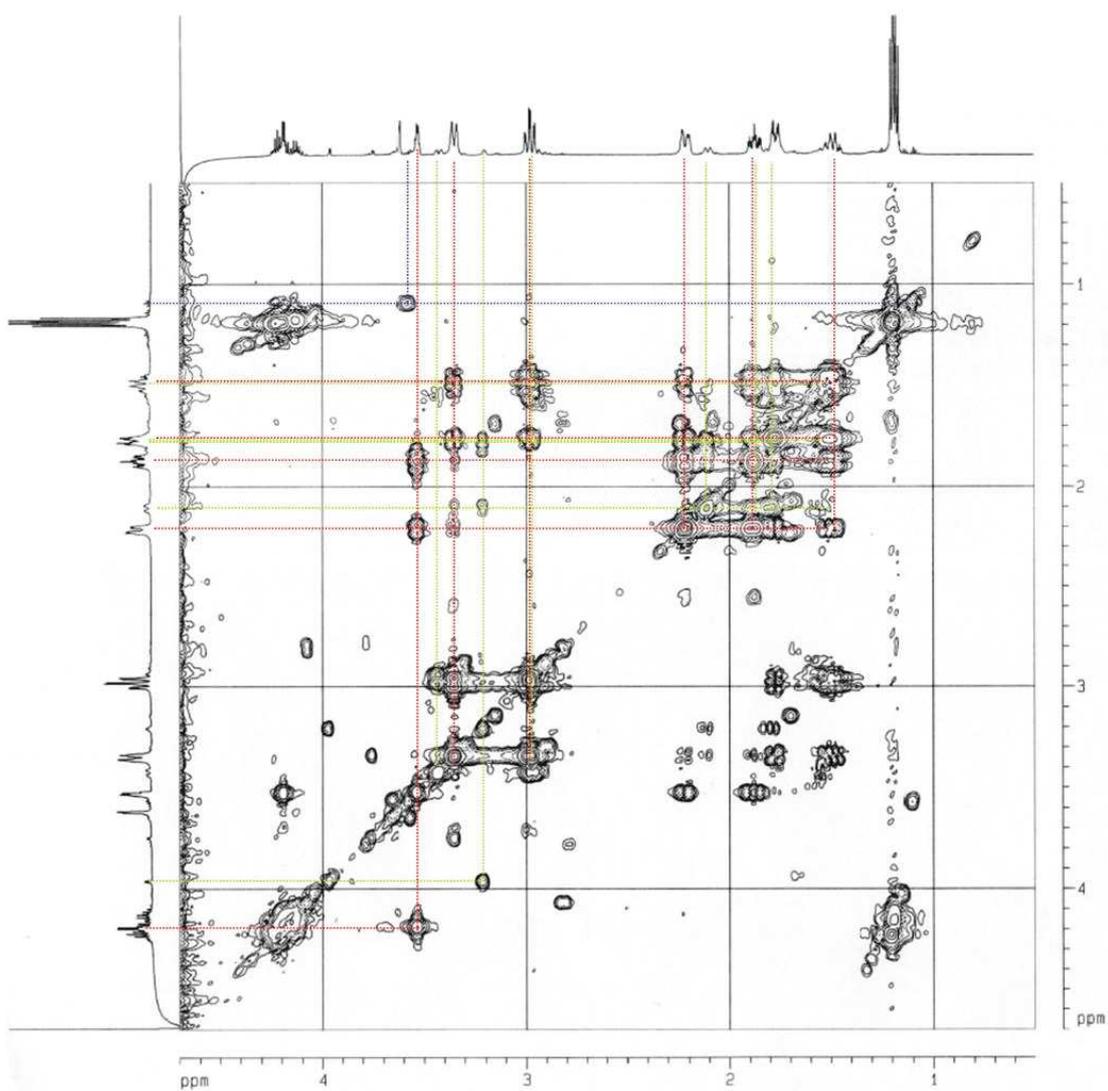
b)



c)



d)



e)

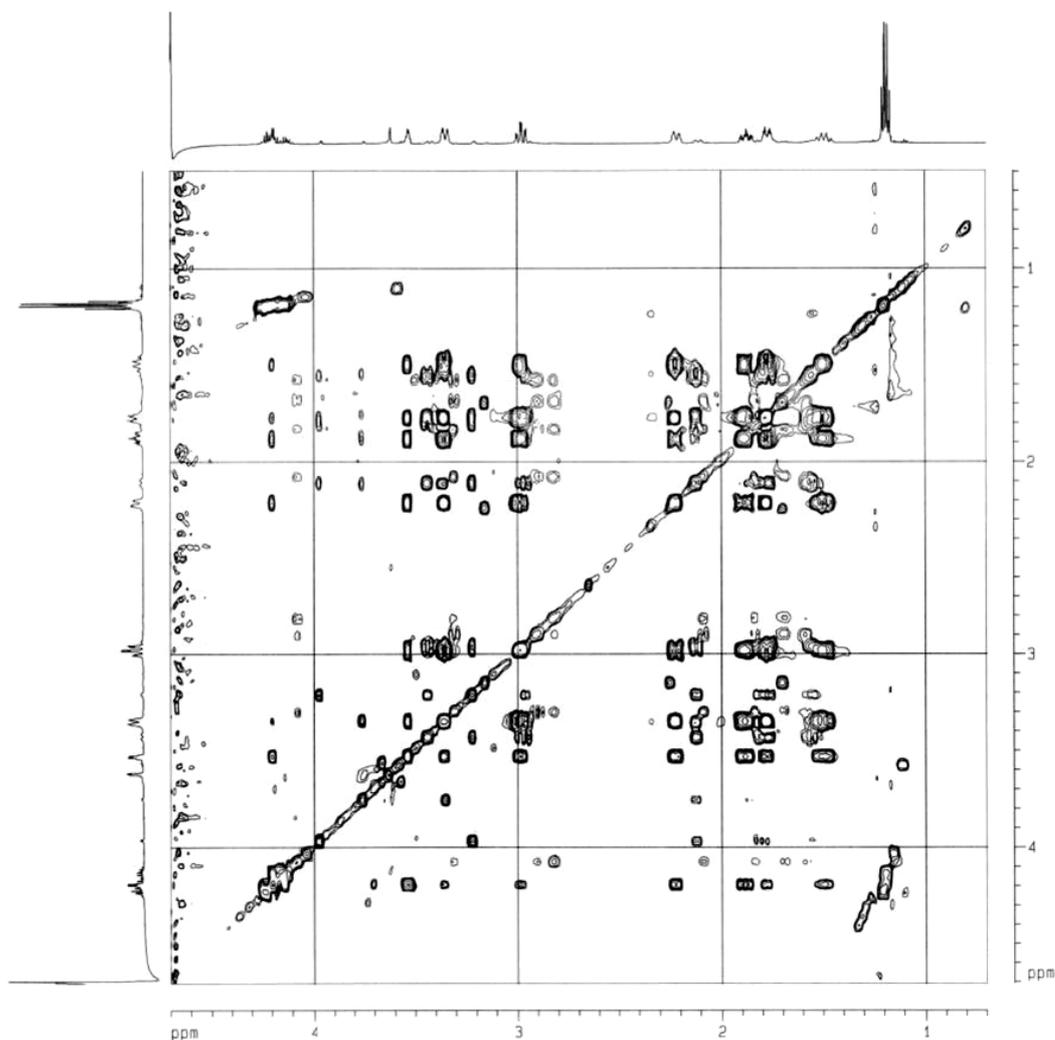


Figura 1.17

Assegnazione protonica dei picchi relativi alla specie racemica diastere 2,3 (*cis*)-etil-piperidina, di una soluzione acquosa 20 mM assegnata mediante interpretazione del relativo spettro $^1\text{H-NMR}$ monodimensionale (c), COSY (d) e TOCSY (e). Anche in questo caso la specie si presenta in due distinte popolazioni, probabilmente con l'anello piperidinico in conformazione a sedia (a) ed a barca (b). L'assegnazione dei picchi, evidenziati in rosso ed in verde, ad una o all'altra configurazione è solo indicativa. Sono presenti anche tracce di etanolo (in blu).

Lo studio condotto mediante risonanza magnetica protonica ha permesso di evidenziare la presenza di due distinte popolazioni molecolari, molto probabilmente associate alle due conformazioni possibili dell'anello piperidinico, a sedia e a barca, diversamente popolate in base alla relativa stabilità. Sono comunque chiaramente osservabili, in entrambe le forme, i protoni associabili agli esteri, metilico ed etilico, sia i protoni associati al C_1 che quello al C_2 dell'anello piperidinico, indispensabili per valutare un'eventuale idrolisi al relativo gruppo

estere, così come è facilmente identificabile l'eventuale formazione rispettivamente di metanolo ed etanolo.

1.3.3 Preliminare screening enzimatico

Un preliminare *screening* enzimatico è stato condotto sulle due miscele racemiche in tampone fosfato 100 mM pH 6, utilizzando le specie substrato a concentrazione variabile tra 2-20 mM e gli enzimi a diverse concentrazioni, in base alla loro attività precedentemente determinata con PNFA e le quantità utilizzate nei diversi lavori bibliografici dove sono state individuate (ANL, 1mg/ml; PPL, 1mg/ml; PLE, 0.1mg/ml; CCL 0.1 mg/ml, CSA 1µl/ml; SUB, 0.1 mg/ml; CALA, 2 mg/ml; CALB, 2mg/ml)

La soluzione è stata quindi oggetto di analisi ¹H-NMR monodimensionale, dopo tre giorni di reazione e dopo aver eliminato parte del contenuto proteico mediante Vivaspin 500 (Sartorius®, *Cut-off* 3 KDa). Le quantità di enzima utilizzato, rispetto alla quantità di substrato, così come il tempo di reazione sono state volutamente elevati al fine di garantire, qualora la reazione avvenisse, di osservare il campione a fine reazione. Se la trasformazione fosse avvenuta con enantioselettività, uno dei due enantiomeri sarebbe stato idrolizzato generando il relativo acido mono o dicarbossipiperidinico e determinando la formazione di metanolo, nel caso dell'estere metilico, o etanolo, nel caso di quello etilico.

Nell'analisi ¹H-NMR si dovrebbe dunque osservare, oltre formazione dei picchi corrispondenti al metanolo o all'etanolo, la formazione di nuovi picchi corrispondenti alla forma mono- o di carbossilica, associabili alla specie idrolizzata, così come il dimezzamento dell'area dei picchi corrispondenti al substrato, di cui resterebbe un solo enantiomero, quindi quantitativamente la metà del substrato iniziale.

Tuttavia nell'analisi delle varie preparazioni non è stata osservata alcuna sostanziale differenza tra lo spettro del substrato iniziale rispetto a quello trattato con i vari enzimi, a meno di un unico caso, cioè quando veniva utilizzata l'esterasi di fegato di maiale (PLE). In Figura 1.18 è mostrato il confronto tra lo spettro monodimensionale del substrato diestere metilico e lo spettro dopo il trattamento con la PLE.

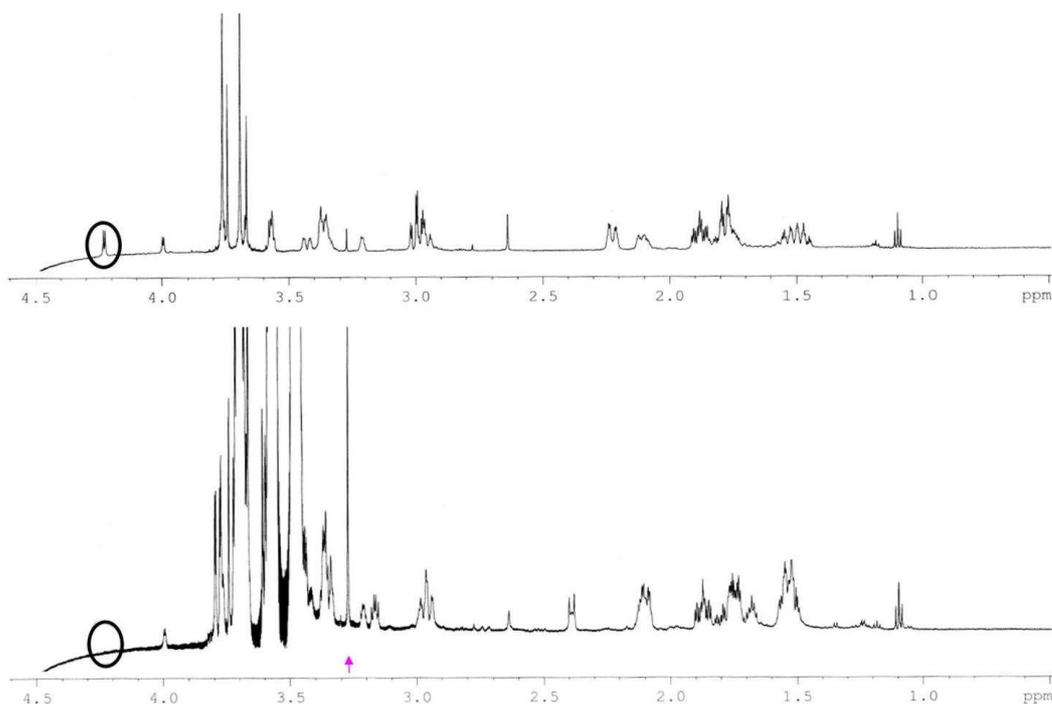


Figura 1.18

Confronto tra lo spettro monodimensionale $^1\text{H-NMR}$ della miscela racemica del diestere metilico prima, sopra, e dopo, sotto, il trattamento con l'enzima PLE. Si osserva chiaramente la formazione di metanolo (\blacktriangle) a ~ 3.25 ppm, così come la scomparsa del picco del protone in C_1 (\circ).

Si può chiaramente osservare la formazione del picco di metanolo a circa 3.25 ppm, ad indicare l'avvenuta idrolisi. Tuttavia si osserva anche la completa scomparsa del picco a ~ 4.25 ppm, corrispondente al protone associato al C_1 dell'anello piperidinico del substrato, in una delle due conformazioni. I picchi che rimangono sono di difficile assegnazione a causa della sovrapposizione con altri segnali protonici di molecole presenti nell'enzima (soprattutto glicerolo, tra 3.4 e 3.8 ppm).

Il picco corrispondente al protone associato C_1 nella seconda conformazione dell'anello piperidinico, a ~ 4.0 ppm, sembra indicare che in questa forma il substrato sia ancora presente. Tuttavia questa possibilità è considerata improbabile in quanto le due forme in cui il substrato si presenta, con l'anello piperidinico a sedia e a barca, dovrebbero essere in equilibrio tra loro e quindi la scomparsa di una forma implica la scomparsa anche dall'altra. È possibile invece che si tratti di un segnale protonico del prodotto idrolizzato, mono o di acido, casualmente posizionato ancora a 4 ppm.

Un risultato analogo è stato ottenuto trattando il substrato etilico con lo stesso enzima PLE. I risultati sono di seguito mostrati (Figura 1.19).

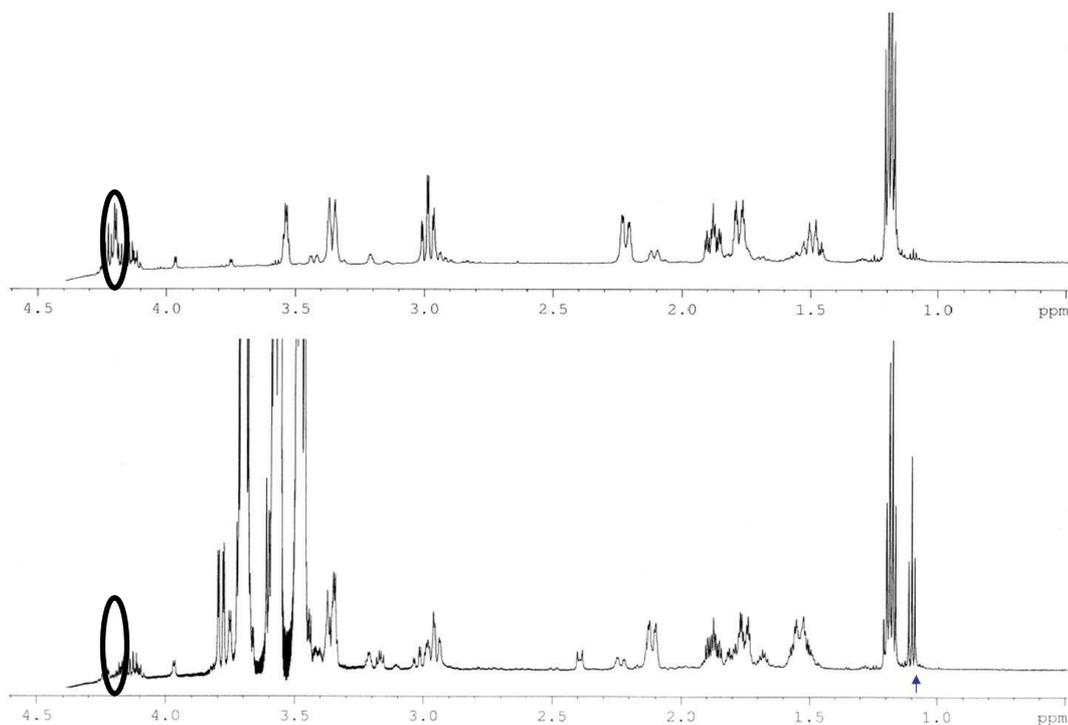


Figura 1.19

Confronto tra lo spettro monodimensionale $^1\text{H-NMR}$ della miscela racemica del diestere etilico prima, sopra, e dopo, sotto, il trattamento con l'enzima PLE. Si osserva chiaramente la formazione di etanolo (\blacktriangle) a ~ 1.1 ppm, così come la scomparsa del picco del protone in C_1 (\circ).

Anche in questo caso l'idrolisi è confermata dalla presenza di uno dei picchi del metanolo a 1.1 ppm, mentre l'altro, a ~ 3.5 ppm, è sovrapposto al segnale del glicerolo. Uno dei due segnali associati al C_1 , quello a 4.2 ppm, scompare dopo il trattamento con l'enzima a indicare la probabile idrolisi completa della miscela racemica; tuttavia anche in questo caso, il secondo picco associato al protone in C_1 con diversa conformazione dell'anelo piperidinico a ~ 3.95 ppm, sembra essere ancora presente dopo il trattamento.

Al fine di interpretare i risultati dello studio NMR, un diverso approccio analitico è stato utilizzato, ripetendo il tutto mediante spettroscopia MS associata ad HPLC. Lo studio è stato quindi ripetuto non solo con i substrati trattati con l'enzima PLE, ma con tutti quelli della libreria, al fine di confermare l'assenza di reattività degli altri enzimi. In Figura 1.20 sono mostrati i risultati ottenuti utilizzando il substrato diestere metilico.

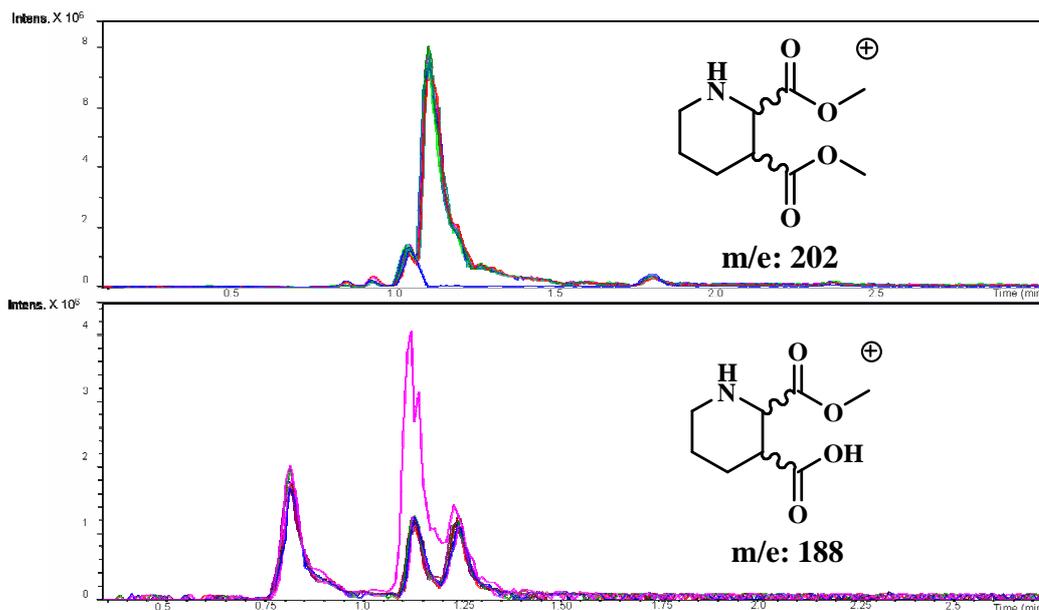


Figura 1.20

Analisi HPLC-MS dei diestere metilico dell'acido 2,3-pipecolico, dopo il trattamento con i diversi enzimi. Sopra profilo di intensità dell'anione m/e 202 corrispondente alla forma ionica del substrato diestere metilico: sono sovrapposti tutti i tracciati utilizzando i vari enzimi, a parte nel caso dell'utilizzo della PLE dove il segnale è praticamente nullo (—). Sotto profilo di intensità dello anione m/e 188 corrispondente alla forma ionica mono estere-metilico. Anche in questo caso i tracciati sono tra loro sovrapponibili a parte nel caso dell'utilizzo della PLE dove il segnale appare più intenso (—).

L'analisi mediante spettroscopia di massa, diversamente da quella magnetica nucleare, ha permesso di individuare i prodotti dell'idrolisi, evitando sovrapposizioni.

Come si osserva in Figura 1.20, l'analisi conferma che nessun enzima, a meno della PLE sembra idrolizzare la miscela racemica del diestere metilico. La PLE sembra invece idrolizzare completamente la miscela iniziale, e sembra dare origine ad unica specie di peso molecolare 187. Non sono stati osservati picchi significativi nel profilo di eluizione con lo ione m/e 174, corrispondente alla forma diacida. Questo indica inequivocabilmente che la PLE idrolizza completamente la miscela racemica a dare solo la forma di monoacido.

L'analisi non consente di individuare in quale posizione l'idrolisi avviene, 2 o 3, o se questa avviene in posizioni diverse per ciascun enantiomero. Tuttavia non sono stati condotti ulteriori studi dal momento che la miscela, completamente idrolizzata, anche se a uno solo dei due gruppi esteri, non consente di separare i due enantiomeri.

1.3.4 Modifica del substrato

Dopo questo iniziale *screening*, una serie di modificazioni sono state apportate sia al substrato che alla miscela di reazione. In particolare è stato testato la reazione in solvente organico (etil-acetato e butil-acetato) utilizzando l'enzima CALB e CALB come descritto in letteratura da Liljeblad *et al.* 2002²¹, oppure sono state apportate delle modifiche al substrato, utilizzando rispettivamente la miscela racemica 6-benzilottaidropirrolo[3,4-b]piridina con gli enzimi ACS, PPL e SUB ed infine il substrato dimetil-1-acetilpiperidin-2,3-dicarbossilato racemo con tutti gli enzimi della libreria. Solo in quest'ultimo caso sono stati ottenute delle parziali idrolisi della miscela racemica da parte dell'enzima CALB e PLE, come dimostra l'analisi HPLC-MS in Figura 1.21.

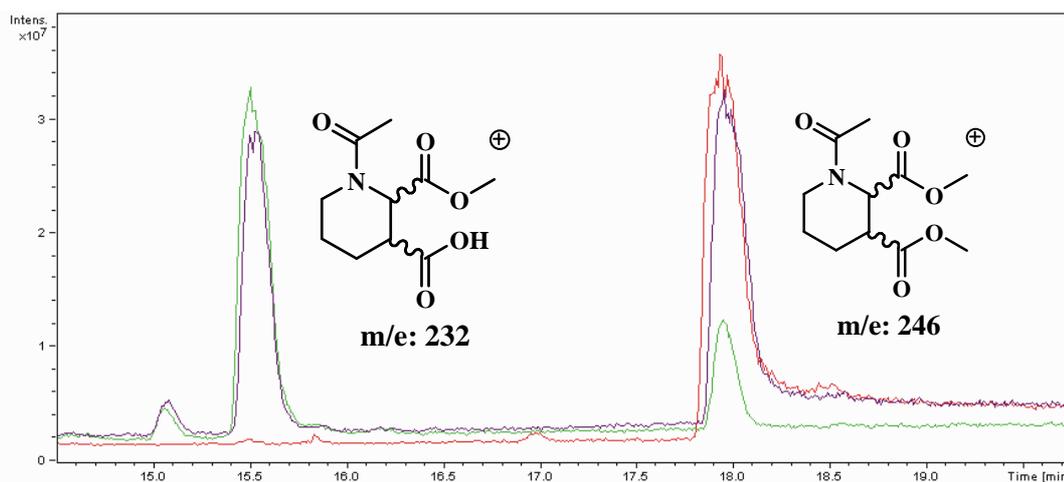


Figura 1.21

Profilo cromatografico di intensità ionica osservato mediante spettroscopia di massa. Substrato dimetil-1-acetilpiperidin-2,3-dicarbossilato 10 mM (m/e 246) prima (—) e dopo il trattamento con la PLE 1mg/ml (—) o con la CALB 1mg/ml (—) a generare il monoestere di m/e 232. Le strutture molecolari sono solo indicative.

Risulta infatti che il substrato racemico dimetil-1-acetilpiperidin-2,3-dicarbossilato di m/e 246, viene parzialmente idrolizzato, a dare la relativa forma monoacida di m/e 232, sia mediante l'enzima CALB che PLE. Non è però chiaro se l'idrolisi avvenga al gruppo estere associato al carbonio in posizione 2 o 3 dell'anello piperidinico e neppure quale delle due forme enantiomeriche sia idrolizzata. Tuttavia, seppure l'analisi non sia quantitativa, appare evidente che, mentre nel caso della PLE l'idrolisi procede quasi completamente, nel caso della CALB essa sembra arrestarsi a generare quantità equimolari di prodotto e

substrato, suggerendo fortemente una idrolisi enantioselettiva. Per questo motivo e per l'elevata disponibilità commerciale dell'enzima CALB rispetto alla PLE, in vista di un impiego industriale, sono stati approfonditi gli studi solo riguardo alla reazione catalizzata dalla CALB.

Grazie al legame N-C tra l'anello piperidinico e il gruppo acetile, è stato possibile ripetere l'analisi mediante HPLC con colonna chiara, osservando le specie chimiche, substrato e prodotti, mediante rilevatore UV/visibile a 210 nm, previa eliminazione della componente proteica tramite ultrafiltrazione (Vivaspin 500, Sartorius). In collaborazione con Fabbrica italiana Sintetici (Alte di Montecchio Maggiore), la reazione è stata condotta in un reattore, a temperatura ambiente con pH controllato (pH 6), effettuata mantenendo le concentrazioni precedentemente utilizzate, con circa 1g di miscela racemica di dimetil-1-acetilpiperidin-2,3-dicarbossilato e 0.1g di CALB. La reazione è stata seguita mediante prelievi successivi per tre giorni.

L'analisi riportata in Figura 1.22, mostra chiaramente come, mediante l'enzima CALB, uno delle due forme enantiomeriche del substrato diestere, in particolare quello con conformazione (2S,3R), sia stato completamente idrolizzato (e.e. 98.4%) dopo circa 71 ore di reazione, mentre l'altro enantiomero, con configurazione (2R,3S) appare rimanere in forma di diestere. L'assegnazione delle configurazioni è stata effettuata mediante trasformazione chimica dei prodotti isolati e successivo confronto con specie di riferimento note. Non è tuttavia ancora chiaro quale delle due funzioni esteree della molecola con configurazione (2S,3R) sia stata oggetto dell'idrolisi.

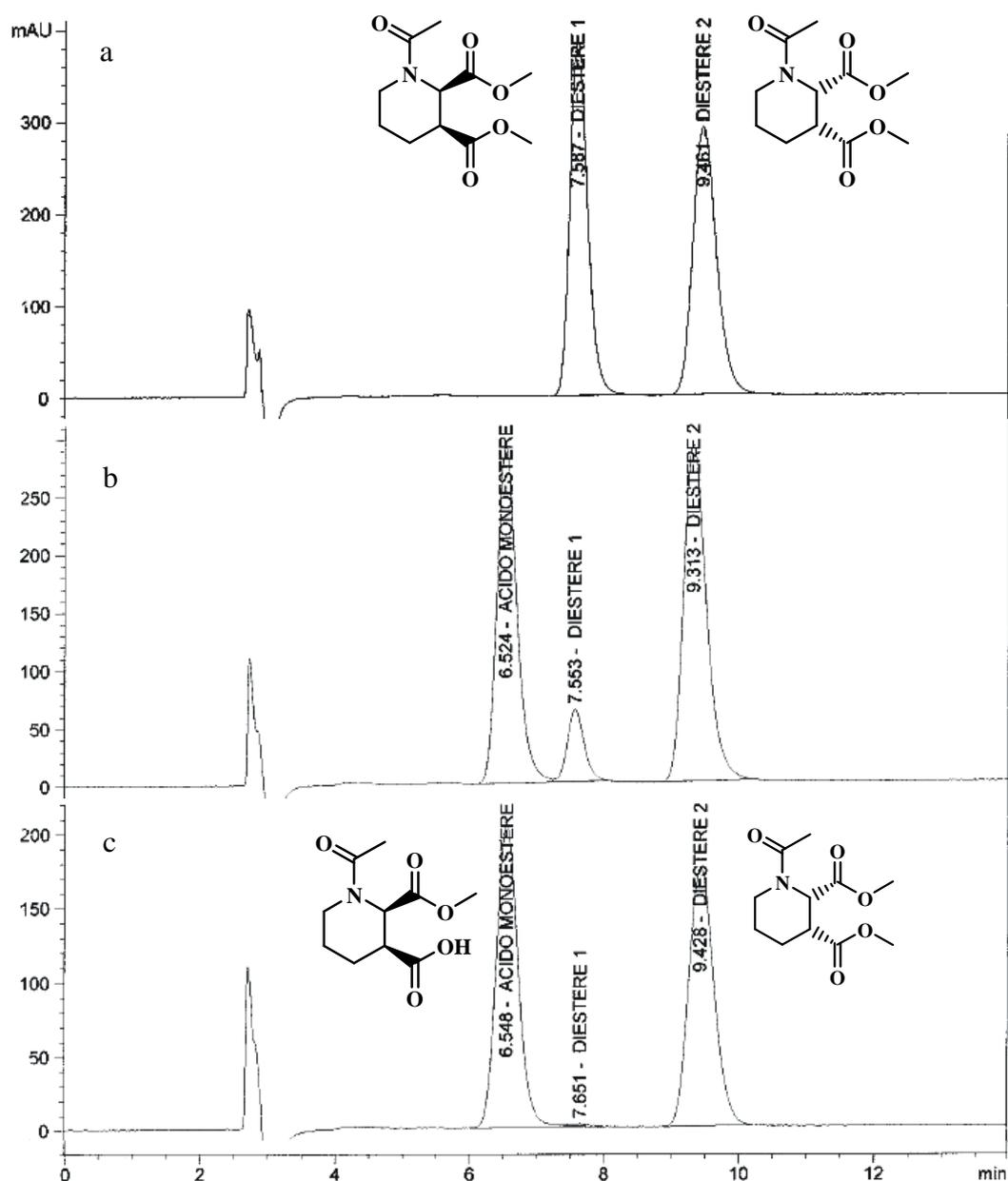


Figura 1.22

Analisi HPLC mediante colonna chirale, del substrato dimetil-1-acetilpiperidin-2,3-dicarbossilato trattato mediante CALB, rispettivamente dopo 0 (a), 47 (b), e 71 ore (c) di reazione. I tempi di ritenzione sono rispettivamente ~9.4 min. per la specie dimetil-1-acetilpiperidin-2R,3S-dicarbossilato, ~7.5 min per la specie dimetil-1-acetilpiperidin-2S,3R-dicarbossilato e ~6.5 min per la specie metil-1-acetilpiperidin-2S,3R-dicarbossilato. Nelle strutture molecolari la posizione di idrolisi è indicativa ai soli fini rappresentativi.

Insieme questa serie di esperimenti confermano in modo inequivocabile come sia stato individuata una combinazione di substrato, il diestere metico acetilato, ed enzima, la CALB, che ha consentito di ottenere la differenziazione chimica dei due enantiomeri. Risulta inoltre che l'idrolisi procede con una particolare

regioselettività, in quanto una sola dei due gruppi esteri viene idrolizzato, generando il corrispondente monoestere.

Al fine di chiarire questo ulteriore aspetto, una serie di esperimenti NMR sono stati condotti, dopo che le condizioni di reazione, così come le concentrazioni di enzima e substrato utilizzabili sono state ottimizzate come descritto nel paragrafo 1.3.5. Ad una miscela di reazione costituita da diestere acetilato 0.8M in tampone fosfato 200 mM pH 6 sono stati aggiunti 20 mg/ml di enzima CALB e l'avanzamento della reazione è stato controllato mediante analisi HPLC.

Raggiunto un sufficiente livello di conversione (46 ore, substrato 60%, prodotto monoestere 40%) la miscela è stata oggetto di una serie di esperimenti NMR tra cui spettro monodimensionale protonico $^1\text{H-NMR}$, COSY, HMQC, HMBC, confrontati poi con quelli effettuati su una miscela di substrato diestere 0.8M.

Alcuni degli spettri sono di seguito riportati con la rispettiva assegnazione protonica e carbonica (Figura 1.23, Figura 1.24, Figura 1.25, Figura 1.26, Figura 1.27,

Tabella 1.3). Prima dell'aggiunta della miscela di reazione all'enzima è stata tolta la frazione di sostanze conservanti, mediante ripetuti lavaggi con Vivaspin 500 (Sartorius).

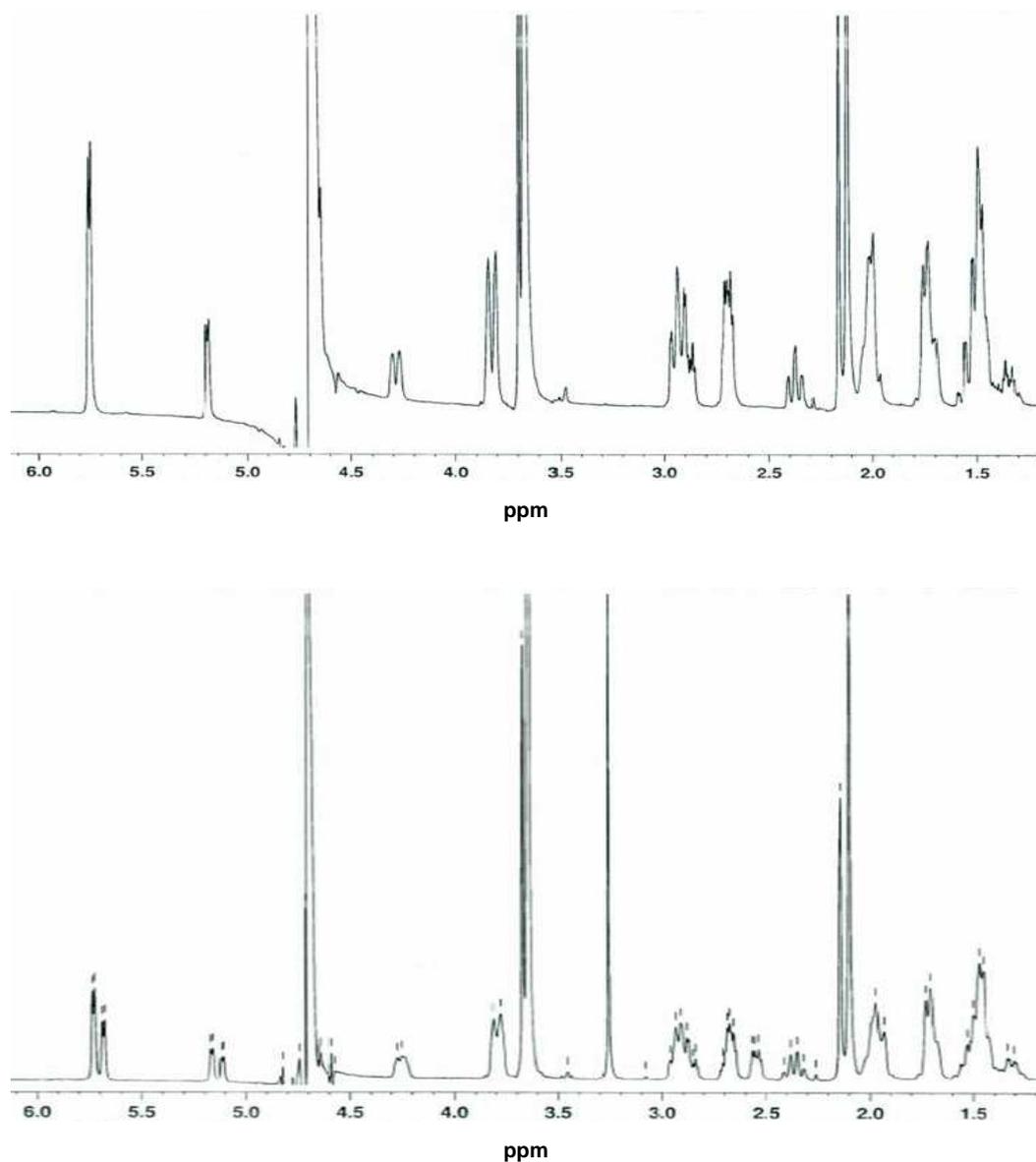


Figura 1.23
Spettro $^1\text{H-NMR}$ monodimensionali della miscela racemica di dimetil-1-acetilpiperidin-S,R-dicarbossilato, prima (sopra) e dopo (sotto) il trattamento con l'enzima CALB. Per l'assegnazione protonica fare riferimento alla Tabella 1.3.

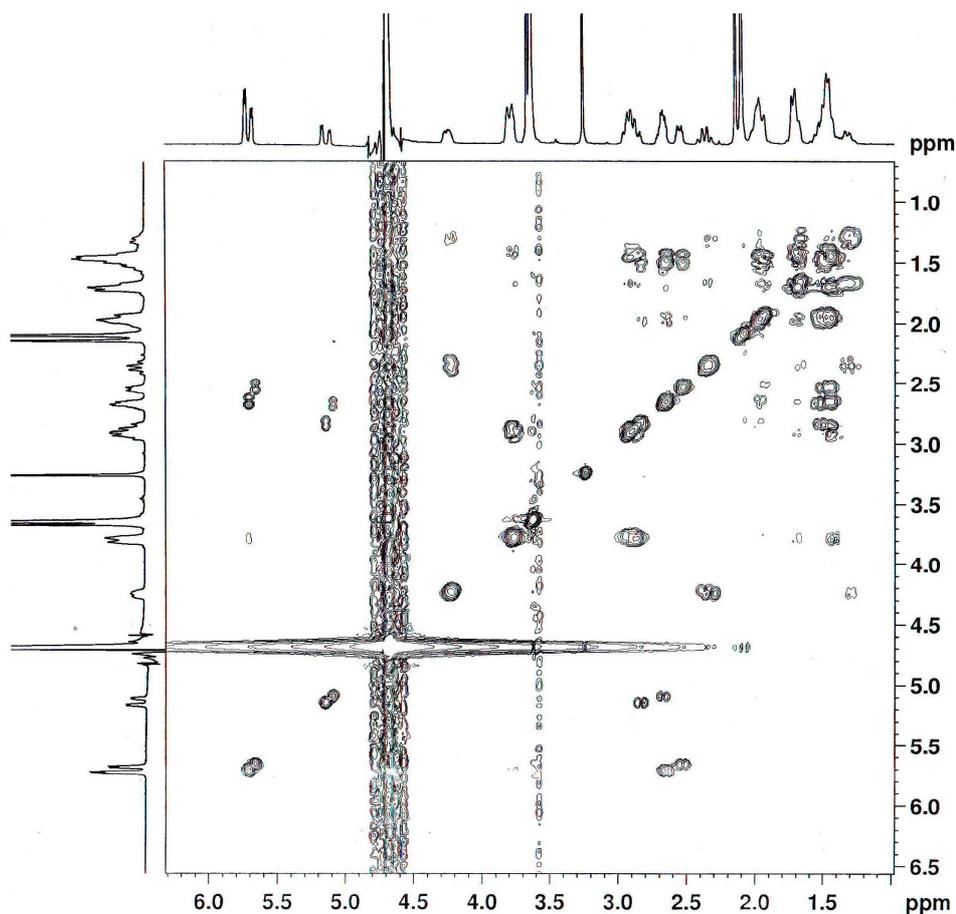


Figura 1.24
Spettro bidimensionale COSY della miscela racemica di dimetil-1-acetilpiperidin-S,R-dicarbossilato, prima (sopra) e dopo (sotto) il trattamento con l'enzima CALB. Per l'assegnazione protonica fare riferimento alla Tabella 1.3.

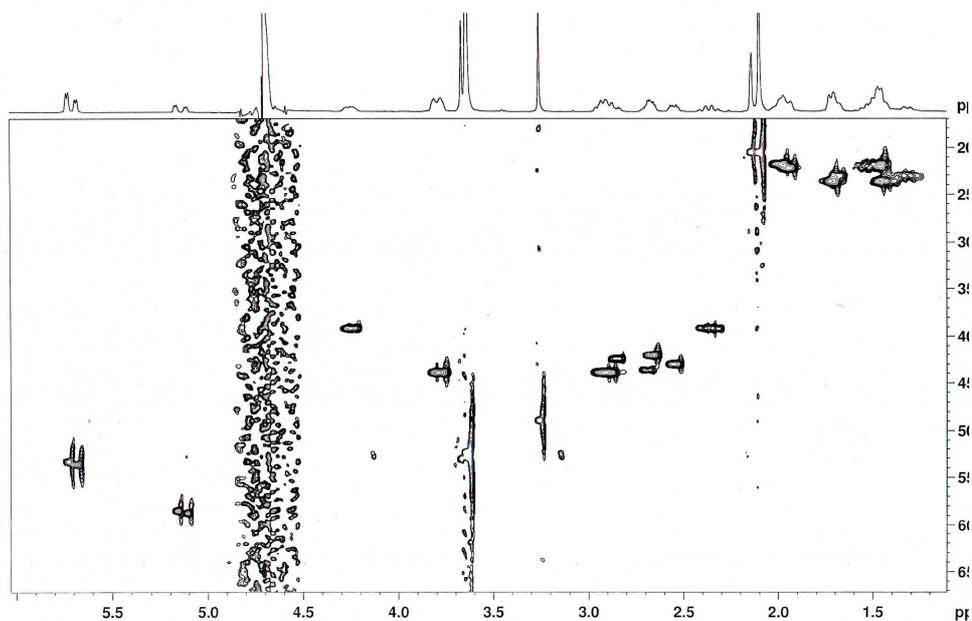


Figura 1.25
Spettro bidimensionale HMQC della miscela racemica di dimetil-1-acetilpiperidin-S,R-dicarbossilato dopo il trattamento con l'enzima CALB. Per l'assegnazione fare riferimento alla Tabella 1.3.

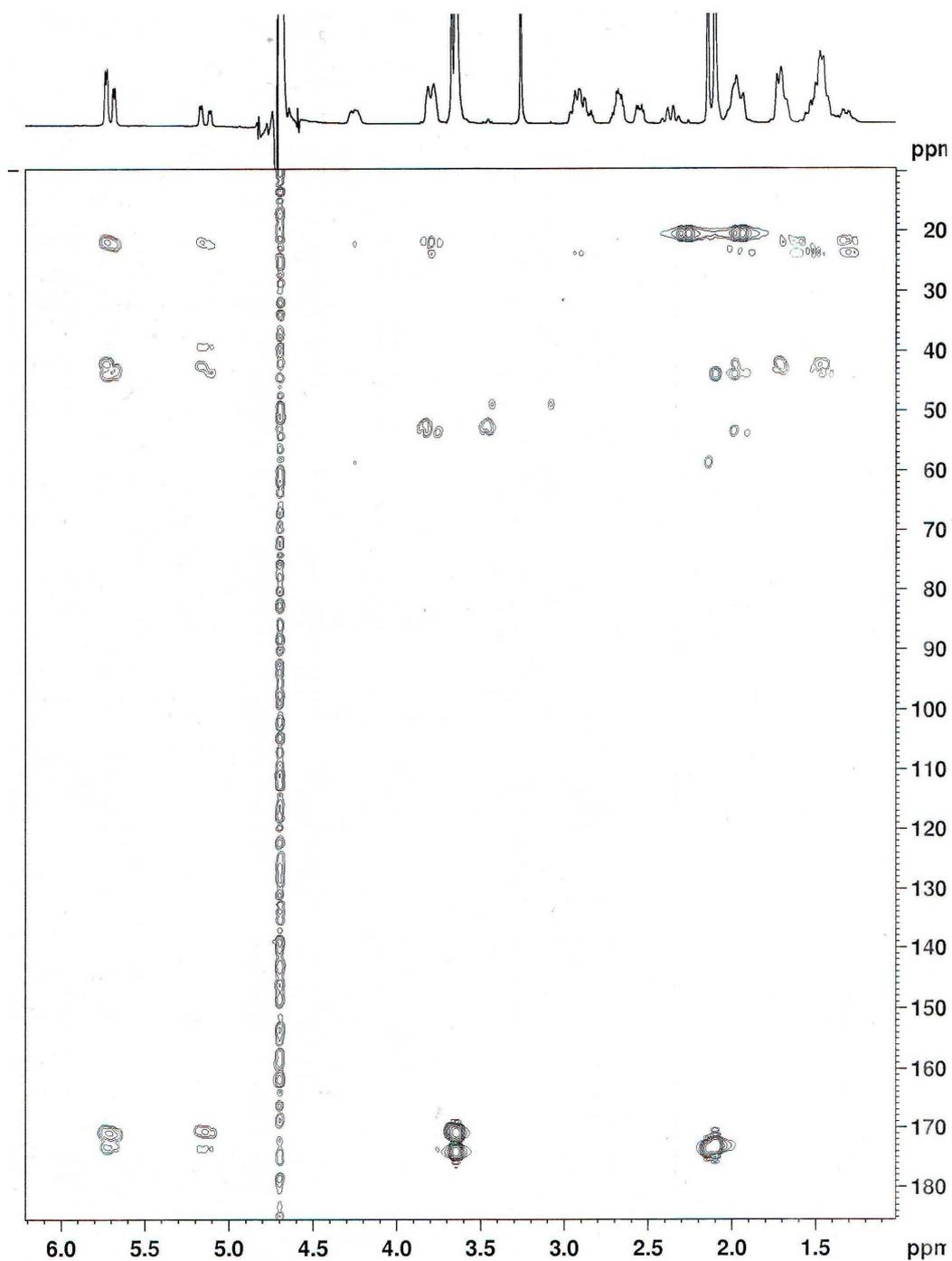


Figura 1.26
Spettro bidimensionale HMBC della miscela racemica di dimetil-1-acetilpiperidin-S,R-dicarbossilato dopo il trattamento con l'enzima CALB. Per l'assegnazione fare riferimento alla Tabella 1.3.

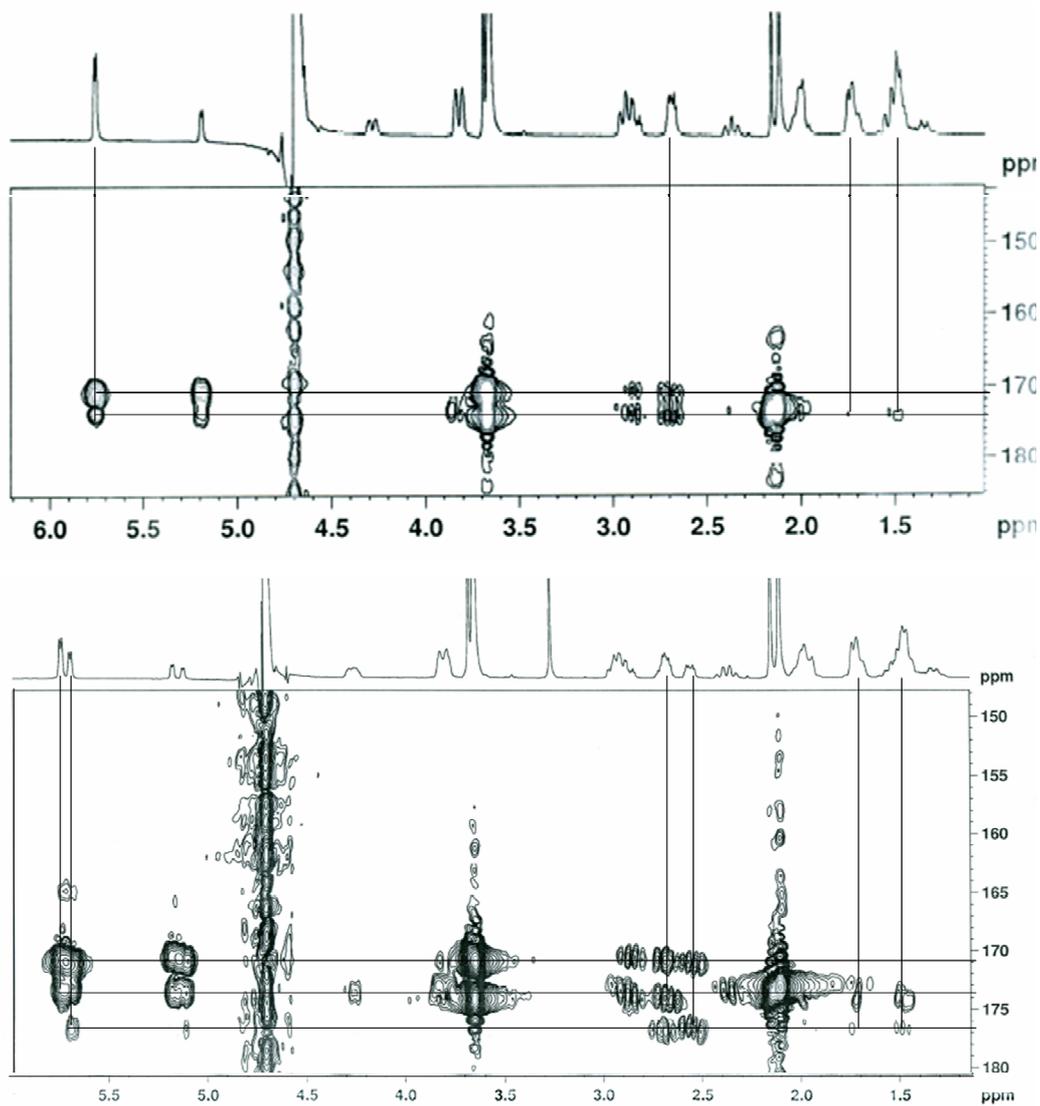
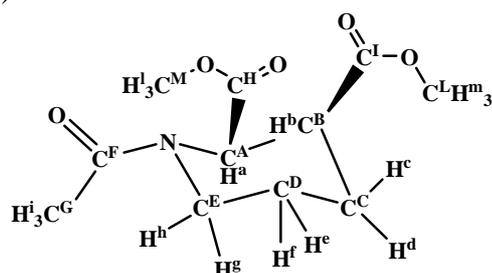


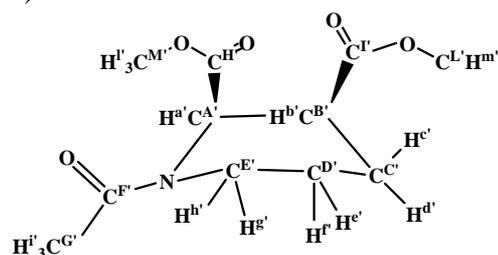
Figura 1.27
Particolare dello spettro bidimensionale HMBC della miscela racemica di dimetil-1-acetilpiperidin-S,R-dicarbossilato prima (sopra) e dopo (sotto) il trattamento con l'enzima CALB. Per l'assegnazione fare riferimento alla Tabella 1.3.

a)



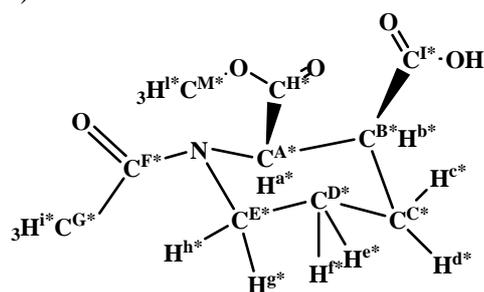
Carbonio C ^X	ppm	Protone H ^X	ppm
A	53.5	a	5.75
B	42	b	2.7
C	23.5	c	1.45
D	21.5	d	1.75
E	44	e	2.0
F	173	f	1.45
G	21	g	3.8
H	171	h	2.9
I	174	i	2.1
L	52.5	l	3.65
M	52.5	m	3.7

b)



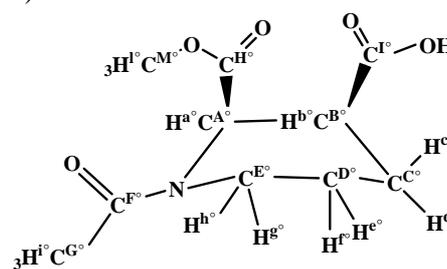
Carbonio C ^X	ppm	Protone H ^X	ppm
A'	58.5	a'	5.2
B'	42.5	b'	2.9
C'	23.5	c'	1.55
D'	21.5	d'	1.7
E'	39	e'	2.0
F'	173	f'	1.3
G'	21	g'	3.8
H'	171	h'	2.35
I'	174	i'	2.15
L'	53	l'	3.65
M'	53	m'	3.7

c)



Carbonio C ^X	ppm	Protone H ^X	ppm
A*	54	a*	5.7
B*	43	b*	2.55
C*	23.5	c*	1.5
D*	21.5	d*	1.75
E*	44	e*	2.0
F*	173	f*	1.45
G*	21	g*	3.8
H*	171	h*	2.9
I*	177	i*	2.1
		l*	3.65
M*	52.5		

d)



Carbonio C ^X	ppm	Protone H ^X	ppm
A°	59	a°	5.1
B°	43.5	b°	2.85
C°	23.5	c°	1.5
D°	21.5	d°	1.7
E°	39	e°	2.0
F°	173	f°	1.3
G°	21	g°	3.8
H°	171	h°	2.35
I°	177	i°	2.1
		l°	3.65
M°	52.5		

Tabella 1.3

Assegnazioni dei carboni e dei protoni nelle diverse forme caratterizzate mediante spettroscopia NMR, della miscela racemica di dimetil-1-acetilpiperidin-2,3-dicarbossilato dopo il trattamento con la CALB. Prima della reazione sono presenti solo le due conformazioni, rispettivamente a sedia (a) e a barca (b) del substrato dimetil-1-acetilpiperidin-2,3-dicarbossilato, mentre dopo la parziale idrolisi è presente anche la forma 2-metil-1-acetilpiperidin-3-dicarbossilato nelle sue corrispettive forme a sedia (c) e a barca (d).

Tramite l'assegnazione protonica effettuata mediante gli esperimenti monodimensionale $^1\text{H-NMR}$ e bidimensionale COSY, e del carbonio, mediante gli spettri HMQS e HMBC, e il successivo confronto degli dei relativi spettri della miscela prima e dopo il trattamento con la CALB, è stato possibile associare in maniera inequivocabile la posizione dell'estere idrolizzato, nonostante la sovrapposizione parziale delle specie osservabili.

Come è già stato precedentemente osservato nell'analisi NMR delle specie diestere metilico e diestere etilico, soggetti dell'iniziale *screening* enzimatico, anche nel caso del diestere metilico acetilato sono sempre visualizzabili due distinte popolazioni della miscela racemica, anche in questo caso probabilmente associabili alle due configurazioni in cui l'anello piperidinico può presentarsi, a sedia e a barca. Il particolare è il confronto tra HMBC della specie prima e dopo del trattamento con la CALB (Figura 2.27) ad evidenziare che è l'estere metilico associato al carbonio 3 dell'anello piperidinico ad essere idrolizzato.

1.3.5 Miglioramento delle condizioni di reazione

Al fine di valutare l'applicabilità industriale dell'idrolisi selettiva individuata, sono stati condotti una serie di prove di conversione enzimatica. Innanzitutto sono state individuate le costanti cinetiche di catalisi, mediante tecniche NMR. In particolare è stata valutata la velocità di formazione del metanolo, che essendo prodotto equimolarmente al prodotto monoacido durante l'idrolisi è stato utilizzato come indicatore più immediato della reazione in corso.

L'intensità del segnale del metanolo acquisito mediante uno spettro monodimensionale $^1\text{H-NMR}$ è stato inizialmente normalizzato mediante un'apposita retta di taratura. Dopo di che, una serie di reazioni effettuate a concentrazioni iniziali di substrato di estere crescenti, sono state sottoposte ad analisi mediante spettri monodimensionali ripetute in intervalli di tempo costanti. L'incremento dell'intensità del segnale del metanolo, in funzione del tempo, è stata quindi utilizzata per stimare la velocità di idrolisi ad una particolare concentrazione iniziale di substrato. Ripetendo lo studio a diverse concentrazioni di substrato, rispettivamente da 1 a 50 mM e stimando la velocità di formazione del metanolo, è stato possibile determinare, mediante regressione non lineare (Figura 1.28) le costanti cinetiche di conversione. Il substrato utilizzato è

costituito dalla miscela racemica del diestere, tuttavia per stimare le costanti cinetiche è stata considerata solo la concentrazione del substrato realmente idrolizzato, con configurazione (2S,3R), quindi una concentrazione dimezzata rispetto a quella della miscela racemica.

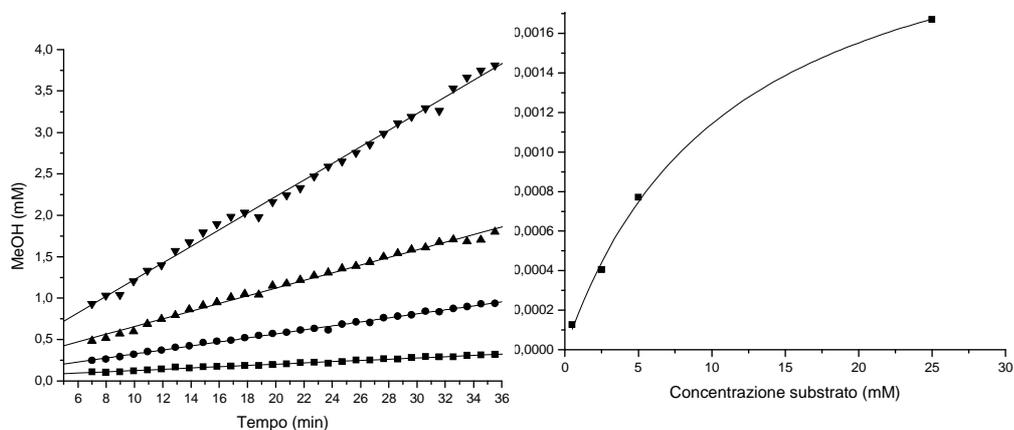


Figura 1.28

A sinistra, concentrazione di metanolo stimata mediante $^1\text{H-NMR}$, in funzione del tempo dopo l'aggiunta della CALB (5 mg/ml), utilizzando diverse concentrazioni di substrato (0.5 mM ■, 2.5 mM ●, 5 mM ▲, 25 mM ▼). A destra, grafico della dipendenza della velocità iniziale V_0 in funzione della concentrazione di substrato dimetil-1-acetilpiperidin-2S,3R-dicarbossilato, da cui le costanti cinetiche sono state ottenute.

I valori ottenuti sono rispettivamente K_m : 11.2 ± 1.22 mM, V_{max} : 0.00242 ± 0.00012 mmoli/s, K_{cat} : 0.0014 s $^{-1}$, 2.4 U/mg. Questi dimostrano una velocità di catalisi discreta e suggeriscono di lavorare con concentrazioni di substrato elevate (maggiori di 50 mM), al fine ottenere sempre la massima velocità di catalisi.

Sono stati eseguiti, in seguito, in collaborazione con Fabbrica Italiana Sintetici, esperimenti con diverse concentrazioni enzimatiche e di substrato al fine di valutare la stabilità dell'enzima ad elevate concentrazioni di substrato. Le reazioni, sono state condotte in condizioni di temperatura (20°C), agitazione e pH (6) controllato, finché il livello di idrolisi dell'enantiomero (2S,3R) ha raggiunto un livello del 99.5%. I risultati sono riassunti nella Tabella 1.4. Successivamente, per valutare la stabilità termica, il livello di conversione è stato analizzando variando la temperatura di reazione come mostrato in Tabella 1.5. In quest'ultimo caso la di substrato utilizzato è stati mantenuta la più elevata tra quelle mostrate in Tabella 1.4.

Buffer (ml)	Cal-B (mg)	Quantità substrato (g)	conc. ml/g (Volumi)	Tempo di reazione (ore)
50	50	0,5	100	150
50	50	0,5	100	160
10	100	1	10	90
10	200	2	5	80
50	800	10	5	85
250	3000	50	5	100

Tabella 1.4

Condizione di reazione testate e relativi tempi di reazione ottenuti. Il tempo di reazione è riferito all'ottenimento del 99.5 % di enantiomero (2S,3R) idrolizzato. La concentrazione del substrato è espressa in volumi, cioè ml/g.

Temperatura (°C)	Conversione dopo 80 ore (%)
30	88
35	92
40	95

Tabella 1.5

Temperature di reazione testate e relativi conversioni ottenute dopo 80 ore dell'enantiomero (2S,3R).

È inoltre stata valutata la possibilità di riutilizzare l'enzima a reazione ultimata al fine di determinare se l'enzima potesse essere riciclato in un processo industriale: per recuperare la frazione enzimatica è stato necessario utilizzare la CALB in forma immobilizzata, commercialmente disponibile, che può essere facilmente recuperata dalla sospensione mediante semplice filtrazione.

Di seguito, in Tabella 1.6 sono schematizzati i risultati di conversione ottenuta e il tempo necessario utilizzando sempre la stessa frazione enzimatica in forma immobilizzata, variando anche la temperatura di reazione.

Riciclo n°	Temperatura (°C)	Tempo finale (ore)	conversione (%)
Enzima fresco	20	220	97
1	20	240	98
2	40	100	99,5
3	40	80	94
4	40	80	96
5	40	80	90
6	40	70 [140]	80 [95]

Tabella 1.6

Prove di conversione enzimatica effettuata utilizzando l'enzima CALB immobilizzato, dopo *n* ricicli. Dopo il secondo riciclo è stata anche aumentata la temperatura di reazione al fine di ridurre i tempi di reazione.

I risultati di questa serie di prove hanno messo in evidenza la stabilità dell'enzima così come e la sua applicabilità in ambito industriale. La CALB, sia in forma immobilizzata che solubile, è in grado di idrolizzare l'iniziale miscela racemica con elevata enantioselettività, in acqua, consentendo successivamente di separare i due *cis* enantiomeri: uno come diestere e il secondo come monoestere. La separazione delle due molecole, dopo l'idrolisi mediante CALB immobilizzata, può essere effettuata mediante estrazione in fase organica: studi condotti presso la Fabbrica Italiana Sintetici hanno permesso di individuare le condizioni appropriate, in particolare, dopo la rimozione dell'enzima, in ambiente leggermente basico la frazione di diestere restante può essere estratta in acetato di etile, mentre quella monoacida rimane in fase acquosa. La reazione è stata provata con 80g di substrato iniziale, ottenendo un resa dell'enantiomero desiderato > 47%, con e.e.>99%. Se il riciclo di enzima in forma immobilizzata a 40°C determina una parziale perdita di attività enzimatica nei successivi ricicli, a temperature più basse (30°C) l'enzima può essere utilizzato cinque volte senza una significativa perdita di attività.

1.4 Conclusioni

Nel presente lavoro si propone una nuova via di preparazione del sintone S,S-diazabicyclononano, importante *building block* dell'antibiotico Moxifloxacin. In particolare si propone la preparazione di un suo precursore enantiomericamente puro, mediante idrolisi stereoselettiva, in soluzione acquosa, di una miscela racemica costituita dai due *cis* enantiomeri del dimetil-1-acetilpiperidin-2,3-dicarbossilato. L'idrolisi viene effettuata mediante l'utilizzo di un enzima, la lipasi B di *Candida antarctica* che idrolizza con elevata enantioselettività l'enantiomero dimetil-1-acetilpiperidin-2R,3S-dicarbossilato, a dare la relativa forma monoestere. Mediante estrazione organica, il substrato non idrolizzato, con configurazione voluta, può essere separato dalla miscela di reazione e successivamente trasformato, mediante passaggi chimici noti, nel sintone desiderato (Figura 1.29). L'enzima ha dimostrato un'elevata enantioselettività, sia in forma solubile che immobilizzata, ed inoltre regio selettività, cioè la capacità di idrolizzare uno solo delle due funzione esteree del dimetil-1-acetilpiperidin-2R,3S-dicarbossilato, in particolare quella in posizione 3.

Seppure il processo di risoluzione racemica consenta di ottenere al massimo il 50% di resa dal substrato inizialmente usato, l'estere idrolizzato potrebbe sia essere considerato per un nuovo processo di racemizzazione, sia essere utilizzato per la preparazione di altri principi attivi. Il processo, ritenuto di interessante dal punto di vista applicativo, è stato sottoposto a domanda di brevetto¹.

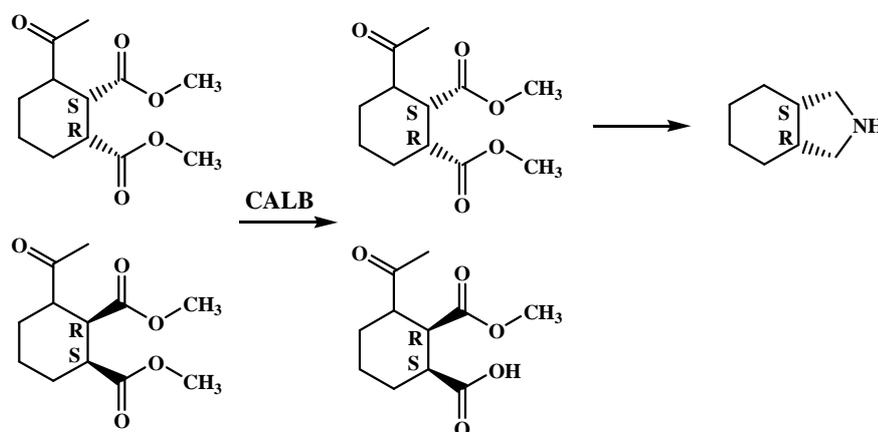


Figura 1.29

Risoluzione racemica effettuata mediante la lipase B di *Candida antarctica* (CALB) per la preparazione di un precursore chimico del S,S-diazabicyclononano.

2 Sintesi biocatalitica del testosterone

2.1 Introduzione

2.1.1 Sintesi del testosterone: stato dell'arte.

I composti steroidei sono responsabili di molte funzioni biologiche, che vanno dall'attività ormonale all'assorbimento o alla digestione lipidica, la crescita e la proliferazione cellulare, la costituzione e la stabilità delle membrane così come la sintesi di acidi biliari²⁸. Molti principi farmaceutici steroidei sono variamente utilizzati come agenti diuretici, contraccettivi, sedativi, antinfiammatori, dermatologici, anti-androgenici, anti-cancro, pro-progesteronali, anabolizzanti o per altre applicazioni. A causa della loro complessità molecolare, spesso questi composti sono sintetizzati a partire da composti naturali come i fitosteroli che possono essere ottenuti dalla soia (β -sitosterolo, campesterolo e stigmasterolo), dalle conifere (β -sitosterolo, campesterolo e β -sitostanolo) o dalla colza (β -sitosterolo, campesterolo e brassicasterolo).

Queste fonti naturali sono spesso utilizzate per la produzione di androstendione e androsta-1,4-dien-3,17-dione, che rappresentano i substrati basilari per la successiva produzione chimica o biotecnologica di farmaci steroidei^{29, 30}.

Il testosterone, come farmaco, è utilizzato per differenti trattamenti quali il mancato sviluppo nella pubertà, l'ipogonadismo o problemi sessuali nell'uomo. Tuttavia è ampio anche il suo abuso con propositi non medici, come nel doping e nel culturismo³¹. Esso rappresenta, con sette decenni di impiego clinico, uno dei più longevi farmaci usati con una richiesta mondiale che recentemente ha superato le 15 tonnellate anno, per un valore di quasi 900 milioni di US\$ (fonte: Thomson Reuters).

La trasformazione dell'economico androstendione (AD) in testosterone (TS), ad alto valore aggiunto, consta di una riduzione del carbonile in posizione 17 a dare la relativa forma β -idrossilata, effettuata industrialmente mediante quattro

passaggi chimici³² (Figura 2.1). Dal momento che un altro gruppo carbonile, quello in posizione 3, può essere ridotto a dare il relativo idrossile, la reazione non risulta solo stereoselettiva, ma anche regioselettiva. La complessità della trasformazione chimica deriva proprio dalla necessità di proteggere, ridurre selettivamente e deproteggere i gruppi carbonilici della molecola.

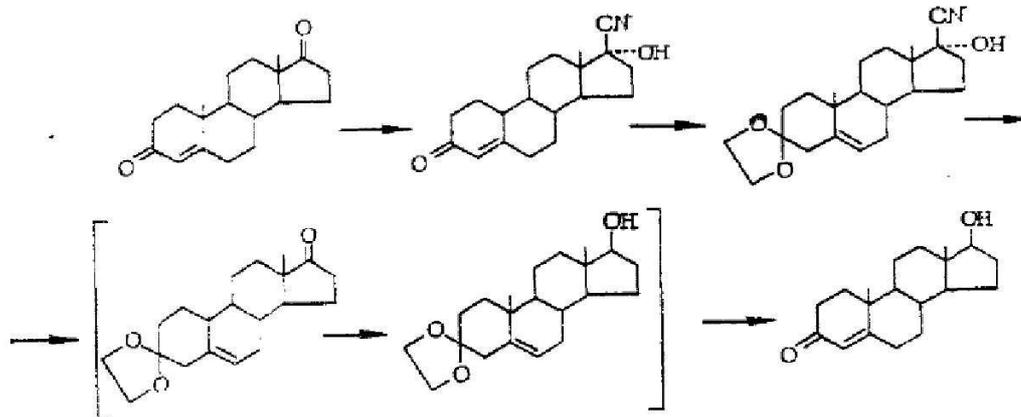


Figura 2.1

Sintesi chimica del testosterone a partire dall' androstendione. Immagine adattata da Andryushina 1987³².

Alcuni processi fermentativi permettono di ottenere il testosterone partendo direttamente da substrati grezzi come i fitosteroli o dal colesterolo mediante l'impiego di microrganismi come *Lactobacillus bulgaricus* o *Mycobacterium*³³⁻³⁶. Partendo invece da androstendione, altri processi fermentativi sono stati considerati per la sintesi del testosterone, mediante l'utilizzo del lievito *Saccharomyces cerevisiae*³⁷ e del fungo *Beauveria bassiana*³⁸, o mediante l'impiego di estratti cellulari di *Pseudomonas testosteroni* per la trasformazione inversa³⁹. Tuttavia questi processi, seppur più economici rispetto ai processi chimici, danno rese modeste e portano alla formazione di sub-prodotti che rendono complesso l'isolamento della specie d'interesse.

2.1.2 Sviluppo di una nuova via di sintesi

2.1.2.1 La biocatalisi

Al giorno d'oggi le trasformazioni chimiche effettuate mediante microrganismi o estratti enzimatici rappresentano un importante strumento che affianca la chimica classica, con un impiego in ampia espansione nel panorama delle tecnologie utilizzate per la sintesi industriale^{40, 41}.

I principali vantaggi di questa tecnologia, in particolare nell'utilizzo di enzimi, sono: (i) la loro compatibilità ambientale, con una notevole riduzione dei costi di smaltimento e di sicurezza; (ii) la selettività e l'efficienza di catalisi; (iii) la possibilità di lavorare in condizioni blande, con un notevole risparmio energetico; (iv) la loro compatibilità reciproca, che consente di effettuare più trasformazioni contemporaneamente; (v) l'ampia tolleranza per substrati non naturali. Gli svantaggi sono invece associati alla loro natura biologica: (i) impossibilità di lavorare in condizioni "estreme" (pH, temperatura, solventi, concentrazioni), (ii) la necessità di utilizzare, in alcuni casi, specifici cofattori, spesso molto costosi.

L'utilizzo di enzimi consente di effettuare tutta quella serie di trasformazioni che, in alcuni casi trascendono quelle che avvengono in natura: (i) l'idrolisi o la sintesi di esteri, amidi, lattoni, lattami, eteri, anidridi, epossidi e nitrili; (ii) l'ossidazione o la riduzione di alcheni, alcani, sistemi aromatici, alcoli, aldeidi e chetoni, sulfidri e sulfossidi; (iii) l'addizione o l'eliminazione di acqua, ammonio, cianuro; (iv) alogenazione e dealogenazione; (v) alchilazione e dealchilazione; (vi) carbossilazione e decarbossilazione; (vii) isomerizzazione; (viii) reazioni di aciloinazione e aldolazione; (ix) addizione di Micheal; (x) reazione Diels-Alder¹¹.

2.1.2.2 L'impiego delle chetoreduuttasi

Sebbene nell'industria chimica l'impiego più consistente di enzimi sia dato dalle lipasi, anche gli enzimi in grado di effettuare reazioni redox sono ampiamente proposti come catalizzatori specifici nella sintesi di molteplici farmaci⁴². Gli enzimi utilizzati in reazioni redox sono divisi in tre categorie:

deidrogenasi, ossigenasi, ossidasi. Tra questi, le deidrogenasi sono ampiamente utilizzati per la riduzione dei gruppi carbonili di aldeidi e chetoni o di doppi legami, generando specifici centri stereogenici.

La principale e cruciale differenza che distingue questi enzimi dalle altre tipologie utilizzate in biocatalisi, è rappresentato dal fatto che questi necessitano di un cofattore disposto ad accettare o donare gli equivalenti necessari per la riduzione o l'ossidazione. La maggior parte di questi enzimi utilizzano come cofattore la nicodidammine adenin dinucleotide (NAD(H)) o il relativo fosfato (NADP(H)), mentre più raramente sono utilizzate le flavine (FAD e FMN) o il pirrolochinolin chinone (PQQ). A causa della loro proibitivo costo, le reazioni redox associate non vengono mai effettuate utilizzando quantità equimolari di cofattore ma viene, invece, rigenerato "in situ" mediante una seconda reazione associata, con substrati e prodotti diversi, che rigenera il potenziale chimico del cofattore. Questa seconda reazione può essere a sua volta catalizzata dallo stesso enzima o da un secondo enzima presente nella miscela di reazione¹¹ (Figura 2.2).

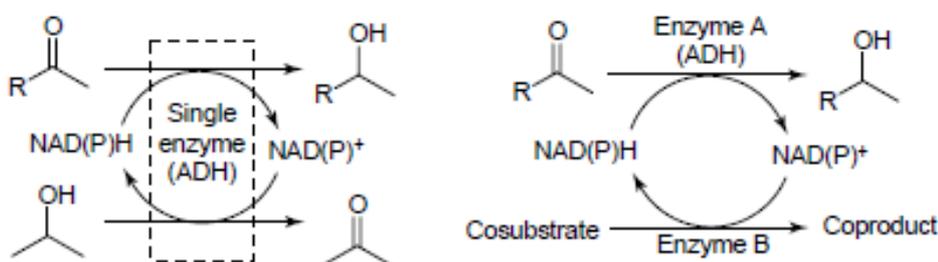


Figura 2.2

Schema delle due modalità di riciclo del cofattore: a destra un singolo enzima effettua la trasformazione desiderata e rigenera il cofattore nella forma necessaria, mediante l'impiego di due diversi substrati; a sinistra, mentre un primo enzima catalizza la reazione voluta, un secondo rigenera il cofattore mediante la trasformazione del proprio substrato. Immagine adattata da Kroutil *et al.* 2004⁴³.

Le chetoreduktasi possono comunque essere utilizzate per catalizzare la reazione di riduzione così come di ossidazione: per rendere maggiormente favorita una direzione rispetto all'altra bisogna associare a questa una reazione, che rigenera il cofattore necessario nello stato di ossidazione desiderato. Ad esempio, tra i vari enzimi di rigenerazione commercialmente disponibili, la glucosio deidrogenasi consente di rigenerare il NAD(P)H mediante la conversione del glucosio in acido gluconico, che ciclizza irreversibilmente in *o*-glucolattone,

mentre la formiato deidrogenasi lo rigenera trasformando il formiato in acido formico, che in acqua evolve in CO₂ abbandonando la reazione: in entrambi i casi la reazione è irreversibile e agisce da motore chimico per catalizzare la reazione di riduzione voluta. Altri enzimi come molte alcol deidrogenasi, consentono di rigenerare invece la forma ossidata NAD(P)⁺. Le reazioni catalizzate con le chetoreduktasi diventa industrialmente interessante solo con un *total turnover number* (TTN) $\geq 10^5$, corrispondente al numero di moli di prodotto ottenuto sul numero di moli di cofattore utilizzato, durante tutta la vita dell'enzima.

2.1.2.3 Sintesi chemoenzimatica del testosterone

Una singola trasformazione biocatalitica del androst-4-ene-3,17-dione (AD) in testosterone (TS) rappresenterebbe, industrialmente, una promettente alternativa alla sintesi chimica, sia dal punto di vista dei costi che della resa finale. Come precedentemente descritto la sintesi del testosterone a partire dall'androstendione, rappresenterebbe una singola riduzione stereo- e regio-selettiva di un chetone ad alcol. Formalmente la reazione risulta tra quelle che possono essere effettuate mediante l'impiego di un enzima che, tuttavia, deve essere in grado di ridurre con una particolare stereo-selettività (β e non α) e distinguere il gruppo carbonilico da ridurre in posizione 17 anziché in posizione 3, che deve rimanere tale.

Se la stereo-selettività è tipica di molte cheto-reduttasi note, la regio-selettività sarebbe, in questo caso, molto peculiare, data la notevole somiglianza dell'intorno chimico che caratterizza i due gruppi carbonilici: basta osservare come una rotazione di 180° della molecola (Figura 2.3), lungo un ipotetico asse perpendicolare al piano costituito dallo scheletro stereoisomero, porti quasi al ripristino della posizione dei gruppi chetonici, dimostrando che la molecola possiede, quasi, una asse di simmetria C₂ al centro della molecola.

Seppure un putativo *screening* con chetoreduktasi commercialmente disponibili potesse consentire di individuare un enzima stereoselettivo, la combinazione di regio- e stereo-selettività sarebbe difficilmente ottenibile con questo approccio e richiederebbe la disponibilità di un'estesa libreria enzimatica, con elevati costi e senza garanzia di successo.

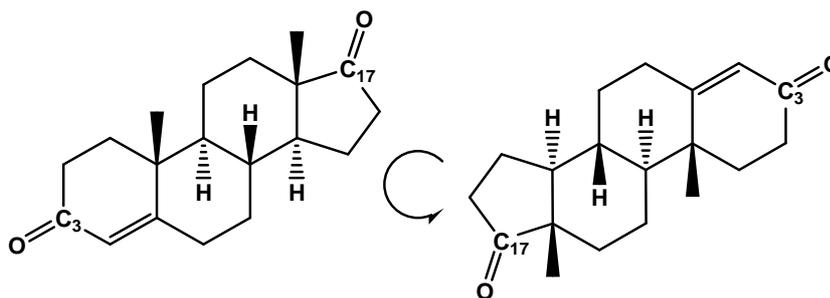


Figura 2.3

La rotazione della molecola di androstendione rispetto ad un asse C_2 centrale porta i gruppi chetonici in posizione 3 e 17 quasi nelle reciproche posizione iniziali.

Tuttavia sia il testosterone che l'androstendione rappresentano composti naturali, diffusi soprattutto in organismi evoluti, dove svolgono principalmente un'attività di segnalazione ormonale. La loro interconversione rappresenta uno dei meccanismi di accensione e di spegnimento molecolare che gli organismi utilizzano per attivare o spegnere vie metaboliche, di crescita o di sviluppo. Poiché la maggior parte delle reazioni che caratterizzano gli organismi viventi sono catalizzate da appositi enzimi, anche in questo caso la trasformazione dell'androstendione in testosterone potrebbe essere catalizzata da enzimi specifici. L'enzima dovrebbe essere individuato direttamente in organismi viventi per i quali questa interconversione sia documentata, e da questi purificata o espressa in forma ricombinante per l'utilizzo industriale.

2.1.3 Individuazione degli enzimi

2.1.3.1 Le 17β -idrossisteroide deidrogenasi

Esiste una categoria enzimatica che in natura catalizza la riduzione del gruppo carbonilico in posizione 17 nei sistemi steroidei, quella delle *17 β -hydrosteroid dehydrogenases* (17β HSD) (E.C. 1.1.1.51), presenti sia in sistemi evoluti (mammiferi) che non evoluti (batteri, funghi, lieviti). Trattandosi di una riduzione, l'enzima necessita di un co-fattore che per questa categoria enzimatica è rappresentato da NADH o NADPH.

Nella review di Dovona *et al.* 2005⁴⁴ è descritto quanto si conosce e le potenziali applicazioni di questa categoria enzimatica, ed è riportata una lista dei microrganismi noti che sono in grado di effettuare questa trasformazione. Tuttavia solo in alcuni casi⁴⁵ l'enzima è stato caratterizzato e studiato come descrive la seguente Tabella 2.1.

Properties of microbial 17 β -SDH				
Enzyme/organism	Reference	Molecular weight	Subunit composition	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$)
17 β -OH SDH <i>Alcaligenes</i> sp.	[7]	68000	Dimer	303
17 β -OH SDH <i>Cochliobolus lunatus</i>	[30]	60000 or 120000	Dimer or tetramer	2.5×10^{-3}
17 β -OH SDH <i>C. radicola</i>	[59]	58600	Dimer	84
17 β -OH SDH <i>P. ostreatus</i>	[39]	35000	Dimer	1.3×10^{-3}
3(17 β -OH SDH <i>P. testosteronei</i>	[55]	98500	Tetramer	99
17 β -OH SDH <i>P. testosterone</i>	[54]	–	Monomer	0.18
3(17 β -OH SDH <i>S. hydrogenans</i>	[23]	70200	Monomer	10^{-9}
17 β -OH SDH (1) <i>Mycobacterium</i> sp. Et1	[60,61]	68000	Monomer	1.28
17 β -OH SDH (2) <i>Mycobacterium</i> sp. Et1	[60,61]	210000	Tetramer	23.7

Tabella 2.1

Lista di 17 β HSD caratterizzate. Immagine adattata da Donova *et al.* 2005⁴⁴.

Tra quelli elencati, l'unico enzima espresso in forma ricombinante è quello di *Cochliobolus lunatus*, che è stato anche ingegnerizzato con alcune mutazioni al fine di aumentarne la specificità per substrato e per il cofattore⁴⁶⁻⁵⁰. Esiste la struttura cristallografica della 3 β /17 β HSD di *Comamonas Testosteroni*⁵¹ che tuttavia non possiede regioselettività. Non esistono enzimi commercialmente disponibili che siano capaci di convertire regio-selettivamente l'androstendione in testosterone: la Sigma-Aldrich propone la 17 β -idrosteroido deidrogenase di *C. testosteronei*, con bassa regioselettività.

Le 17 β HSD più studiate in letteratura sono quelle umane perché implicate in diverse patologie, determinate da una deregolazione del livello ormonale, del metabolismo degli acidi grassi, degli steroidi e degli acidi della bile. Sono per ora noti 14 enzimi appartenenti a questa categoria nell'uomo, ciascuno con una funzione differente in base al tipo di substrato accettato e alla localizzazione tissutale in cui viene espressa, che ne distingue il tipo. Molti di essi partecipano alla regolazione del livello di estrogeni ed androgeni, mediante la conversione in posizione 17, modulandone quindi l'azione biologica: la forma cheto- è attiva mentre la forma idrossi- è inattiva (Figura 2.4). La specificità del substrato accettato e la direzione di catalisi varia molto in base al tipo di enzima⁵² come rappresentato dalla Figura 2.5.

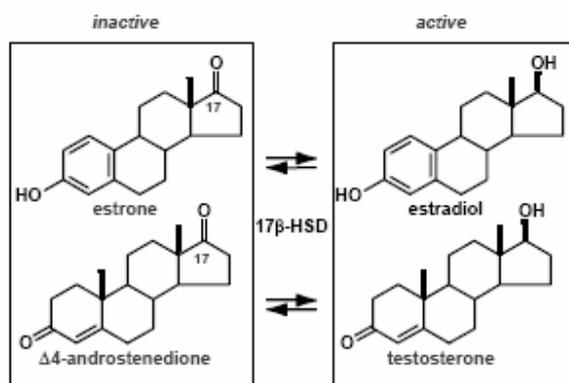


Figura 2.4

A sinistra, le 17 β HSD modulano l'interconversione degli estrogeni in androgeni mediante una reazione redox. Immagini adattata da Mindnich *et al.* 2004⁵².

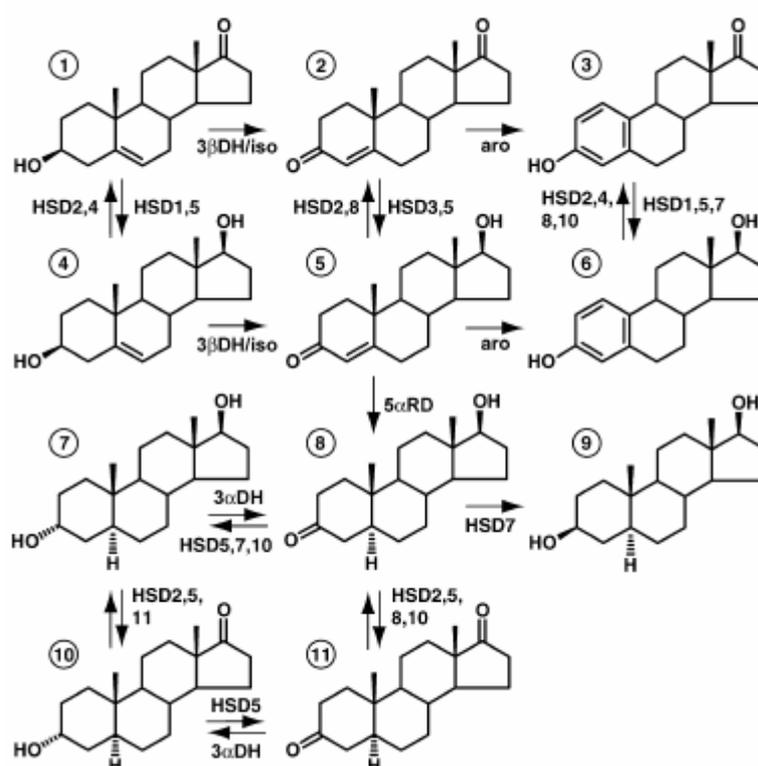


Figura 2.5

Schema riassuntivo delle trasformazioni principali mediate dalle 17 β HSD nell'uomo. Le abbreviazioni HSD1, 2 ecc. corrispondono alla 17 β idrosteroidi deidrogenasi di tipo 1, 2 ecc.; 3 α DH, 3 α idrosteroidi deidrogenasi; 3 β DH/iso, 3 β deidrogenasi/ Δ 5- Δ 4-isomerasi; aro, aromatasi o citocromo P450CYP19; 5 α RD, 5 α -riduttasi; molecole descritte: (1) deidroepiandrosterone, (2) Δ 4-androstenedione, (3) estrone, (4) Δ 5 -androstene-3 β ,17 β -diolo, (5) testosterone, (6) estradiolo, (7) 3 α ,17 β -androstenediolo, (8) diidrotosterone, (9) 3 β ,17 β -androstendiolo, (10) androsterone e (11) androstenedione. Immagini adattata da Mindnich *et al.* 2004⁵².

Tutte le 17 β HSD umane, a meno della 17 β HSD di tipo 5, appartengono ad una superfamiglia di enzimi definiti come *short-chain dehydrogenase/reductase* (SDR) che, nell'uomo sono all'incirca 70. La 17 β HSD tipo 5, invece, appartiene evolutivamente ad un'altra superfamiglia, quella delle *aldo-keto reductase* (AKR).

Le due superfamiglie possiedono dei *patterns* conservati rappresentati da amminoacidi posizionati in regioni importanti per il riconoscimento dei substrati o per l'attività catalitica, che sono schematizzati in Tabella 2.2. Molte delle 17 β HSD umane appartenenti alle SDR hanno anche un'ulteriore specializzazione di alcune regioni, che tuttavia non sono sempre presenti, tra cui la regione per il legame al cofattore (TGxxxGxG), la regione compresa tra il legante del cofattore e il sito attivo (NAG), il sito attivo compreso nel pattern PS00061 (YxxSK) e una regione C-terminale (PGxxxT).

Superfamiglia	Nome <i>pattern</i> (Pfam)	Sequenza
SDR	PS00061	[LIVSPADNK]-x(9)-{P}-x(2)-Y- [PSTAGNCV]-[STAGNQCIVM]- [STAGC]-K-{PC}-[SAGFYR]- [LIVMSTAGD]-x-{K}-[LIVMFYW]-{D}- x-{YR}-[LIVMFYWGAPTHQ]- [GSACQRHM]
AKR	PS00798	G-[FY]-R-[HSAL]-[LIVMF]-D- [STAGCL]-[AS]-x(5)-[EQ]-x(2)- [LIVMCA]-[GS]
	PS00062	[LIVMFY]-x(8)-{L}-[KREQ]-{K}- [LIVM]-G-[LIVM]-[SC]-N-[FY]
	PS00063	[LIVM]-[PAIV]-[KR]-[ST]-{EPQG}- {RFI}-x(2)-R-{SVAF}-x-[GSTAEQK]- [NSL]-x-{LVRI}-[LIVMFA]

Tabella 2.2

Schema riassuntivo dei *patterns* tipici delle due principali superfamiglie cui appartengono le 17 β HSD nell'uomo.

2.1.3.2 La 17 β -idrossisteroide deidrogenasi di tipo 5 umana

Come precedentemente mostrato in Figura 2.5, l'interconversione del 4-androstene-3,17-dione in testosterone nell'uomo viene mediata solo da alcuni enzimi: la 17 β HSD di tipo 2, 3, 5 e 8. Se la 17 β HSD di tipo 8 è praticamente priva di informazioni bibliografiche, la 2 e la 3 sono solo parzialmente caratterizzate⁵³,⁵⁴ mentre la 17 β HSD di tipo 5 è ben conosciuta in quanto ne è stata risolta la struttura cristallografica^{55, 56} al fine di individuare inibitori specifici per questo enzima, che potrebbero essere utilizzati nel trattamento del cancro alla prostata.

La proteina è stata espressa in *E.coli*, e cristallizzata in complesso con 4-androstendione e NADP⁺ o con testosterone e NADP⁺.

Dalla struttura cristallografica è stato proposto anche il meccanismo catalitico che prevede l'ingresso del substrato AD e del cofattore NADPH nel sito attivo mediante due canali indipendenti (Figura 2.6). L'AD entra nel canale con la porzione 17-keto rivolta verso il sito attivo, grazie al riconoscimento stereospecifico svolto dai residui Phe306 e Trp227. La reazione induce un cambiamento conformazionale sia nell'anello nicodin-amminico del NADPH che nell'anello D dello steroide, e la formazione del prodotto testosterone porta alla formazione di un nuovo ponte idrogeno tra il gruppo 17-idrossi e la Ser118, che consente di immobilizzare il prodotto fino all'abbandono del sito catalitico del cofattore NADP⁺.

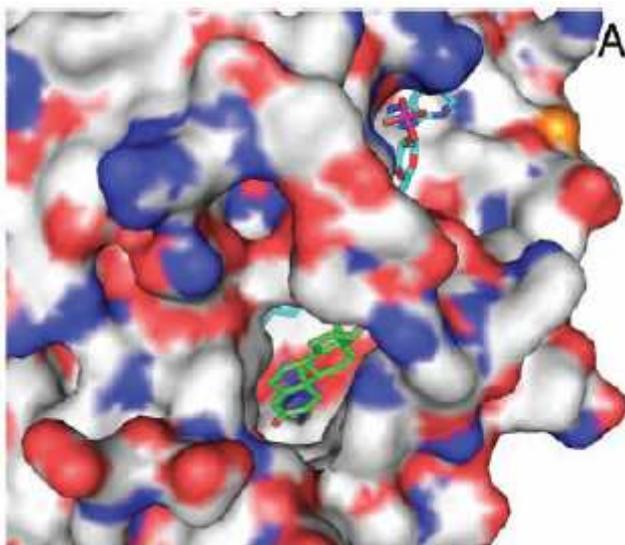


Figura 2.6
Immagine dell'enzima 17 β HSD di tipo 5 umano in cui si intravedono l'androstendione, il cofattore ossidato NADP e i relativi canali d'ingresso al sito attivo. Immagine adattata da Qiu *et al.* 2004⁵⁵.

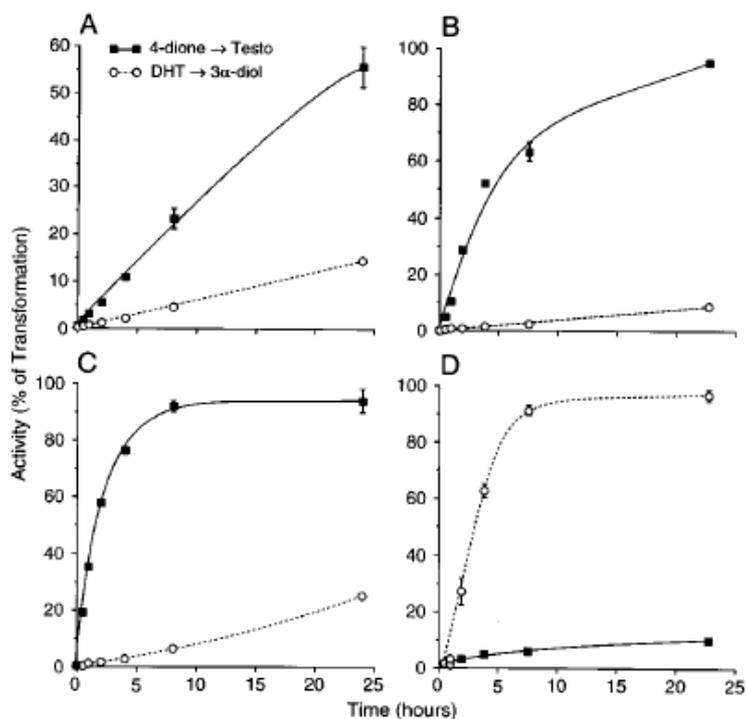
Nonostante l'attività 17-keto-reduttasica di questo enzima sia la principale, l'espressione in via ricombinante ne ha rilevato anche l'attività 3-keto e 20-keto-reduttasica così come 3 α -, 17 β - e 20 α -idrosteroidi ossidasica.

Nel lavoro di Dufort *et al.* 1999⁵⁷ la 17 β HSD5 umana è stata espressa in cellule umane in coltura (Hek 293) e ne è stata studiata in vivo la capacità di convertire l'androstenedione in testosterone e il didrotestosterone in 3 α -17 β -androstandiolo (rispettivamente l'attività 17 β e 3 α -cheto-reduttasica) valutandone, dunque, la regioselettività. Questa viene confrontata con quella rilevata esprimendo nelle stesse cellule l'omologa 17 β HSD di tipo 5 di topo (17 β HSD5),

la 17 β HSD di tipo 3 umana (17 β HSD3), precedentemente citata, e l'umana 3 α HSD di tipo 3 (3 α HSD 3) come controllo dell'attività indesiderata (Figura 2.7).

Figura 2.7

L'attività 17 β e 3 α cheto reduttasica di cellule 293 intatte trasfettate rispettivamente per l'espressione della 17 β HSD5 umana (A), 17 β HSD3 umana (B), 17 β HSD5 di topo (C) e la 3 α HSD umana (D). Abbreviato: 4-androsten-3,17-dione (4-dione), testosterone (Testo), diidrotestosterone (DHT), 3 α ,17 β androstenediolo. Immagine adattata da Dufurt *et al.* 1999⁵⁷.



Da questo lavoro si evince come la frazione di attività 3 α -cheto-reduttasica sia contemporaneamente presente a quella 17 β -cheto-reduttasica, ma sia tuttavia minore nel caso della 17 β HSD3 umana e della 17 β HSD5 murina, rispetto al caso della 17 β HSD5 umana. Sempre nello stesso lavoro si osserva che la stabilità della 17 β HSD5 umana risulta molto bassa: infatti dopo omogeneizzazione l'attività 17 β -cheto-reduttasica residua è pari al 10% di quella iniziale. Inoltre, quando questa viene espressa in via ricombinante (*E.coli*), la quantità di enzima necessaria ad ottenere la stessa attività 17 β -cheto-reduttasica è decisamente superiore nel caso in cui l'enzima venga purificato rispetto all'attività presente in cellule intere, ad indicarne una notevole perdita di attività durante la purificazione (Figura 2.8). Per ottenere la proteina purificata al fine di studiarne la struttura cristallografica, infatti, sono state adottate una serie di accortezze nel protocollo di purificazione⁵⁵.

Se la principale trasformazione catalizzata dalla 17 β HSD5 umana è noto essere quella dell'androstendione in testosterone, come dimostrato anche nel grafico in Figura 2.5, un'analisi con altri substrati, svolta sempre da Dufort *et al.* 1999, ha dimostrato che la trasformazione del progesterone in 20 α -

idrossiprogesterone è più consistente (Figura 2.9), ad indicare un ipotetico altro ruolo dell'enzima.

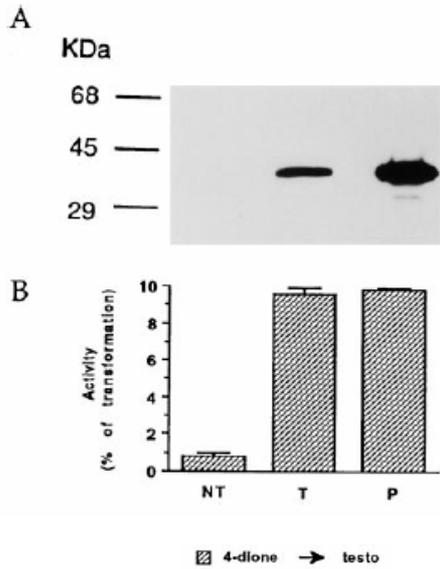
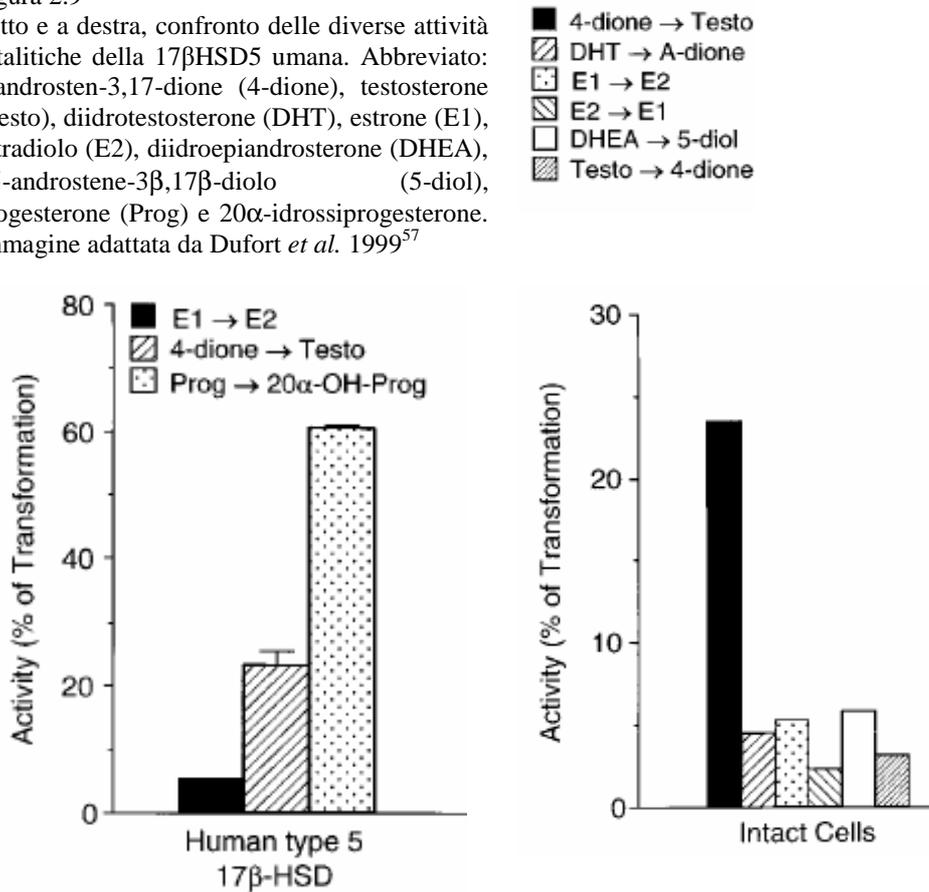


Figura 2.8
Confronto tra le quantità di enzima 17βHSD5 umano, stimato mediante Western Blot (A), necessarie per avere lo stesso livello di attività enzimatica (B), in cellule intere (T) e in forma di enzima purificato (P). Cellule non trasfettate (NT). Immagine adattata da Dufort *et al.* 1999⁵⁷.

Figura 2.9
Sotto e a destra, confronto delle diverse attività catalitiche della 17βHSD5 umana. Abbreviato: 4-androsten-3,17-dione (4-dione), testosterone (Testo), diidrotestosterone (DHT), estrone (E1), estradiolo (E2), diidroepiandrosterone (DHEA), Δ5-androstene-3β,17β-diolo (5-diol), progesterone (Prog) e 20α-idrossiprogesterone. Immagine adattata da Dufort *et al.* 1999⁵⁷



2.1.3.3 La 17 β -idrossisteroide deidrogenasi di tipo 5 murina

Nel caso della 17 β HSD5 di topo precedentemente introdotta (Figura 2.7), invece, l'attività enzimatica nei confronti del substrato androstendione rimane inalterata anche dopo omogeneizzazione delle cellule Hek 293 in cui viene espressa⁵⁷, ad indicarne una maggiore stabilità. Sembra poi che la 17 β HSD5 di topo possieda una differente specificità per i substrati rispetto all'omologa umana, essendo preferita la conversione dell'androstendione in testosterone (Figura 2.10).

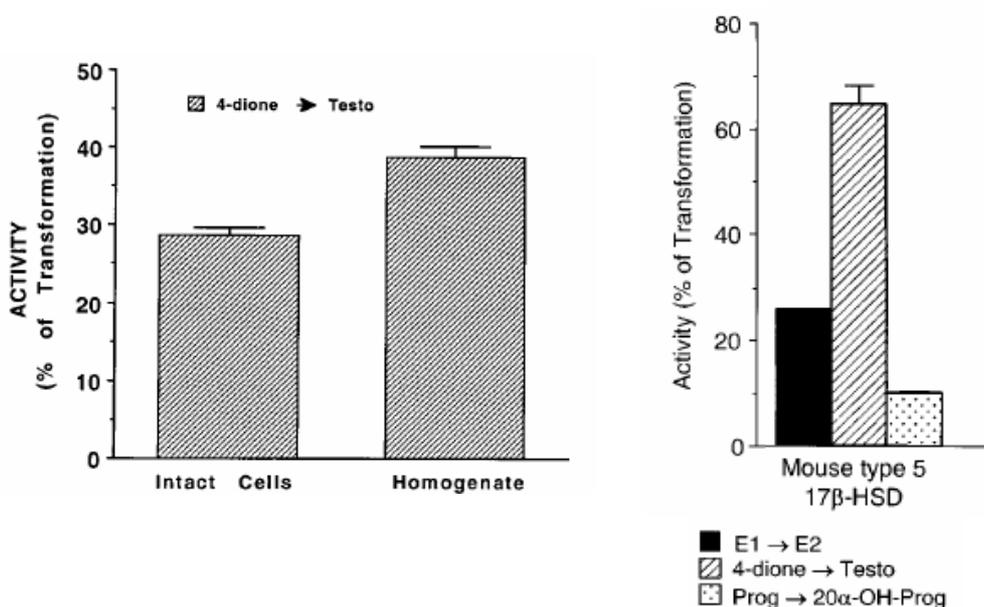


Figura 2.10

A sinistra, confronto tra l'attività catalitica di cellule 293 trasfettate per la sintesi della 17 β HSD5 murina, prima e dopo l'omogeneizzazione. A destra, confronto delle diverse attività catalitiche della 17 β HSD5 murina. Abbreviato: 4-androsten-3,17-dione (4-dione), testosterone (Testo), estrone (E1), estradiolo (E2), progesterone (Prog) e 20 α -idrossiprogesterone⁵⁷.

Un simile studio sulla selettività dell'enzima murino è stato compiuto dallo stesso gruppo con altri substrati⁵⁸. I risultati ottenuti (Figura 2.11) suggeriscono che questo enzima, a differenza dell'omologo umano, risulti molto più selettivo nei confronti del substrato androstendione. La differente selettività tra la 17 β HSD5 di topo rispetto a quella umana può essere dovuta alla sostituzione di alcuni residui in prossimità del sito catalitico, quali la Ser 118 e la Phe 306, mentre la maggiore stabilità può essere determinata da sostituzioni nelle regioni superficiali.

ottenuti indicano, per le due isoforme, un valore <1 U/mg nella conversione dell'AD in TS. Inoltre è stata individuata, sempre mediante analisi cinetica, la modalità di catalisi, che consiste in un meccanismo ordinato di tipo bi-bi, dove il NADP⁺ viene legato dall'enzima libero prima del substrato idrosteroidico e il prodotto chetosteroideo lascia per primo l'enzima, seguito dal cofattore NADPH; l'ordine appare invece invertito nella reazione opposta. Il modello è compatibile con quello proposto per la 17 β HSD5 umana ottenuto dal modello cristallografico.

Oxidation	M2			M3		
	ETDO ^a	Testosterone	Estradiol-17 β	ETDO ^a	Testosterone	Estradiol-17 β
K_a (μ M)	1.2	1.1	0.8	8.7	10.7	8.4
K_{ia} (μ M)	1.0	0.8	0.6	3.8	4.8	10.5
K_b (μ M)	2.0	15.8	27.8	11.1	34.7	50.0
V_f (units/mg)	1.52	0.66	0.39	6.71	3.46	2.61
Reduction	M2			M3		
	ETL ^a	Androstene- dione	Estrone	ETL ^a	Androstene- dione	Estrone
K_q (μ M)	0.3	0.5	0.9	0.9	1.0	0.8
K_{iq} (μ M)	1.2	1.7	1.7	2.5	3.8	3.2
K_p (μ M)	1.6	3.2	10.4	10.1	14.9	13.4
V_r (units/mg)	0.66	0.25	0.21	2.65	0.92	1.24

Tabella 2.3

Tabella riassuntiva delle costanti cinetiche stimate per le due isoforme M1 e M2, purificate da tessuto, della 17 β HSD5 murina. Sigle abbreviate: Costante di Michaelis-Menten (K) per il NADP⁺ (a), il 17 β -idrossisteroide (b), il NADPH (p), il 17-chetosteroide (q); velocità massima per la reazione diretta (i) e inversa (r); eticolandiolo (ETDO); eticolanolone (ETL). Immagine adattata da Hara *et al.* 1987².

Anche la 17 β HSD5 di topo è stata espressa in via ricombinante in *E.coli*, come riportato in un lavoro di Deyashiki *et al.* 1995³, ed un protocollo di purificazione è già stato individuato (Tabella 2.4). In questo lavoro tuttavia, della 17 β HSD5 viene studiata l'attività deidrogenasica, e non quella cheto-reduttasica (usando NADP⁺ come cofattore), per tutta una serie di substrati descritti in Tabella 2.4, per i quali sono stati stimati anche i parametri cinetici.

Tabella 2.4

A destra, tabella purificativa della 17 β HSD5 murina espressa in forma ricombinante in *E.coli*. Sotto, le costanti cinetiche identificate per diversi substrati idrossilici. Tabelle adattate da Deyashiki *et al.* 1995³.

TABLE II
Purification of r17 β -HSD

Step	Protein	Total activity	Specific activity	Yield
	mg	units	units/mg	%
Cell extract	1415	6.27	0.004	100
35-75% ammonium sulfate fraction	733	4.38	0.006	70
Sephadex G-100	373	3.77	0.010	60
Q-Sepharose	33.8	3.56	0.105	57
Matrex red A	1.2	1.85	1.54	30
Rechromatography on Sephadex G-100	0.65	1.61	2.48	27

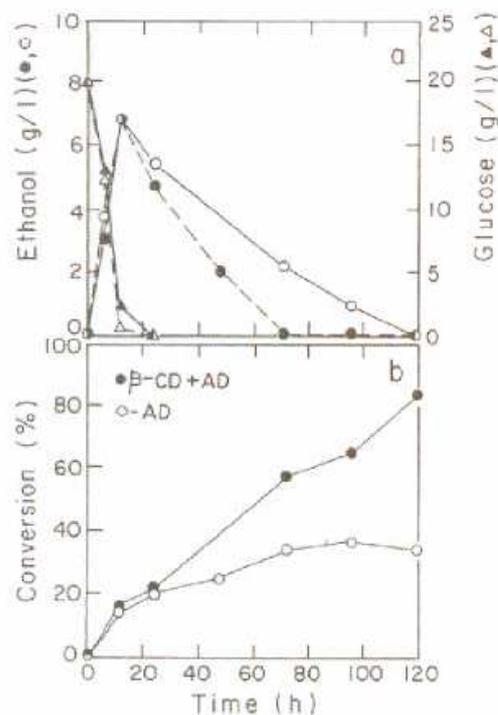
Substrate	Identified product	r17 β -HSD	
		K_m	k_{cat}
		μM	min^{-1}
5 α -Dihydrotestosterone	5 α -Androstane-3,17-dione	6.7	68
Testosterone	Androst-4-ene-3,17-dione	9.7	104
Estradiol-17 β	Estrone	11	57
5 β -Pregnan-20 α -ol-3-one	5 β -Pregnane-3,20-dione	1.1	4
Pregn-4-en-20 α -ol-3-one	Progesterone	3.3	4
(S)-Indan-1-ol	Indan-1-one	508	252
Benzene dihydrodiol	Catechol	56	26

2.1.3.4 Una putativa 17 β HSD da *Saccharomyces cerevisiae*

Come già detto, alcuni microrganismi sono stati utilizzati per la conversione dell'androstendione in testosterone, mediante processi fermentativi. Tuttavia non è noto quale enzima, nell'organismo utilizzato, sia responsabile della trasformazione.

Nel lavoro di Singer *et al.*, l'AD viene convertito in TS mediante l'utilizzo di *Saccharomyces cerevisiae*. La conversione, a parità di tempo, viene aumentata dal 27% al 90% aggiungendo alla soluzione varie tipologie di ciclodestrine, che sembrano aumentare la solubilità dell'androstenedione in acqua³⁷ (Figura 2.13).

Figura 2.13
 Analisi temporale della fermentazione (a) e della conversione (b) dell'androsendione (2g/l) senza (simbolo vuoto) o in presenza di β -ciclodestrine (simbolo pieno) mediante *S. cerevisiae*. Immagine adattata da Singer *et al.* 1991³⁷.



S. cerevisiae rappresenta l'unico organismo, tra quelli utilizzati per convertire l'AD in TS, il cui genoma sia completamente sequenziato. Tuttavia, seppure certamente presente, come questo ed altri⁶⁰ lavori dimostrano, una 17 β HSD non è ancora stata identificata in questo organismo.

2.1.3.5 Screening bioinformatico del genoma di *S. cerevisiae*

Diversi approcci potrebbero essere utilizzati per tentare di risalire all'enzima che, in *S. cerevisiae*, determina la trasformazione dell'AD in TS: ad esempio una laboriosa purificazione dell'enzima che dimostri l'attività voluta e consenta la successiva identificazione della sequenza proteica. Un sistema relativamente più semplice è rappresentato da uno studio bioinformatico del genoma del lievito, alla ricerca di sequenze proteiche omologhe a delle 17 β HSD note.

Come precedentemente descritto le 17 β HSD, appartenenti alla categoria delle *short chain deidrogenase/reductase* (SDR), sono caratterizzate da alcuni *pattern* specifici, spesso non contemporaneamente presenti (paragrafo 2.1.3.1). Nell'uomo invece le due 17 β HSD responsabili della trasformazione di AD in TS, in questa direzione, sono la tipo 3 e la tipo 5. Ricercando nel genoma di lievito proteine omologhe a questi enzimi umani, o che possedano contemporaneamente i quattro

patterns tipici delle 17 β HSD, sono stati individuate una serie di sequenze proteiche schematizzate in Figura 2.14.

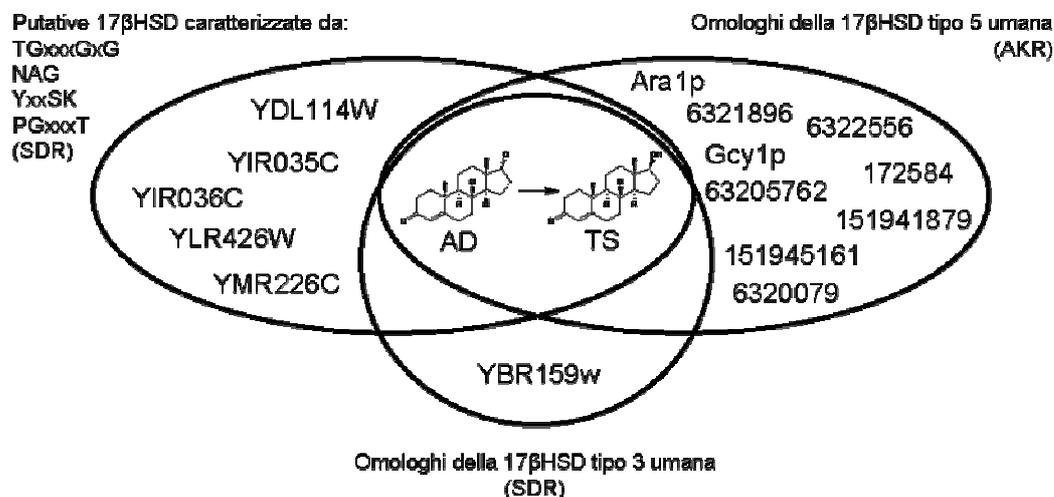


Figura 2.14

Schema riassuntivo delle sequenze proteiche (nome o *protein number*) identificate nel genoma di *S.cerevisiae* omologhe delle 17 β HSD tipo 3 e 5 umane o contenenti i *patterns* tipici delle 17 β HSD. Analisi condotta mediante appositi programmi (<http://blast.ncbi.nih.gov/>).

Sono così state identificate una serie di putative 17 β HSD che in lievito potrebbero catalizzare la trasformazione desiderata. Il livello di omologia delle proteine identificate con le proteine umane è basso (<40%), tale da non consentire di identificare univocamente l'enzima responsabile della trasformazione di AD in TS. La proteina YBR159w, l'unica con un certo grado di omologia con la 17 β HSD di tipo 3 umana (identità 29%), è stata già oggetto di studio di Rizner *et al.* 2001⁶⁰ e considerata una putativa 17 β HSD. Tuttavia anche se viene dimostrata la presenza di attività 17 β -idrosteroidi deidrogenasica in *S. cerevisiae* nei confronti dell'AD e l'espressione del gene codificante per l'enzima YBR159w, non è chiaramente dimostrata l'associazione diretta tra l'enzima e l'attività osservata (Figura 2.15). Inoltre lavori successivi, associano a questo enzima un ruolo importante nel processo di sintesi degli acidi grassi e non nella sintesi di ormoni^{61, 62}.

Figura 2.15

A destra, ibridizzazione dell'RNA estratto da *S. cerevisiae* e separato su gel d'agarosio, mediante *probe* per il gene YBR159w (Northern blot). Sotto, stima dell'attività 17 β idrosteroido deidrogenasica con differenti substrati: androstendione (4-dione), testosterone (T), estrone (E1), estradiolo (E2). Immagini adattate⁶⁰.

Yeast species	Substrates			
	4-dione	T	E1	E2
<i>Candida tropicalis</i>	84.6	26.1	16.5	55.9
<i>Cryptococcus tsukubaensis</i>	39.1	16.1	4.6	28.7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98.4	26.4	36.4	19.4



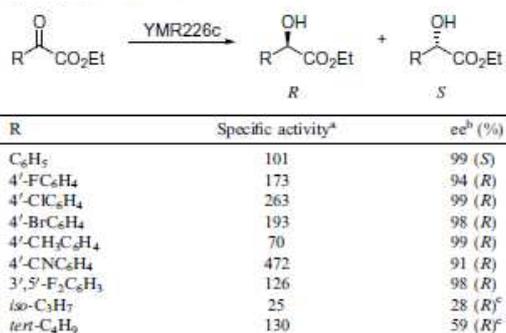
Altri prodotti genici individuati mediante l'analisi bioinformatica, rientrano in un ampio *screening* in cui viene testata l'attività reductasica di oltre 40 enzimi di *Saccharomyces cerevisiae*, in grado di ridurre il diacetile in acetone, alla ricerca di nuove chetoreductasi stereoselettive^{63, 64}. Tra quelli analizzati risultano anche alcuni degli enzimi individuati mediante la precedente analisi bioinformatica, come YMR226c, YBR149w, Gcy1, Ara1p, YIR035c e YIR036c.

Tra questi enzimi, il YMR226c è risultato come uno dei migliori enzimi chetoreducenti dotati di selettività, al punto che è stato in seguito espresso in forma ricombinante in *E.coli*, purificato⁶⁵ e ne è stata studiata la selettività nei confronti di una gamma molto ampia di substrati (elencati in Figura 2.16). È stata così evidenziata la sua particolare enantioselettività nella riduzione di acetofenoni aril-sostituiti, derivati α -acetofenonici, chetoni alifatici, α o β -chetoesteri e altri tipi di chetoni^{4, 65-67}.

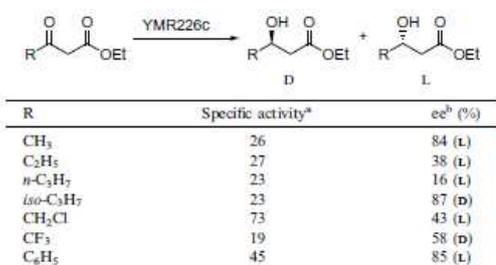
a)

Substrates ^a	YMR226C
L-Serine	100
D-Serine	71
2-Methyl-DL-serine	21
L-Threonine	2
D-Threonine	478
L- <i>allo</i> -Threonine	397
D- <i>allo</i> -Threonine	3
L-Glycerate	5
D-Glycerate	6
L-3-Hydroxyisobutyrate	182
D-3-Hydroxyisobutyrate	78
3-Hydroxypropionate	13
L-3-Hydroxybutyrate	85
D-3-Hydroxybutyrate	12

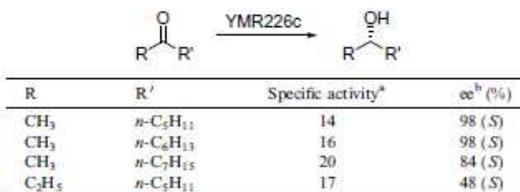
b)



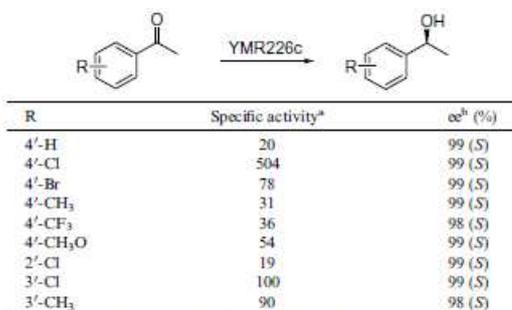
c)



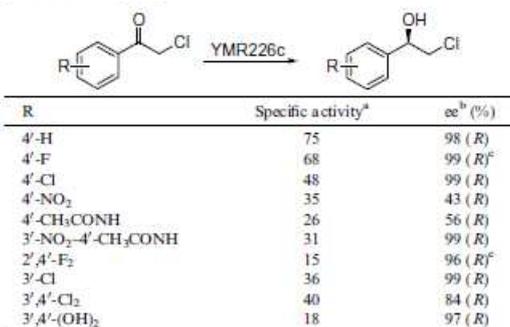
d)



e)



f)



g)

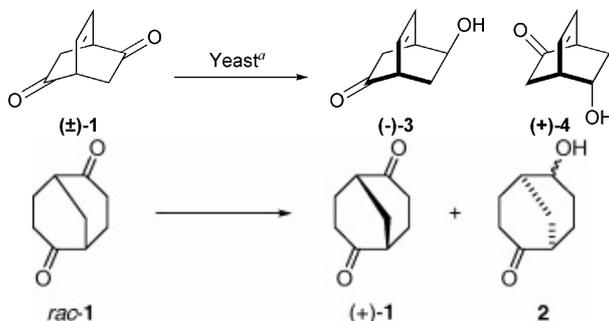


Figura 2.16

Studio della reattività della YMR226w nei confronti di diversi substrati: a) attività idrossilatica percentualmente espressa rispetto a un substrato standard (L-serina)⁶⁵; b) attività chetoreduttasica nei confronti di α-chetoesteri c) β-chetoesteri d) chetoni alifatici, e) chetoni acrilici, f) α-acetofenoni; L'attività specifica consiste in nmol di NADPH ossidati al minuto da un milligrammo di enzima⁴; g) risoluzione racemica di biciclo[3.3.1]nonane-2,6-dione e biciclo[2.2.2]octane-2,5-dione catalizzata dalla YMR226c^{66, 67}.

2.2 Scopo del progetto

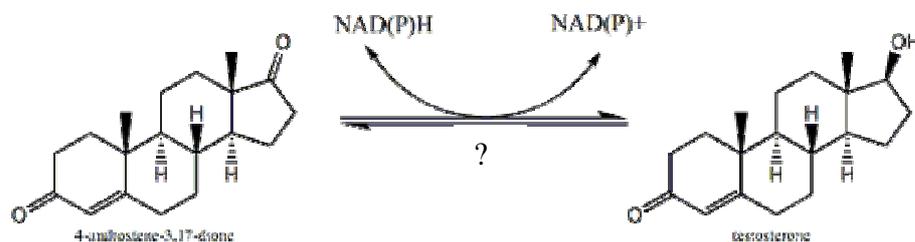


Figura 2.17

Sintesi chemoenzimatica del testosterone mediata da un enzima da definire.

Questo lavoro si prefigge l'obiettivo di individuare un enzima per catalizzare la sintesi stereo- e regio-selettiva del TS dall'AD su scala industriale (Figura 2.17). L'enzima, dunque, oltre a possedere (i) le caratteristiche di selettività necessarie per la conversione, deve possedere le proprietà necessarie per essere industrialmente utilizzabile, quindi (ii) catalizzare la reazione con un sufficiente efficienza, (iii) avere un'emivita sufficientemente lunga, (iv) resistere a condizioni di stress meccanico e fisico ed (v) essere di facile approvvigionamento.

La scelta di focalizzarci su un singolo enzima, invece che in un sistema di trasformazione mediante fermentazione con microrganismi, deriva dalla bassa resa e dalle difficoltà, in fase purificativa del prodotto TS, che questi sistemi determinano. Trattandosi poi di un prodotto ad uso farmacologico, diminuire il numero totale di elementi contaminanti alla fine della trasformazione riduce notevolmente i costi associati alla successive purificazioni del prodotto. L'uso di enzimi purificati consente di standardizzare il processo, evitando i problemi associati alla variabilità dei processi fermentativi con organismi viventi e consentendo di lavorare in condizioni anche non fisiologiche.

Mediante lo studio bibliografico precedentemente riportato è stato individuato nella 17 β HSD di tipo 5 murina un valido candidato per la sintesi stereo e regio selettiva del testosterone dall'androstendione in un contesto industriale, essendo l'enzima già stato in parte caratterizzato ed espresso in forma ricombinante, avendo dimostrato stabilità nella purificazione ed essendo potenzialmente regio-selettivo, oltre che stereo-selettivo. Non sono stati fatti studi sulla possibilità dell'enzima di ridurre il gruppo carbonilico dell'AD in posizione 3 (vedi Figura 2.7, con substrato diidrottestosterone⁵⁷): la *side reaction* che determina la

formazione del 3α -idrossi-4-androsten-17-one, o del $3\alpha,17\beta$ -diidrotosterone, costringerebbe ad una difficoltosa purificazione del testosterone voluto. Si è scelto, dunque, di produrre l'enzima in forma ricombinante e di caratterizzarlo al fine di determinare la sua applicabilità in ambito industriale.

Come seconda *chance*, si è scelto di esprimere in forma ricombinante anche un enzima tra quelli identificati in *S. cerevisiae*. Tuttavia non è possibile affermare, con sicurezza, quale sia realmente responsabile di questa trasformazione, ed è addirittura probabile che la reazione osservata in alcuni lavori, risulti come una *side reaction* di uno o più enzimi presenti nel lievito ma esclusi dall'analisi bioinformatica. Nell'impossibilità materiale di produrre tutti gli enzimi individuati mediante l'analisi bioinformatica in forma ricombinante, per poi osservarne la reattività con il substrato androstendione, si è scelto di esprimere comunque l'enzima YMR266c. Infatti esso rappresenta, tra tutte, l'unica chetoreduccasi con interessanti proprietà biocatalitiche già dimostrate. Perciò oltre ad essere una alternativa interessante all'enzima 17β HSD di tipo 5 murino, qual'ora non attivo sul substrato desiderato, l'enzima avrebbe potuto essere testato su substrati diversi dall'AD, rivelandosi comunque utile per possibili applicazioni chemoenzimatiche.

2.3 Risultati

2.3.1 Pianificazione dello studio

Al fine di valutare la possibile applicazione degli enzimi 17 β HSD di tipo 5 murina o YMR226c di *S.cerevisiae*, per la sintesi di TS a partire da AD, i due enzimi, non disponibili commercialmente, devono essere prodotti in forma ricombinante e purificati in quantità sufficienti per effettuare lo studio.

Il sistema di espressione di proteine in forma ricombinante nel batterio *E.coli* rappresenta una delle più comuni metodologie per ottenerne elevate quantità, sia a scopi scientifici che commerciali.

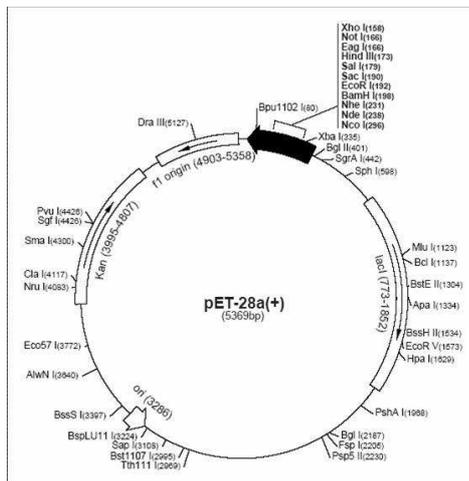
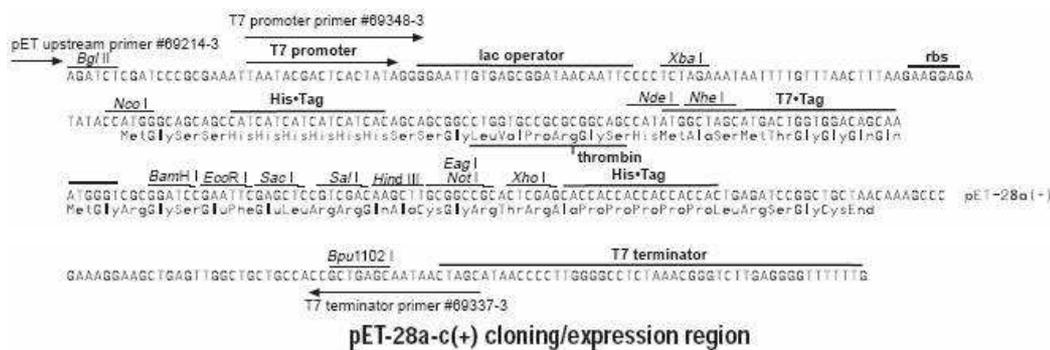


Figura 2.18
A sinistra, mappa del plasmide pET28a utilizzato per l'espressione degli enzimi. In evidenza, MCS, origine di replicazione (f1 origin e ori), resistenza alla kanamicina (kan), operone lattosio (lacI). Sotto, mappa dettagliata del MCS e delle regioni adiacenti.



Tra i molteplici vettori plasmidici utilizzati che possono essere utilizzati per l'espressione ricombinante in questo organismo, il plasmide pET28a (Invitrogen®) è stato scelto per le sue differenti proprietà (Figura 2.18): elevati livelli di espressione, resistenza all'antibiotico kanamicina, espressione inducibile

mediante β -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG), *multi cloning site* (MCS) con diversi siti di restrizione e la possibilità di aggiungere una sequenza di sei istidine al C- e/o all’N-terminale per purificare la proteina mediante cromatografia per affinità (IMAC).

2.3.2 Clonaggio degli enzimi

Entrambi gli enzimi sono stati clonati nel vettore pET28a (Novagen ®), al fine di esprimere le proteine in cellule di *E.coli* BL21, nella loro forma nativa (NT) e modificata con l’aggiunta di una coda di sei istidine (*his-tag*, HT) al fine di facilitarne l’isolamento in fase di purificazione.

Per l’enzima 17 β -HSD5 di topo, la coda di istidine è stata posizionata all’N-terminale dal momento che la struttura risolta dell’omologo enzima umano rileva la vicinanza della regione C-terminale al sito attivo dell’enzima: per evitare dunque l’occlusione dei canali d’ingresso dei substrato e del cofattore la coda istidinica è stata posizionata lontana da questi, all’N terminale.

Per l’enzima di lievito, pur non disponendo di strutture omologhe risolte, la prossimità dei residui costituenti il sito attivo (TGASAGIG) all’ N-terminale, ha spinto a posizionare la coda istidinica all’C-terminale, al fine di ridurre possibili interazioni tra questo e il sito attivo (Figura 2.19).

```
MSQGRKAAERLAKKT'VLIITGASAGIGKATALEYLEASNGDMKLIILAARRLEKLEELK'KTI 60
DQEF'PN'AKVHVAQLDITQAEKIKPFIE'NLPQEFKDIDILVNNAGKALGSDR'VGQIATEDI 120
QDVF'DTNVTALINITQAVLPIFQAKNSGDIVNLGSIAGRDAYPTGSIYCASKFAVGA'FTD 180
SLR'KELINTKIRVILIA'PGLVETEFSLVRYRGNEEQAKNVYKDTT'PLMADDVADLIVYAT 240
SRKQNTVIADTLIFPTNQASPHHIFRG 267
```

Figura 2.19

Sequenza amminoacidica dell’enzima YMR226c. In evidenza la regione che soddisfa il pattern PS00061 (sottolineato) tipico delle *short-chain dehydrogenase/reductase* (SDR), e alcune *patterns* tipici delle 17 β HSDs, come descritto nel paragrafo 2.1.3.1 (TGxxxGxG, NAG, YxxSK, PGxxxT, evidenziati).

2.3.2.1 17 β -HSD5 di topo in forma nativa

La sequenza di cDNA codificante per l’enzima 17 β -HSD5 di topo (Akr1c6, GeneID: 83702) è stata ottenuta da una libreria di cDNA di topo (ImaGene,

GmbH, Berlino, Germania) contenuta nel plasmide pCMVsport6 clonata tra i promotori sp6 e T7; questi sono stati utilizzati per verificare la correttezza della sequenza sia della regione codificante che delle regioni immediatamente adiacenti al 5' e al 3' (sequenziamento eseguito da BRM genomics, Padova, Italia). Sulla sequenza ottenuta sono stati disegnati i *primers* di amplificazione per il clonaggio. Il clonaggio utile all'espressione della proteina in forma nativa, in questo primo caso, è consistito nell'inserimento della sequenza nel plasmide pET28 mediante i siti di restrizione NcoI e NdeI. Il procedimento di clonaggio è descritto in Materiali e Metodi e i principali controlli mostrati in Figura 2.20.

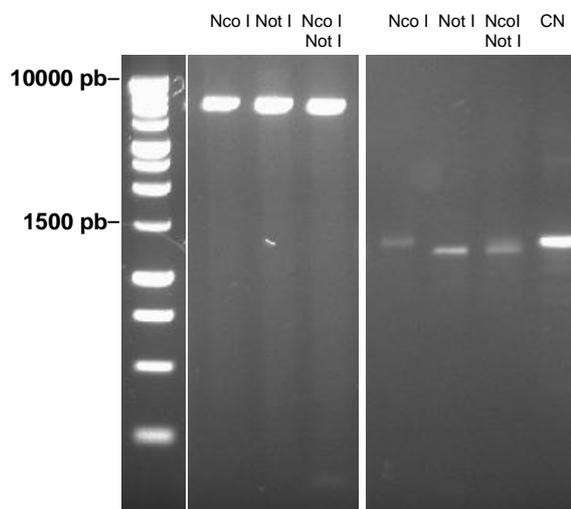
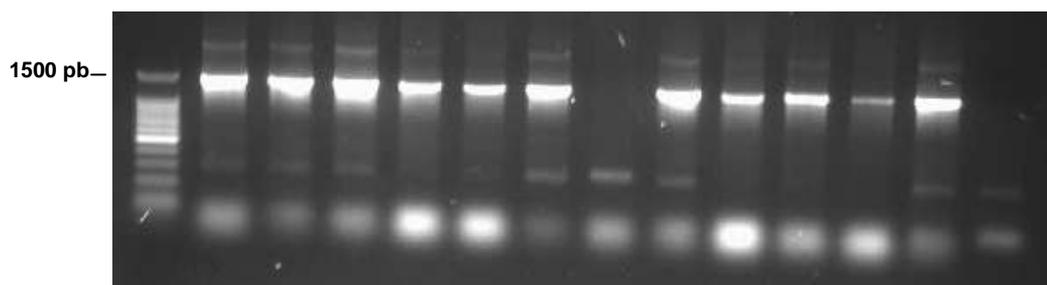


Figura 2.20

Di lato, digestione con enzimi Nco I e Not I rispettivamente del plasmide pET28a, a sinistra, e del frammento amplificato mediante PCR codificante per la 17 β HSD5, a sinistra. Sotto, *full colony* PCR per identificare le colonie contenenti la sequenza voluta. Per i dettagli fare riferimento a Materiali e Metodi.



2.3.2.2 17 β -HSD5 di topo in forma *Histidine Tagged*

Al fine di aggiungere sei istidine all'N-terminale dell'enzima, la sequenza codificante per la 17 β -HSD5 è stata inserita nel plasmide pET28a tra i siti NdeI e NotI. I dettagli del clonaggio sono descritti su Materiali e Metodi e i principali controlli mostrati in Figura 2.21. Dalla traduzione della sequenza corretta è

prevista la traduzione di una proteina di fusione con il peptide Met-Gly-Ser-Ser-His-His-His-His-His-His-Ser-Ser-Gly-Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-His, contenente le sei istidine e una regione di riconoscimento per il taglio proteolitico della trombina (sottolineato), che precede l'iniziale metionina dell'enzima.

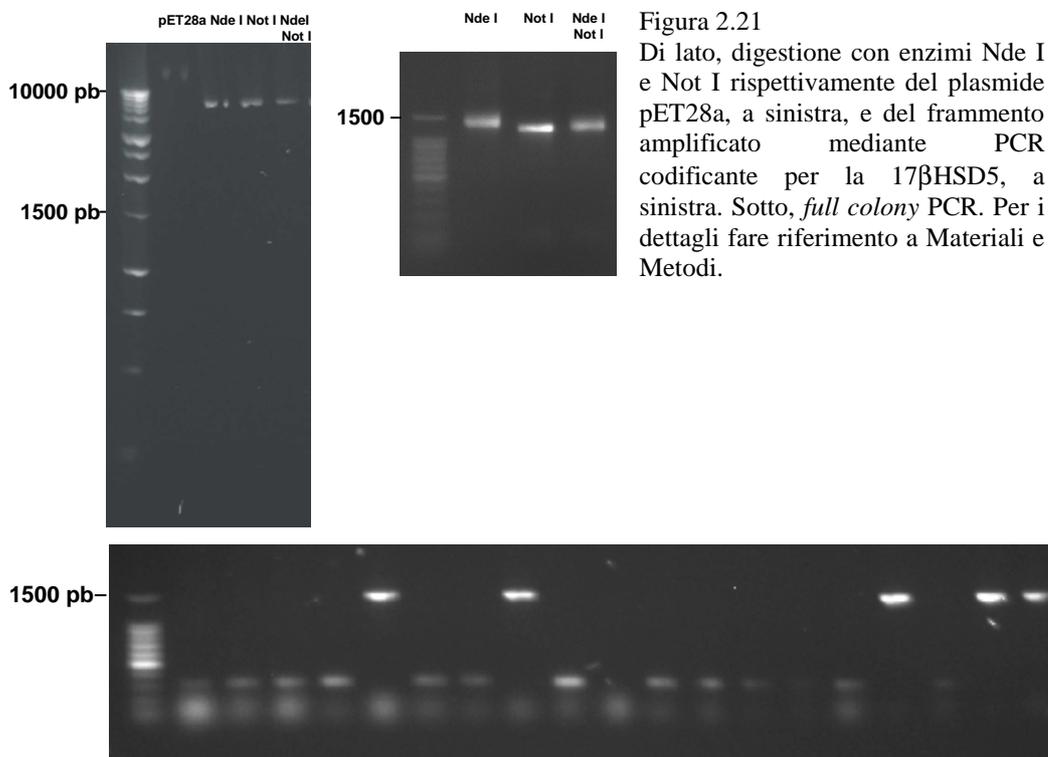


Figura 2.21

Di lato, digestione con enzimi Nde I e Not I rispettivamente del plasmide pET28a, a sinistra, e del frammento amplificato mediante PCR codificante per la 17 β HSD5, a sinistra. Sotto, *full colony* PCR. Per i dettagli fare riferimento a Materiali e Metodi.

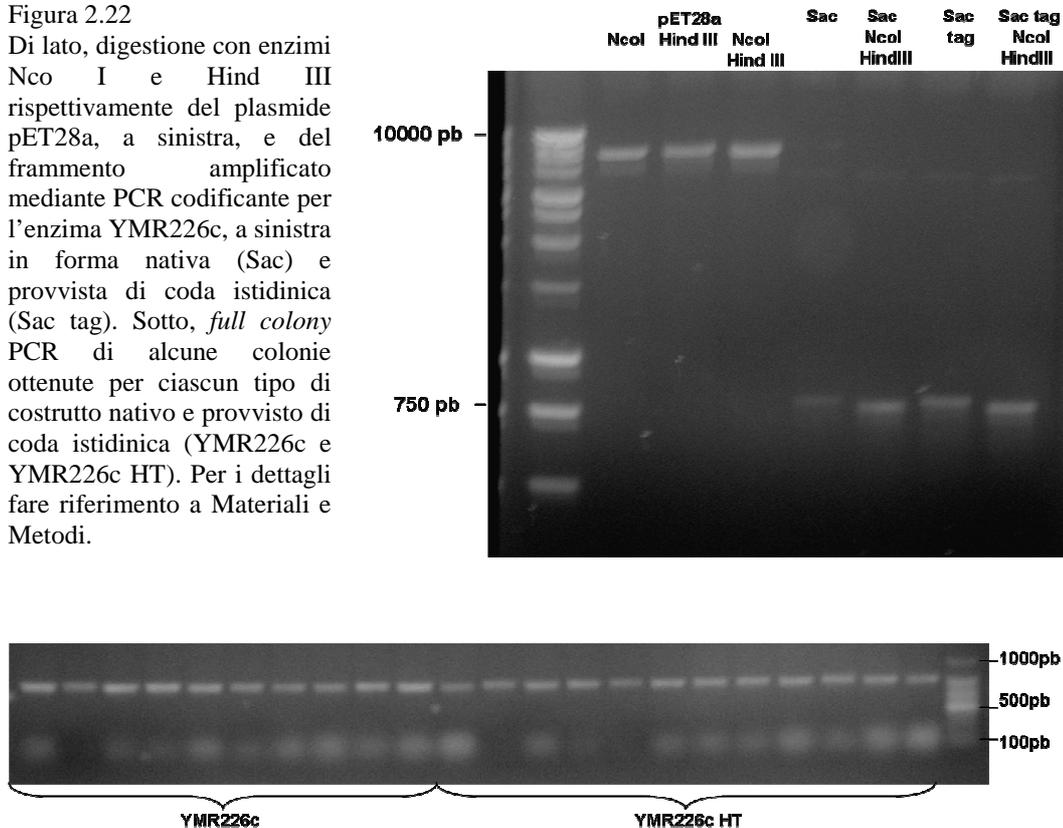
2.3.2.3 Clonaggio di YMR226c in forma nativa e HT

Come anticipato, anche il cDNA codificante per l'enzima YMR226c è stato clonato nel plasmide pET28a per l'espressione in forma nativa o provvista di coda istidinica C-terminale, entrambe inserite tra i siti NcoI e Hind III. La sequenza codificante per l'enzima YMR226c è stata amplificata mediante PCR direttamente dall'estratto genomico di *S.cerevisiae*, gentilmente fornito dalla Prof.ssa G. Carignani (Dip. Chimica Biologica, Università di Padova). I dettagli del clonaggio di entrambi i costrutti sono descritti in Materiali e Metodi mentre i principali controlli effettuati sono mostrati in Figura 2.22. Nel caso della forma HT, la soppressione del codone di stop determina l'estensione della sequenza amminoacidica C-terminale dell'enzima con il peptide Lys-Leu-Ala-Ala-Ala-Leu-

Glu-His-His-His-His-His, codificata dal plasmide pET28a e caratterizzato da uno *spacer* che separa l'enzima dalla coda di sei istidine (vedi Figura 2.18).

Figura 2.22

Di lato, digestione con enzimi Nco I e Hind III rispettivamente del plasmide pET28a, a sinistra, e del frammento amplificato mediante PCR codificante per l'enzima YMR226c, a sinistra in forma nativa (Sac) e provvista di coda istidinica (Sac tag). Sotto, *full colony* PCR di alcune colonie ottenute per ciascun tipo di costruito nativo e provvisto di coda istidinica (YMR226c e YMR226c HT). Per i dettagli fare riferimento a Materiali e Metodi.



2.3.3 Espressione degli enzimi

L'espressione degli enzimi ricombinanti a seguito dell'induzione, sia in forma nativa che provvista di coda istidinica, è stata valutata inizialmente mediante l'analisi SDS-PAGE. Sono stati esaminati campioni raccolti a tempi differenti, dopo induzione dell'espressione a diversi livelli di densità ottica (O.D.) della coltura batterica e a differenti concentrazioni di induttore utilizzato (IPTG). Parallelamente è stata anche valutata qualitativamente l'eventuale tossicità causata dall'espressione delle proteine ricombinanti nelle diverse condizioni utilizzate, osservando il livello di crescita cellulare raggiunto.

I risultati ottenuti con la 17HSD5 di topo mostrano un'efficiente espressione dell'enzima in tutte le condizioni testate, sia per quanto riguarda la sua forma nativa (~37 KDa), sia per la forma provvista di coda di istidine (~39.2 KDa),

come osservabile in Figura 2.23 dove sono mostrate solo alcune delle condizioni usate.

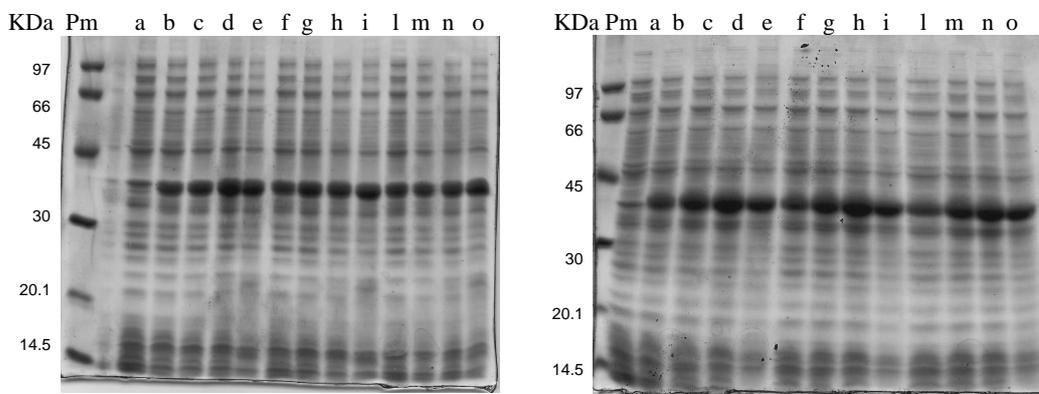


Figura 2.23

A sinistra, analisi SDS-PAGE dell'estratto grezzo di cellule di *E.coli* BL21 contenenti il costrutto per l'espressione della 17βHSD5 di topo in forma nativa (~37 KDa), indotte ad OD:0.85 con 0.1 mM di IPTG e raccolte rispettivamente dopo 0 (a), 1 (b), 2 (c), 4 (d), 10 (e) ore dall'induzione; con 0.5 mM di IPTG e raccolte dopo 1 (f), 2 (g), 4 (h), 10 (i) ore; con 1 mM IPTG e raccolte dopo 1 (l), 2 (m), 4 (n), 10 (o) ore. A destra, la corrispettiva analisi per il costrutto HT (~39.2 KDa).

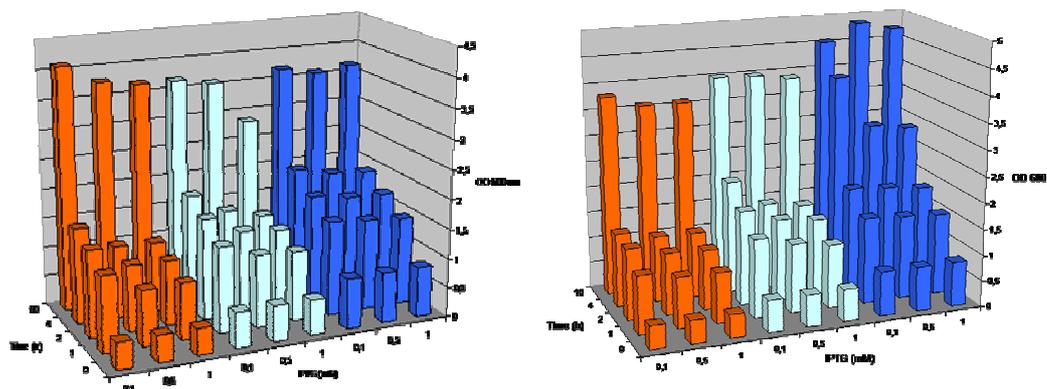


Figura 2.24

A sinistra, densità ottica (O.D.) a 600 nm della coltura cellulare di *E. coli* BL21 contenenti il costrutto per l'espressione della 17HSD5 di topo in forma nativa, indotta rispettivamente a O.D: 0.4 (■), 0.6 (■) e 0.85 (■), con diverse concentrazioni di IPTG; il tempo è riferito dall'induzione. A destra, la corrispettiva analisi per il costrutto HT.

Come spesso accade, la sovraespressione di una proteina ricombinante implica un incremento del carico anabolico per le cellule utilizzate, con il conseguente decremento della velocità di crescita cellulare e della totale biomassa ottenuta: per questo motivo le diverse condizioni utilizzate sono state parallelamente analizzate sotto il profilo della densità cellulare ottenuta, al fine di individuare le migliori condizioni che rendano la maggior quantità possibile di biomassa, e quindi la quantità maggiore di enzima (Figura 2.24). L'analisi

suggerisce che indurre l'espressione proteica con una concentrazione cellulare iniziale elevata (O.D.:0.85), consente di ottenere la maggior densità cellulare a parità di tempo. Se si associa poi l'utilizzo di una bassa concentrazione di IPTG (0.1mM) e tempi di induzione lunghi (10 h), si ottengono le condizioni economicamente più vantaggiose in termini di rapporto biomassa/IPTG utilizzato. Questo è generalmente valido per entrambi i costrutti in forma NT e HT.

L'analogo studio condotto per l'espressione dell'enzima YMR226c ha dato invece risultati diversi, in particolare riguardo i livelli di espressione dell'enzima rispetto al contenuto proteico totale delle cellule.

KDa Pm a b c d e f g h i l KDa Pm a b c d e f g h i l

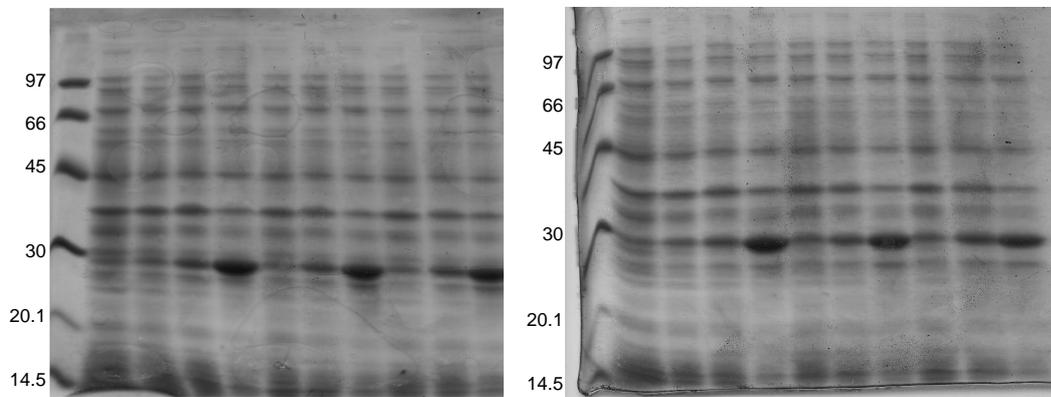


Figura 2.25

A sinistra, analisi SDS-PAGE dell'estratto grezzo di cellule di *E.coli* BL21 contenenti il costrutto per l'espressione della YMR226c di *S.cerevisiae* in forma nativa (~29 KDa), indotte ad OD:0.85 con 0.1 mM di IPTG e raccolte rispettivamente dopo 0 (a), 1 (b), 4 (c), 17 (d) ore dall'induzione; con 0.5 mM di IPTG e raccolte dopo 1 (e), 4 (f), 17 (g) ore; con 1 mM IPTG, raccolte dopo 1 (h), 4 (i), 17 (l) ore. A destra, la corrispettiva analisi per il costrutto HT (~30.6 KDa).

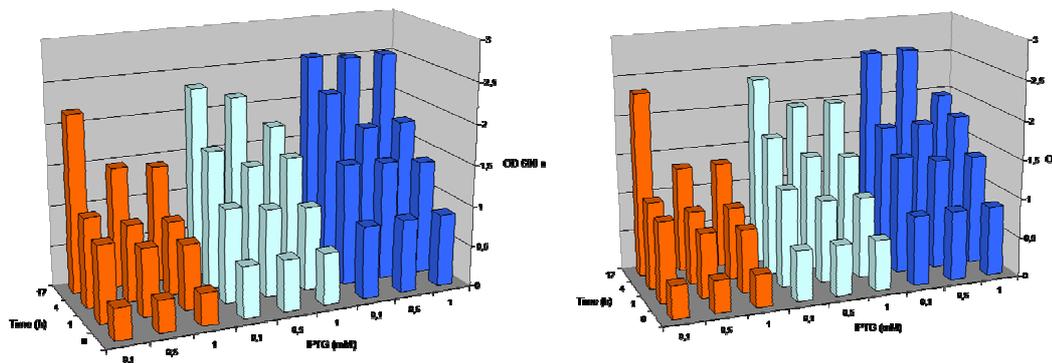


Figura 2.26

A sinistra, densità ottica (O.D.) a 600 nm della coltura cellulare di *E. coli* BL21 contenenti il costrutto per l'espressione dell'enzima YMR226c di *S.cerevisiae* in forma nativa, indotta rispettivamente a O.D: 0.4 (■), 0.6 (□) e 0.85 (■), con diverse concentrazioni di IPTG; il tempo è riferito alle ore dall'induzione. A destra, la corrispettiva analisi per il costrutto HT.

Come si può infatti osservare in Figura 2.25, ma appare anche per tutte le altre condizioni testate, l'espressione dell'enzima, sia in forma nativa (~29 KDa) che coniugata alla coda di istidine (~30.6 KDa) è significativa solo dopo diverse ore dall'induzione.

Anche la crescita cellulare dopo induzione appare rallentata rispetto a quanto si verifica per l'espressione dell'enzima murino (Figura 2.26). Si confermano però, anche in questo caso, che le migliori condizioni di fermentazione sono rappresentate da un'induzione ad elevata densità ottica (O.D.:0.85), con una bassa concentrazione di IPTG (0.1mM) e raccolta dopo crescita *overnight*, per entrambi i costrutti della YMR226c.

2.3.4 Studio dell'attività enzimatica

Dopo una preliminare fase di studio dell'espressione enzimatica, che ha permesso di individuare le condizioni ideali di induzione e ha verificato l'effettiva espressione degli enzimi, una successiva indagine ha analizzato l'attività degli enzimi prodotti in forma ricombinante.

2.3.4.1 L'attività della 17 β HSD5 murina

La riduzione di androstendione in testosterone da parte dell'enzima 17 β HSD5 implica l'utilizzo del cofattore in forma ridotta NADPH, come descritto nell'introduzione (paragrafo 2.1.3.1). Un semplice test per osservare se l'enzima ricombinante è stato espresso in forma attiva è rappresentato da un'analisi spettrofotometrica a 360 nm di una soluzione contenente NADPH e androstendione, a cui viene aggiunto l'enzima: se l'enzima è attivo, cioè in grado di catalizzare la riduzione dell'androstendione in testosterone, dovrà essere in grado di ossidare il NADPH in NADP⁺, che a differenza della forma ridotta non assorbe a 360 nm. La catalisi determina dunque un consumo del NADPH, come rappresentato in Figura 2.27 e di conseguenza la riduzione della sua concentrazione, così come del livello di assorbimento a 340 nm.

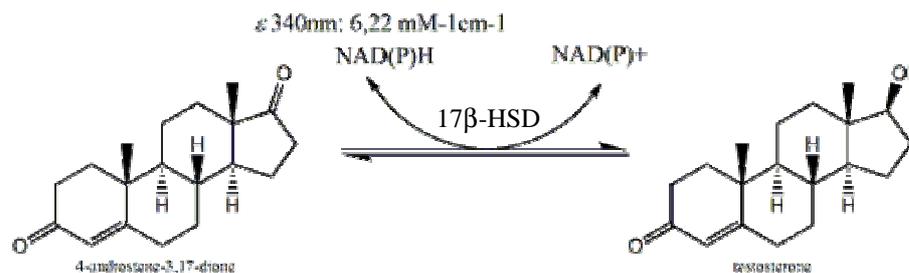


Figura 2.27

Trasformazione catalizzata dalla 17 β HSD5 murina.

Ne deriva che la preparazione di una frazione solubilizzata, o meglio, purificata dell'enzima rappresenta uno step necessario per determinare se è stata espressa in forma attiva. Dopo l'induzione della coltura alle condizioni individuate precedentemente, la fase iniziale di purificazione dell'enzima, in entrambe le forme, consiste nella separazione delle proteine solubili da quelle insolubili mediante rottura cellulare e successiva centrifugazione. Entrambi le componenti sono state analizzate mediante SDS-PAGE (Figura 2.28) e dimostrano come l'enzima desiderato, sia presente in parte in forma solubile e in parte in forma insolubile, probabilmente aggregato in corpi di inclusione. Questo rappresenta spesso un effetto indesiderato quando si sovraesprime una proteina, che può essere determinato da molteplici motivi. Tuttavia la componente solubile dell'enzima 17 β HSD5 rappresenta ancora la componente proteica più consistente nella frazione isolata. Questa frazione, parzialmente purificata dalle proteine insolubili e di membrana nonché delle componenti lipidiche e delle pareti cellulari, è stata utilizzata per un'analisi spettrofotometrica al fine di osservare il consumo di NADPH in presenza del substrato androstendione (Figura 2.29). Come controllo negativo è stato utilizzata la frazione solubile derivante da cellule trasformate con il plasmide pET28a vuoto, indotte parallelamente. Quello che subito appare dal confronto tra gli estratti contenenti l'enzima 17 β HSD5 NT o HT e il controllo negativo, è rappresentato da un più rapido consumo del cofattore in presenza degli enzimi ricombinanti, che procedono con velocità analoghe. Tuttavia anche il controllo negativo determina una riduzione del NADPH in funzione del tempo, effetto determinato da due diversi fattori: l'autossidazione del cofattore e l'utilizzo del cofattore da parte di altri enzimi batterici residui NADPH dipendenti, in presenza di altri substrati presenti nella frazione solubilizzata.

Il consistente consumo di cofattore di quest'ultima frazione ha spinto ad isolare l'enzima 17β HSD5, in particolare la sua forma HT, purificabile più facilmente, al fine di valutare la reale velocità di consumo di cofattore determinata dall'enzima, e quindi la sua velocità di sintesi del TS. L'enzima in forma HT è stato purificato mediante una cromatografia IMAC ed analizzato SDS-PAGE come osservabile in Figura 2.28. L'analisi spettrofotometrica ha successivamente permesso di valutare il consumo di cofattore determinato solo dall'enzima in forma purificata (Figura 2.29), sensibilmente più rapido rispetto all'autossidazione del NADPH.

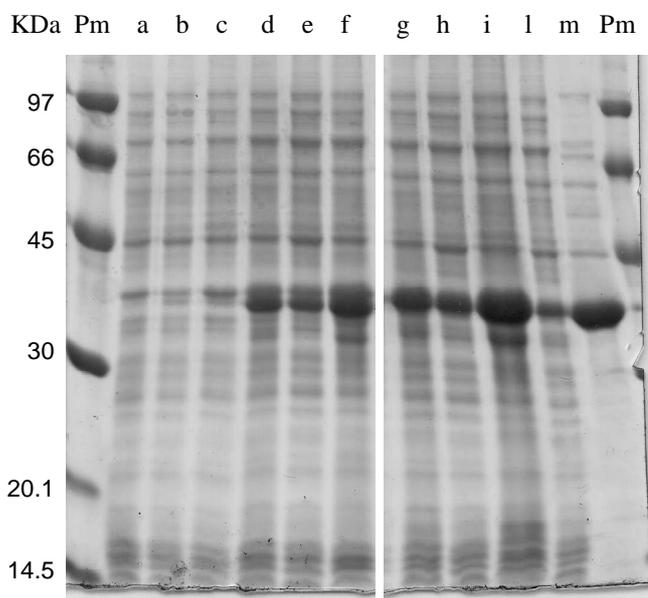


Figura 2.28

Analisi SDS-PAGE dei passaggi di solubilizzazione e purificazione della 17β HSD5. Sono stati caricati i seguenti campioni: pesi molecolari (Pm), cellule *E.coli* BL21 trasformate con il plasmide pET28a senza inserto ed indotte (a), relativa frazione solubile (b), relativa frazione insolubile (c), cellule *E.coli* BL21 intere esprimenti l'enzima in forma nativa di ~ 37 KDa (d), la relativa componente solubile (e), la relativa componente insolubile (f), cellule *E.coli* BL21 intere esprimenti l'enzima in forma HT di ~ 39.2 KDa (g), relativa frazione solubile (h), relativa frazione insolubile (i), flow through IMAC (l), eluato (m).

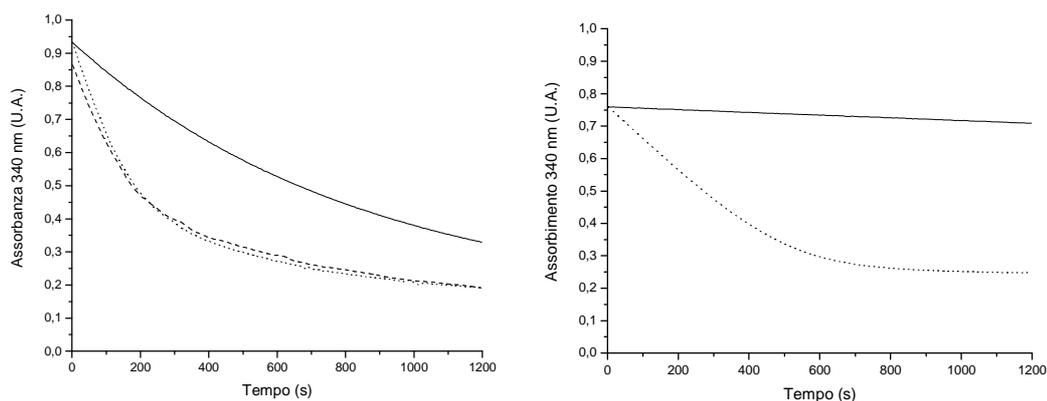


Figura 2.29

Studio cinetico della riduzione dell'AD dopo l'aggiunta dell'enzima 17β HSD5. A destra, assorbimento a 340 nm, in funzione del tempo, di una soluzione satura di AD in presenza di NADPH 0.2 mM dopo l'aggiunta della frazione solubilizzata di cellule *E.coli* BL21 contenenti il plasmide vuoto (—), la frazione solubilizzata di cellule esprimenti la 17β HSD5 in forma nativa (.....) o in forma HT (---). A destra, studio effettuato utilizzando una soluzione analoga senza (—) o con l'aggiunta della frazione eluita dell'enzima in forma HT (.....).

I risultati ottenuti hanno chiaramente mostrato che l'enzima 17β HSD5, sia NT che HT, è espresso in forma attiva e quindi, almeno in parte, correttamente foldato. La presenza di una componente non solubile dimostra che vi sia un'eccessiva quantità di proteina espressa o non foldata, che forma aggregati insolubili. La semplice frazione solubile, poi, seppur in grado di consumare il cofattore con velocità superiori rispetto al controllo negativo, presenta inevitabilmente una componente di *side reactions* non indifferente rispetto all'attività delle 17β HSD5, come il controllo negativo stesso dimostra. La purificazione si presenta dunque come un passaggio fondamentale per osservare il consumo del cofattore determinato dalla sola sintesi del TS da parte della 17β HSD5 in forma HT.

2.3.4.2 L'attività della YMR226c

In modo analogo lo stesso studio è stato effettuato su colture batteriche cresciute *overnight* esprimenti l'enzima YMR226c in forma NT e HT, dopo induzione ad elevate densità cellulari (OD:0.85) e basse concentrazioni di IPTG (0.1mM). Anche in questo caso le varie frazioni, solubili e non, sono state analizzate mediante SDS-PAGE (Figura 2.30). Tuttavia in questo caso la frazione solubilizzata, in entrambi i costrutti, è priva di enzima YMR226c, che rimane

completamente nella frazione insolubile. Si riconfermano le difficoltà per la sovraespressione di questo enzima: come precedentemente osservato non solo il prodotto ricombinante appare in quantità modeste dopo molto tempo dall'induzione, ma sembra anche completamente aggregato in corpi di inclusione generati probabilmente da enzima espresso in forma non strutturata correttamente.

Per ovviare a questo effetto l'induzione e la successiva crescita cellulare è stata effettuata a 16°C, cosa che ha permesso di ottenere una frazione di proteina in forma solubile: rallentare il metabolismo cellulare determina anche un allungamento dei tempi nella sintesi proteica e nel *folding*, permettendo di ottenere dell'enzima in forma correttamente foldata e solubile, idea adottata anche nella pubblicazione di Yang *et al.* 2004⁴. Questa strategia ha consentito di ottenere entrambe le forme solubili e in quantità discreta. La forma HT è stata anche purificata mediante IMAC (Figura 2.30).

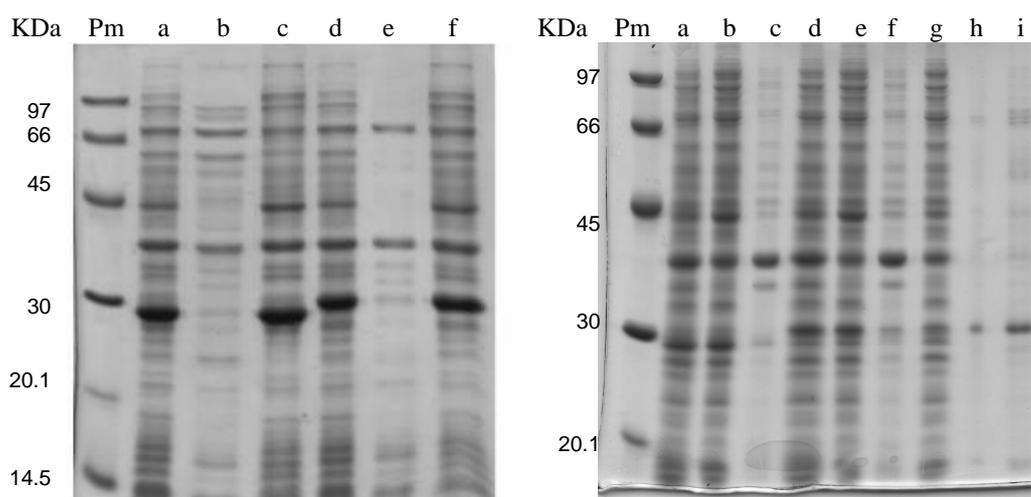


Figura 2.30

A sinistra, analisi SDS-PAGE dell'espressione a 37°C e parziale purificazione della YMR226c nelle condizioni di induzione descritte. A destra, analisi analoga dell'espressione indotta a 16°C. I campioni caricati sono rispettivamente: le cellule intere esprimenti l'enzima in forma nativa (~29 KDa) (a), relativa frazione solubile (b), relativa frazione insolubile (c), cellule intere esprimenti l'enzima in forma HT (~30.2 KDa) (d), relativa frazione solubile (e), relativa frazione insolubile (f) relativo *flow through* (g) e eluito 1X (h) e 3X (i).

Prima di testare l'ipotizzata attività 17 β -idrosteroidoide reduttasica nei confronti dell'AD, è stata verificata l'attività dell'enzima con un suo substrato noto, la L-serina, come descritto nel lavoro di Yang *et al.* 2004⁴. In questo caso si è andati ad analizzare mediante spettrofotometro la formazione di NADPH, unico cofattore

accettato dall'enzima, monitorando l'assorbimento a 340 nm di una soluzione di L-serina e NADP a cui è stata aggiunta la frazione solubilizzata dell'enzima YMR226c NT o HT e, successivamente, anche una frazione di enzima in forma HT purificata (Figura 2.31).

In tutti i casi è stata osservata l'attività enzimatica cioè è stata osservata la formazione di NADPH a partire da NADP⁺, determinata dall'ossidazione della L-serina da parte dell'enzima YMR226c. L'attività dell'enzima in forma purificata è stata stimata di ~0.064 U/mg. Tuttavia, utilizzando l'enzima in forma purificata in una soluzione contenente NADPH e AD, non è stato osservato un consumo significativo di cofattore rispetto all'autossidazione dello stesso cofattore, ad indicare un'insignificante ossidazione di questo da parte dell'enzima e quindi la mancata trasformazione dell'AD in TS (immagine omessa).

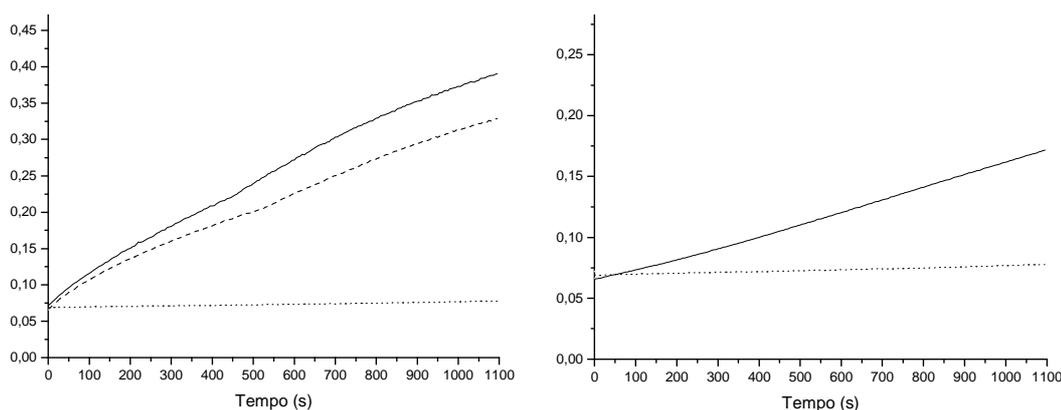


Figura 2.31

Studio dell'attività ossidativa della YMR226c con il substrato L-serina. A destra assorbanza a 360 nm in funzione del tempo di una soluzione di L-serina 0.2 M, NADP⁺ 1 mM (.....), a cui viene aggiunta la frazione solubilizzata dell'enzima in forma nativa (—) o in forma HT(---). A destra, analisi analoga dopo l'aggiunta dell'enzima in forma HT dopo la purificazione (—).

2.3.4.3 Approfondimento dello studio sulla 17 β HSD5 HT murina

I risultati precedenti hanno spinto ad approfondire lo studio dell'enzima 17 β HSD5 in forma HT, l'unico che sembra poter essere utilizzato effettivamente in un'applicazione di sintesi del TS, dal momento che la corrispondente forma nativa è difficilmente purificabile, mentre l'enzima di lievito, prodotto del gene YMR226c, non sembra in grado di ridurre l'AD.

Una preparazione effettuata su due litri di coltura ha permesso di ottenere diversi milligrammi (~210 mg) di enzima 17 β HSD5 HT in forma pulita, come dimostrato in Figura 2.32 e dai dati relativi a questa prima preparazione in scala medio-piccola, descritta in Tabella 2.5 (preparazione 1). L'enzima appare strutturato in dimeri come dimostrato dall'analisi mediante gel filtrazione, che evidenzia un'unica proteina di circa 80 KDa. È inoltre stato osservato lo spettro di assorbimento dell'enzima ricombinante, caratterizzato da un picco ~330 nm (oltre al tipico picco di assorbimento delle proteine a 280 nm) e un picco meno intenso e più ampio a circa 400 nm dovuto ad una molecola che conferisce all'eluato proteico un caratteristico colore giallo chiaro. L'origine del particolare assorbimento non è chiaro e non è stato oggetto di indagine, tuttavia si sospetta una co-purificazione di qualche specie molecolare, come il NAD(P)H stesso che potrebbe dare questo spettro in forma associata all'enzima.

L'enzima purificato possiede un'attività di 0.0725 U/mg, stima effettuata osservando il consumo di cofattore NADPH nel tempo in presenza di AD, come precedentemente descritto. In letteratura non è descritta quale sia l'attività catalitica dell'enzima espresso in forma ricombinante, tuttavia dei dati sono forniti per le due isoforme purificate da tessuto nel lavoro di Hara *et al.* 1987² (Tabella 2.3) che possiedono rispettivamente dei valori di 0.25 e 0.92 U/mg. Dei margini di miglioramento dell'attività specifica per l'enzima espresso in forma ricombinante sono, dunque, ancora ipotizzabili.

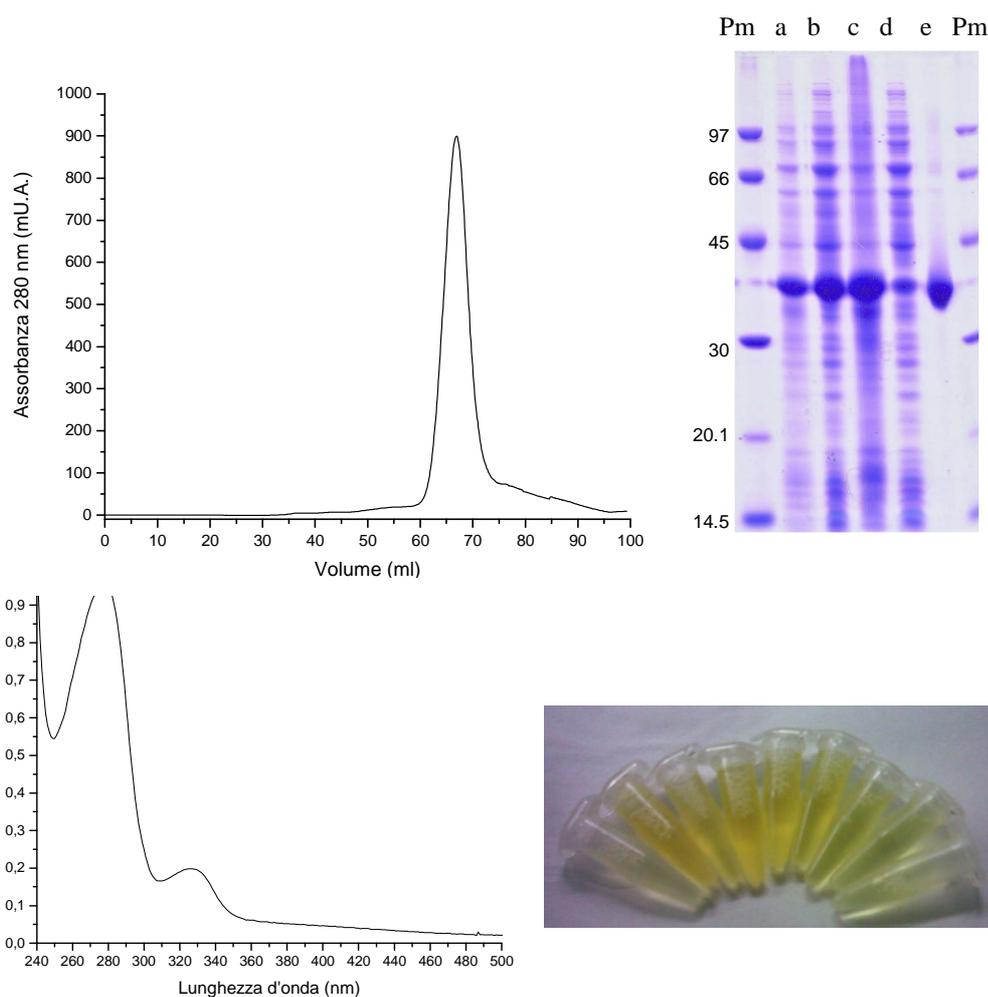


Figura 2.32

In alto, a destra, analisi SDS-PAGE della purificazione della $17\beta\text{HSD5 HT}$ espressa in forma ricombinante. I campioni caricati sono: pesi molecolari (Pm), grezzo cellulare (a), frazione solubilizzata (b), frazione insolubile (c), flow through IMAC (d) ed eluito 2x (e). In alto, a sinistra, analisi mediante gel filtrazione (Superdex 75). Sotto a destra, frazioni raccolte contenenti la $17\beta\text{HSD5 HT}$. Sotto a sinistra, spettro UV/vis. della eluizione.

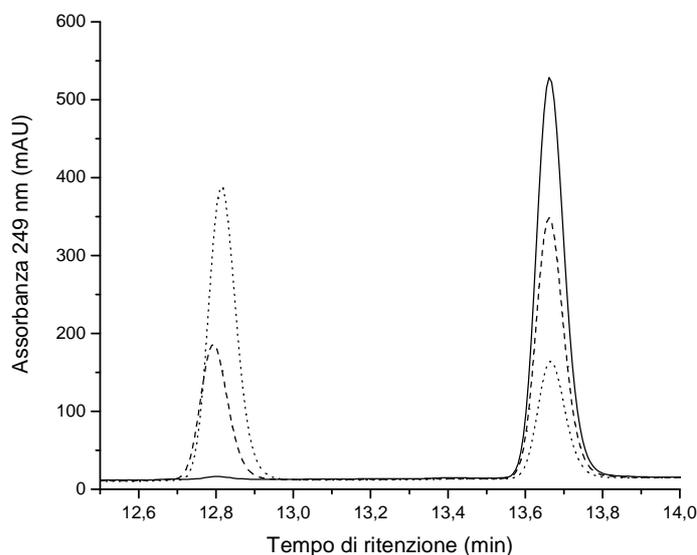
L'analisi spettrofotometrica di consumo del cofattore rappresenta un sistema veloce per valutare le caratteristiche cinetiche dell'enzima, tuttavia non fornisce alcuna informazione riguardo la regio- e la stereo-selettività dell'enzima nella riduzione dell'AD.

Per chiarire dunque questo punto è stata condotta un'analisi HPLC. In particolare, è stata misurata l'assorbanza nel tempo di una miscela contenente NADPH, AD ed enzima $17\beta\text{HSD5 HT}$ a 249 nm, lunghezza d'onda alla quale assorbono sia il substrato AD e il prodotto TS (Figura 2.33). Il risultato ottenuto

mostra chiaramente come l'AD venga effettivamente convertito solo in TS: nessuna altra specie è stata osservata formarsi parallelamente al TS, dimostrando l'assoluta stereo e regio selettività della catalisi.

Figura 2.33

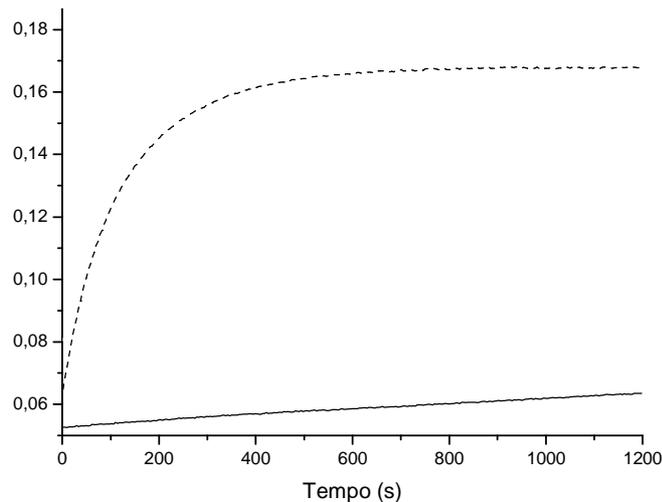
Analisi HPLC al tempo 0 (—), 30 min. (---) e 60 min. (·····), condotta su una soluzione satura di AD, 10 mM NADPH a cui è stato aggiunto l'enzima 17 β HSD5 HT. Il tempo di ritenzione dell'AD è di ~13.65 min. mentre quello del TS di ~12.8 min.



Valutata la reale capacità dell'enzima di catalizzare la conversione desiderata, una serie di analisi successive hanno permesso di confermare alcune caratteristiche di questo enzima già note in letteratura, e di esaminarne altre al fine di valutare la sua applicabilità industriale.

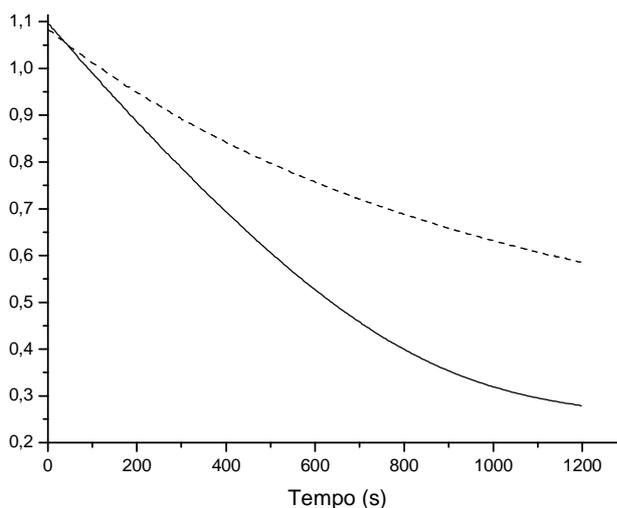
In primo luogo è stata confermata l'abilità dell'enzima di catalizzare la reazione inversa, da TS a AD, mediante una conversione equimolare del NADP⁺ a NADPH come già dimostrato in letteratura^{2, 3, 57, 58}. Ad una soluzione contenente TS saturo e NADP⁺ è stato aggiunto l'enzima ed osservato l'assorbimento a 340 nm: la formazione di AD dal TS implica la formazione di NADPH che viene quantificata dall'incremento dell'assorbimento sempre a 340 nm. Il raggiungimento dell'equilibrio della reazione è osservabile dall'arresto della variazione dell'assorbanza (Figura 2.34).

Figura 2.34
Trasformazione del TS in AD
mediante l'enzima 17β HSD5
HT: assorbanza a 340 nm di una
soluzione satura di TS, NADP+
0.5 mM a cui viene aggiunto (---)
o meno (—) una frazione
purificata dell'enzima.



È stata poi osservata la capacità dell'enzima di catalizzare la conversione dell'AD in TS sia utilizzando il cofattore ridotto in forma di NADPH che in forma di NADH, commercialmente più economico rispetto al primo e dunque più interessante per l'applicazione su larga scala. Lo studio è stato condotto condotta sempre osservando l'assorbanza del cofattore a 340 nm, avendo NADPH e NADH uguale spettro di assorbimento. In Figura 2.35, è riportato il risultato dell'analisi, condotta nelle stesse condizioni, che mostra come la velocità di consumo del cofattore sia maggiore nel caso che questo sia in forma fosforilata. L'enzima tuttavia, accetta anche la forma NADH.

Figura 2.35
Trasformazione dell'AD in TS
mediante l'enzima 17β HSD5 HT
con diversi cofattori: assorbanza
a 340 nm di una soluzione satura
di AD, NADP+ 0.2 mM (—) o
NAD+ (---) a cui viene aggiunto
una frazione purificata
dell'enzima.

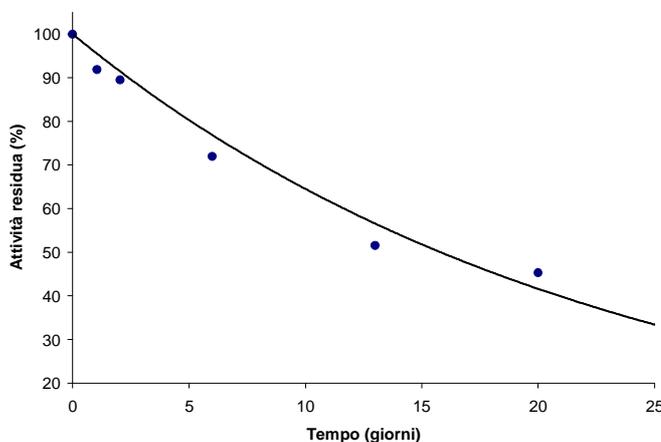


Per essere applicato industrialmente l'enzima deve possedere delle proprietà di stabilità tali che il suo utilizzo sia economicamente vantaggioso. Ad esempio,

L'utilizzo di enzimi immobilizzati consente il recupero dell'enzima e il suo riciclo in cicli di sintesi successivi.

L'attività di una frazione enzimatica lasciata a temperatura ambiente in tampone fosfato è stata monitorata per un determinato periodo di tempo al fine di stimare la perdita di attività relativamente a quella iniziale. In Figura 2.36 è mostrata l'attività residua restante in funzione del tempo, espressa percentualmente rispetto a quella iniziale: si evince chiaramente come l'emivita dell'enzima sia superiore ai 15 giorni in quelle condizioni, dimostrando una notevole stabilità dell'enzima, come già osservato anche da Dufurt *et al.* 1999⁵⁷.

Figura 2.36
Studio dell'attività residua dell'enzima in funzione del tempo, a temperatura ambiente, in tampone fosfato 100 mM.



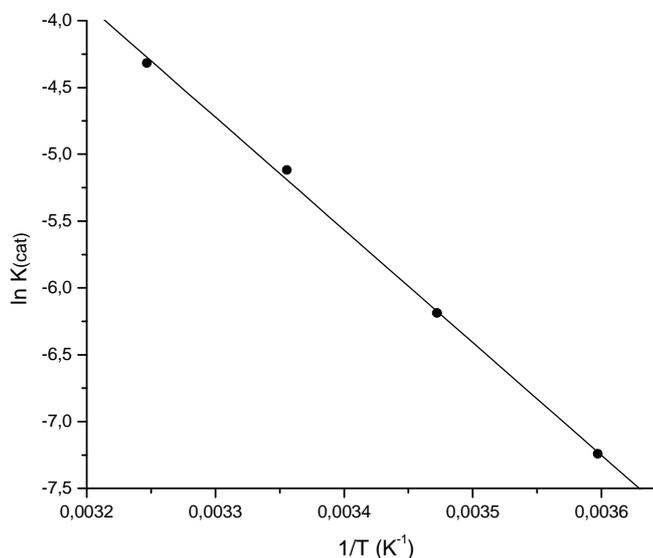
Lo studio della dipendenza della K_{cat} dell'enzima dalla temperatura rappresenta il sistema più semplice, non solo per valutare la stabilità termica dell'enzima, determinando dunque la temperatura massima di utilizzo, ma anche per stimare importanti parametri cinetici dell'enzima, in particolare l'energia di attivazione.

L'equazione di Arrhenius $\ln K = \ln A - E_a/(RT)$ mette in relazione la costante di velocità della reazione catalizzata (K) con l'energia di attivazione (E_a), e la temperatura assoluta (T) a meno di due costanti, quella di gas perfetti (R) e un fattore pre-esponenziale (A). Mediante il grafico di Arrhenius (Figura 2.37) è possibile ottenere il valore di quest'ultimo che, nel nostro caso, è risultato di $A:0.02024 \text{ s}^{-1}$ e quello dell'energia di attivazione pari a $E_a:70090.7 \text{ J/mol}$. Lo studio ha permesso di determinare le costanti cinetiche e di osservare che l'enzima è in grado di catalizzare la trasformazione anche a temperature superiori a 40°C .

Tuttavia l'emivita dell'enzima ad elevate temperature non è stata oggetto di ulteriore indagine.

Figura 2.37

Il grafico di Arrhenius, che mette in relazione il logaritmo naturale della K_{cat} enzimatica in funzione del reciproco della temperatura assoluta utilizzata.



Il principale problema riscontrato durante questi preliminari esperimenti è rappresentato dalla scarsa solubilità del substrato AD e del prodotto TS che sono sempre stati utilizzati in concentrazioni saturanti. In letteratura viene descritto che la solubilità dell'AD e del TS in acqua in entrambi uguale o inferiore a 0.1 mM. Queste concentrazioni rendono proibitiva la conversione enzimatica immaginando di lavorare in solvente acquoso con substrato e prodotto completamente sciolti.

Per ovviare a questo problema è stata considerata la possibilità di lavorare in soluzioni acquose contenenti delle frazioni di solvente organico, in modo da aumentare la solubilità del substrato e del prodotto. Metanolo, etanolo, isopropanolo e DMSO rappresentano dei solventi organici in cui i composti AD e TS sono solubili: se l'enzima fosse in grado di catalizzare la reazione in soluzioni acquose contenenti delle frazioni di questi solventi, verrebbe certamente incrementata la solubilità dei composti nella miscela di reazione, consentendo di lavorare con una concentrazione superiore di substrati in soluzione.

È stata dunque analizzata la capacità dell'enzima, a parità di condizioni, di lavorare con concentrazioni crescenti di solvente organico. In Figura 2.38 sono rappresentate le conversioni catalizzate in presenza dei diversi solventi organici.

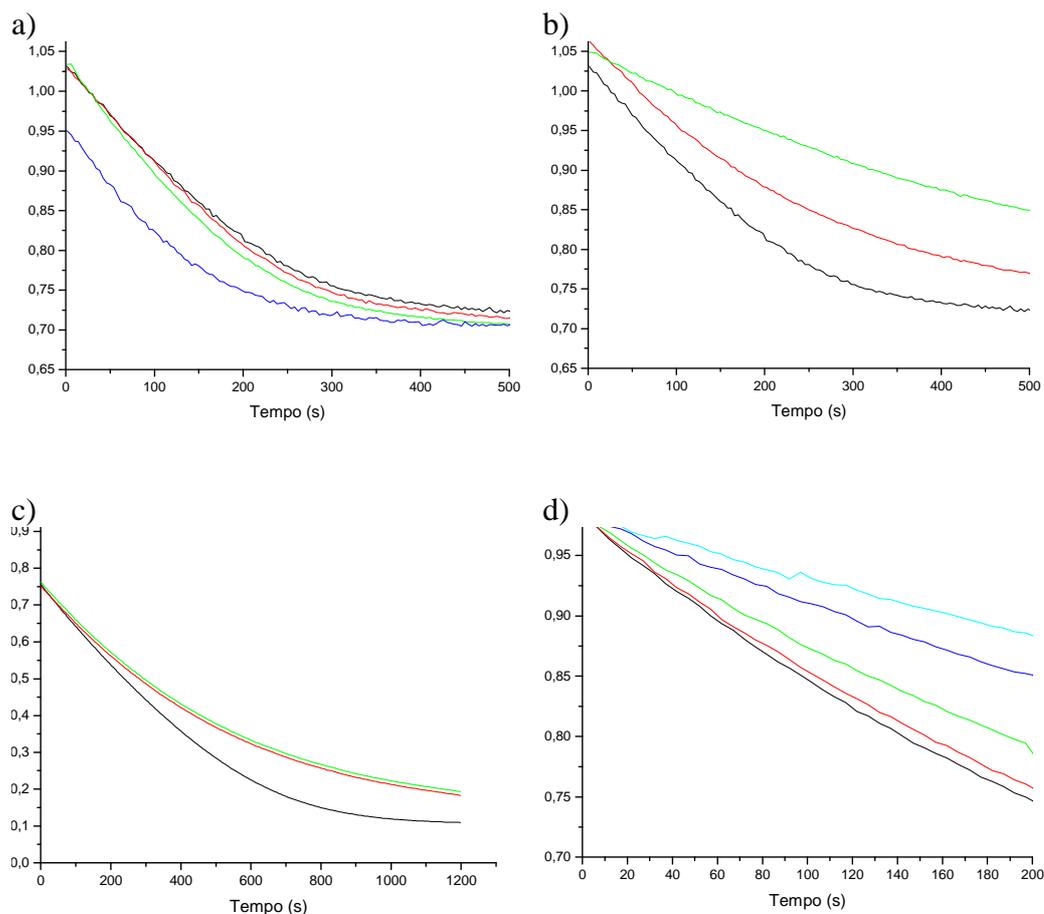


Figura 2.38

Consumo di cofattore NADPH nella conversione di AD in TS relativamente alla presenza di concentrazioni diverse di solvente organico espresse percentualmente v/v: (a) metanolo 0% (—), 5% (—), 10% (—), 20% (—); (b) etanolo 0% (—), 10% (—), 20% (—); isopropanolo 0% (—), 10% (—), 20% (—); DMSO 0% (—), 5% (—), 10% (—), 15% (—), 20% (—).

In tutti i casi i risultati mostrano un rallentamento della velocità di conversione aumentando la frazione organica del solvente. Tuttavia questo decremento è molto sensibile nel caso dell'etanolo, mentre appare più contenuto nel caso del metanolo, dove l'enzima sembra poter catalizzare la reazione anche a concentrazioni di metanolo > 20% v/v (dati omessi) anche se un fenomeno di *light scattering* comincia ad essere osservato mediante l'analisi spettrofotometrica qualora la percentuale di metanolo superi il 10 %, rendendo più complicato il confronto tra le velocità.

Questa prima serie di esperimenti hanno permesso non solo di dimostrare che l'enzima 17 β HSD5 HT è in grado di trasformare l'AD in TS con una selettività praticamente assoluta, ma anche che l'enzima ha delle caratteristiche di stabilità

tali da rappresentare un candidato interessante per un l'applicazione industriale della catalisi.

Seppure l'emivita dell'enzima, la sua stabilità termica e la sua attività in solventi organici non siano state analizzate direttamente nell'ambiente in cui esso verrà poi putativamente utilizzato industrialmente, i dati fin qui illustrati ci hanno consentito di passare alla fase successiva, quella di verificare la capacità dell'enzima di catalizzare la sintesi di alcuni milligrammi di TS, con l'obiettivo di dimostrare la sua reale applicabilità in processi di media e larga scala.

2.3.5 Scale up della fermentazione

Per effettuare uno studio di sintesi di TS a partire da AD mediante l'utilizzo dell'enzima 17 β HSD5 HT, testando diverse condizioni è necessario disporre di un quantitativo sufficiente di enzima per effettuare diverse prove. In più, se l'enzima dovesse essere realmente impiegato in ambito industriale, un'ottimizzazione della fermentazione batterica mirata ad aumentare la produzione dell'enzima è indispensabile.

Prep. N°	Volume coltura (l)	Volume inoculo (ml)	OD induzione	Conc. IPTG (mM)	Parametro X ^a	Tempo induzione (h)	OD finale
1	2.5	5	0.85	0.1	X ^a	18	6.32
2	6.2	200	1.6	0.1	X ^a	15	5
3	6.3	300	1	0.1	X ^a	21	6.5
4	6.3	300	1	0.1	X ^a	20	5.5
5	13.9	700	1	0.1	X ^a	24	5.9
6	19.7	200	1	0.1	X ^a	19	10.5

Prep. N°	Conc. enzima (mg/ml)	Volume eluato (ml)	U/ml	U/mg	Enzima ottenuto (mg)	Unità totali	mg/l coltura	U/l coltura
1	31	6.8	0.224	0.00725	210	1.528	84.32	0.611
2	33.22	11.5	0.495	0.0149	162	5.698	26.15	0.919
3	25.8	27.5	0.147	0.0057	709	4.044	112.61	0.641
4	14.4	35	0.056	0.00393	504	1.980	80.00	0.314
5	10.5	110	0.290	0.0270	1155	31.90	83.09	2.294
6	48.8	76.2	0.650	0.0133	3718	49.53	188.73	2.514

Tabella 2.5

Principali valori per le diverse preparazioni enzimatiche effettuate. La misurazione enzimatica effettuata mediante Bradford. (a) Dati sensibili omessi.

Per queste ragioni, una serie di fermentazioni successive sono state effettuate su scala di alcuni litri, sia per produrre quantità sufficienti di enzima per condurre gli esperimenti di sintesi, sia per ottimizzare il protocollo di preparazione.

In Tabella 2.5 sono schematizzati i principali valori ottenuti e parametri utilizzati per condurre le sei successive fermentazioni, di volta in volta modificate al fine di ottenere dei miglioramenti.

L'aumento del volume di coltura utilizzato è stato dettato dalla necessità di ottenere maggiori quantità di enzima per le prove di sintesi. Questa serie di preparazioni ha anche permesso di determinare il numero di unità di attività enzimatica ottenute per litro di coltura, consentendo dunque di valutare se la produzione dell'enzima per scopi applicativi risulti economicamente vantaggiosa o meno.

2.3.6 Conversione enzimatica dell'AD in TS

La riduzione enzimatica dell'AD in TS impone l'equivalente ossidazione di cofattore NADPH o NADH rispettivamente in NADP⁺ e NAD⁺. Come precedentemente introdotto, il costo proibitivo del cofattore ne impedisce l'utilizzo equimolare nella sintesi. Per questo motivo è stato utilizzato un sistema di rigenerazione del cofattore ben noto in letteratura¹¹, basato sulla contemporanea ossidazione da parte della glucosio deidrogenasi (GDH) del D-glucosio in acido gluconico, che spontaneamente ciclizza in δ -gluconolattone, impedendo il raggiungimento di un equilibrio tra le due forme, e consentendo la continua formazione del cofattore in forma ridotta (NADPH o NADH). Questo sistema consente di spostare l'equilibrio della reazione catalizzata dalla 17 β HSD5 verso la completa conversione dell'AD in TS. Sono così state condotte delle prove di conversione utilizzando il sistema costituito dai due enzimi, la 17 β HSD5 e la GDH, ed i relativi substrati AD e glucosio.

Come precedentemente descritto, la bassa solubilità dell'AD impone l'utilizzo di solventi organici, almeno in parte, per aumentarne la solubilità. Per questo motivo è stata testata tutta una serie di solventi, in percentuale del 7% v/v, così come sono stati testati entrambi i cofattori NADP⁺ e NAD⁺, entrambi rigenerabili dalla GDH e accettati dalla 17 β HSD5.

Infine la scarsa solubilità del substrato AD, anche in miscele contenenti una ridotta frazione di solvente organico ha costretto a sviluppare il processo utilizzando la doppia fase solido-liquido: come schematizzato in Figura 2.39, la frazione di AD in fase solida passa in fase acquosa con un certo equilibrio (i), che dipende da fattori come il mescolamento, il tipo di solvente organico presente, la temperatura, ecc.; l'AD viene convertito dalla 17β HSD5 in TS in fase acquosa e non viene raggiunto un equilibrio dal momento che vi è sempre un eccesso di NADH o NADPH determinato dall'ossidazione del glucosio (ii); il TS nella fase acquosa, ancora meno solubile dell'AD ($<0.1\text{mM}$), aumentando in concentrazione durante la trasformazione, precipita in fase solida (iii). La velocità e la durata della conversione dipende da una serie di passaggi limitanti: la velocità di scambio tra l'AD in fase solida e quella acquosa, dunque il prodotto di solubilità nella soluzione, dalle unità di 17β HSD5 utilizzata, dalla disponibilità di NAD(P)H e quindi dalle unità di GDH e dalla concentrazione di glucosio utilizzata, e infine dall'eventuale inibizione da prodotto TS.

Essendo difficilmente monitorabili tutti i passaggi indipendentemente l'uno dall'altro, si è deciso di massimizzare la disponibilità di NADPH, in modo che non rappresentasse un fattore limitante, utilizzando un rapporto tra unità di 17β HSD5 e GDH nettamente in favore di quest'ultimo.

In questo modo, lo svantaggio determinato dalla scarsa solubilità del substrato AD e del prodotto TS è stato trasformato in un vantaggio: infatti la catalisi determina la trasformazione dell'AD in TS senza possibilità di una trasformazione inversa e il TS formato continua ad accumularsi direttamente in forma solida, quindi facilmente separabile dalla miscela di reazione alla fine della trasformazione.

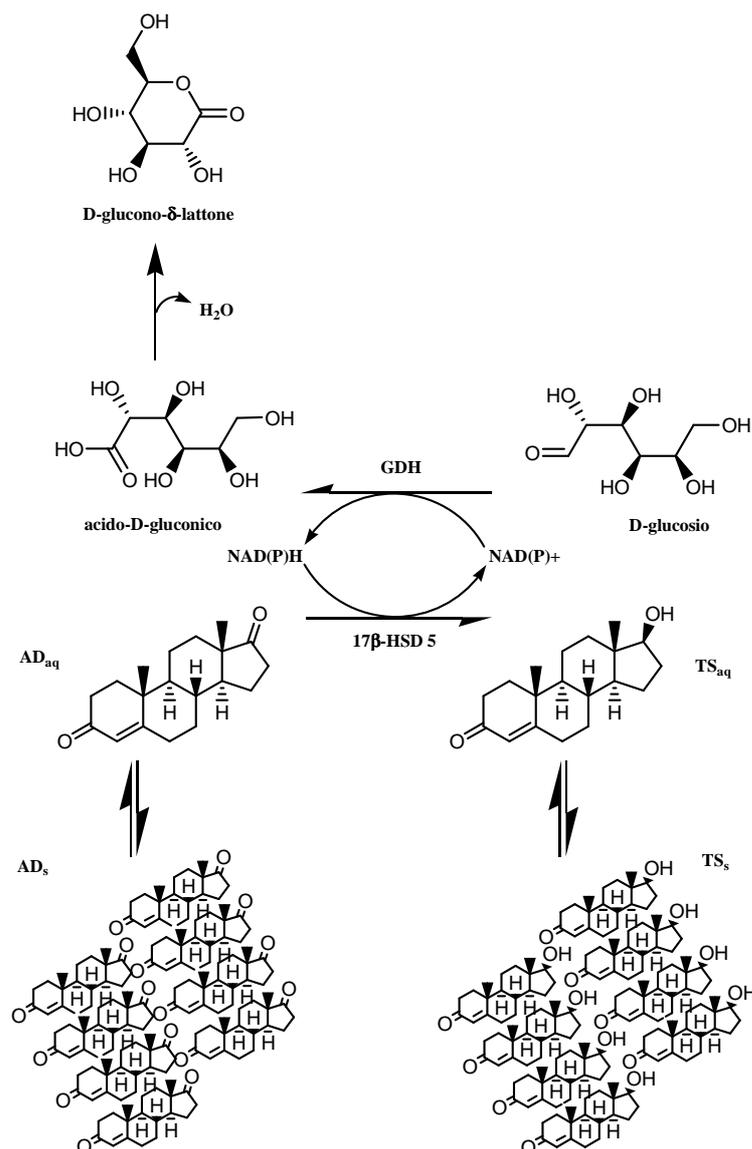


Figura 2.39

Schema dei passaggi nella miscela di trasformazione preparata per sintetizzare il TS, per i dettagli fare riferimento al testo. Abbreviato: androstendione e testosterone in forma solida (AD_s e TS_s) e solubilizzata (AD_{aq} e TS_{aq}), glucosio deidrogenasi (GDH).

Varie prove sono state dunque condotte in 7 ml di tampone fosfato 50 mM contenente il 7% di solvente organico, 600 mg di D-glucosio, 70 mg di AD, 68 U di GDH, 0.15 U di 17β HSD5 e cofattore NADP⁺ o NAD⁺. Le miscele, mantenute a temperatura e pH (7.2) costante, sono state mescolate vorticosamente fino all'ottenimento di un livello sufficiente di conversione. Questo è stato monitorato mediante analisi HPLC e i risultati sono riassunti in Tabella 2.6. I risultati ottenuti, dimostrano che, con diversi livelli di conversione, il sistema utilizzato è effettivamente in grado di generare il TS. Le rese migliori sono state ottenute utilizzando alcol semplici e il cofattore in forma fosforilata.

Cofattore	Co-solvente	Temp. (°C)	Tempo (h)	Conversione %
NADP+ [NAD+]	-	25	90 [70]	49 [85]
NADP+	acetonitrile	30	44	95
NADP+	DMF	30	44	52
NADP+	DMSO	25	41	90
NADP+ [NAD+]	metanolo	25	41 [70]	98 [88]
NADP+ [NAD+]	etanolo	25	41 [70]	97 [61]
NADP+ [NAD+]	isopropanolo	25	41 [70]	97 [98]
NADP+ [NAD+]	<i>ter</i> -butanolo	25	41 [70]	92 [98]
NADP+ [NAD+]	glicerolo	25	140 [70]	41 [89]

Tabella 2.6

Livelli di conversione dell'AD in TS utilizzando diversi co-solventi e cofattori.

2.3.6.1 Individuazione del pH ottimale

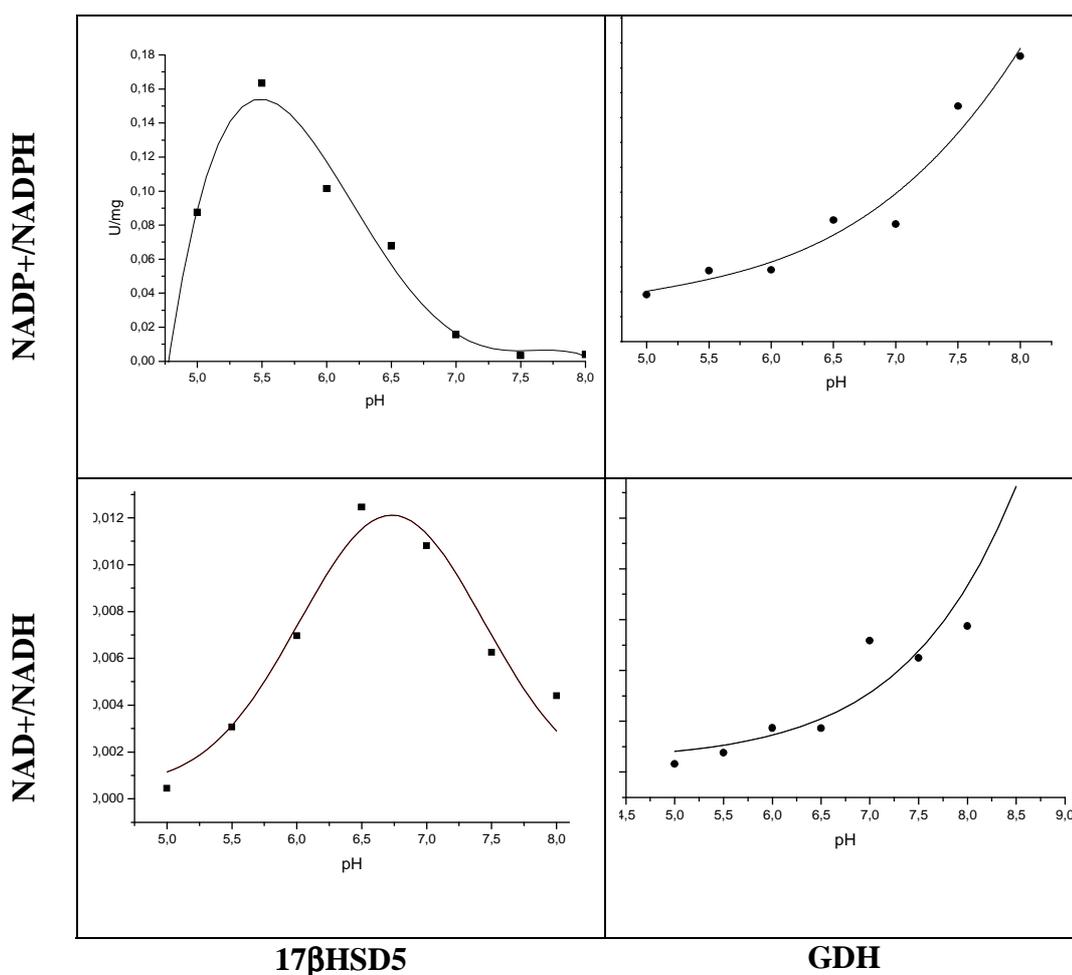


Figura 2.40

Analisi dell'attività specifica dei due enzimi, 17βHSD5 murino in forma HT e GDH, ciascuna relativamente al proprio substrato, AD e D-glucosio, in funzione del pH e del tipo di cofattore utilizzato.

Le prove riguardo all'attività catalitica finora effettuate sono sempre state condotte a pH neutro, così come descritto nei diversi lavori in cui veniva testata l'attività dell'enzima murino^{2, 57}. Tuttavia il contemporaneo utilizzo di un secondo enzima, la GDH, ha imposto l'ottimizzazione anche di questo parametro, al fine di individuare il migliore *range* di pH utilizzabile.

I due enzimi sono dunque stati indipendentemente studiati osservando l'attività specifica in funzione del pH, sia utilizzando il cofattore in forma fosforilata che non fosforilata. I risultati sono mostrati in Figura 2.40.

Appare molto interessante osservare che il profilo di attività specifica della 17 β HSD5 abbia un picco massimo con il NADPH intorno a pH 5.5, mentre con la forma NADH questo salga sopra pH 6.5. D'altro canto il profilo per la GDH è esattamente inverso rispetto a quello della 17 β HSD5 e l'attività sembra aumentare esponenzialmente in funzione del pH. Va inoltre considerato l'ordine di grandezza dell'attività di ciascun enzima: mentre la GDH ha dei valori compresi tra 10^0 - 10^1 , per entrambi i cofattori, la 17 β HSD5 ha dei valori compresi tra 10^{-2} - 10^{-1} per la forma NADPH e 10^{-3} - 10^{-2} per la forma NADH.

Questa ultima analisi consente di stabilire il corretto rapporto tra l'utilizzo di due enzimi e nondimeno, di individuare il pH più produttivo ai fini della sintesi di TS.

2.4 Conclusioni

La sintesi chimica di prodotti farmaceutici viene spesso effettuata in diversi passaggi a causa della complessità di questo tipo di molecole, che causano spesso un incremento dei costi di produzione, un abbassamento delle rese e l'utilizzo di composti pericolosi, difficilmente smaltibili. Sostituire una lunga serie di passaggi chimici con pochi passaggi enzimatici rappresenta sicuramente una soluzione preferibile. Con questo fine è stato condotto uno studio al fine di individuare e produrre un'enzima in grado di catalizzare la formazione di TS a partire da AD in un singolo passaggio evitando di seguire la classica sintesi chimica.

Mediante un approccio bibliografico e bioinformatico è stato possibile identificare nell'enzima 17 β HSD di tipo 5 murino, espresso in forma ricombinante e facilmente purificabile mediante una coda di istidine aggiunta, un

valido biocatalizzatore in grado di effettuare la trasformazione desiderata, dimostrando inoltre un'elevata selettività, adattabilità e applicabilità industriale. Nonostante una serie di ottimizzazioni siano ancora necessarie, sia nell'espressione dell'enzima che nelle condizioni di sintesi, il processo è stato ritenuto economicamente interessante e perciò è stato protetto mediante il deposito di domanda di brevetto⁵.

L'enzima YMR226c, che invece è risultato inattivo nei confronti dell'AD, potrà in futuro essere testato con nuovi substrati al fine di identificarne possibili applicazioni in sintesi chimica.

3 Tirosinasi umana: espressione ricombinante e caratterizzazione

3.1 Introduzione

3.1.1 La Melanina

La melanina è una complessa molecola policiclica, di origine naturale, che è possibile trovare in molti organismi viventi, dai semplici batteri alle più evolute piante ed agli animali, con ruoli fisiologici molto diversi. Nei vertebrati il processo di sintesi delle melanine, definito melanogenesi, è una funzione specializzata tipica solo in alcune cellule, derivanti dalla cresta neurale, variamente distribuite nella pelle, nell'epitelio pigmentato della retina (RPE) ed in alcuni altri tessuti.

Il sistema di pigmentazione dei mammiferi dipende dalla sintesi della melanina, biopolimero che, assorbendo la radiazione luminosa, svolge una serie di importanti funzioni: come cosmetico partecipa alla colorazione dell'animale, con ruolo protettivo (mimetico) o sessualmente attraente e, come macromolecola, forma una barriera protettiva contro la radiazione UV e contro specie tossiche radicali o pericolosi intermedi metabolici⁶⁹.

I melanociti, nei mammiferi, sono le cellule responsabili della melanogenesi che avviene al loro interno in organelli specializzati, circondati da membrana, chiamati melanosomi. Da questa sede, il successivo trasferimento dei melanosomi alle cellule dell'epidermide, i keratinociti, completa il processo di melanizzazione della pelle.

I melanociti producono due tipi distinti di melanine: le eumelanine, che hanno un colore che va dal nero al marrone, e le feomelanine con un colore che va dal giallo al rosso.

3.1.1.1 Eumelanina e feomelanina

Studi estesi, condotti circa 50 anni fa, suggeriscono che le eumelanine siano un biopolimero molto eterogeneo costituito da unità di diidrossiinositolo (DHI) e acido diidrossiinositolocarbossilico (DHICA) in diversi stati ossidativi, e da unità pirroliche derivate dalla loro rottura perossidativa.

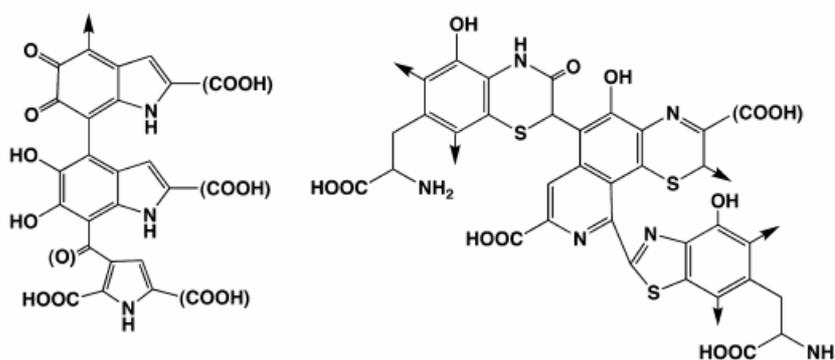


Figura 3.1
Struttura semplificata delle eumelanine, a sinistra, e delle feomelanine, a destra. Immagine adattata da Ito & Wakamatsu 2008⁷⁰.

Anche le feomelanine consistono in una combinazione di unità di benzotiazina, benzotiazolo e isochinolino (Figura 3.1). Non è chiaro come queste unità monomeriche siano connesse tra loro, anche se il legame diretto tra i relativi atomi di carbonio meglio giustificerebbe l'assorbimento di queste molecole in tutto lo spettro del visibile.

Sia le eumelanine che le feomelanine derivano da un precursore comune, il dopachinone (DQ) che si forma dall'ossidazione dell'amminoacido L-tirosina (Figura 3.2), passando per l'intermedio L-diidrossifenilalanina (L-DOPA), reazione catalizzata dall'enzima tirosinasi. La chimica degli orto-chinoni è strettamente associata alla melanogenesi dal momento che queste sono molecole molto reattive.

La prima tappa nell'eumelanogenesi è una reazione relativamente lenta ($k=3.8/s$) che consiste nella addizione intramolecolare del gruppo amminico del DQ a formare la ciclodopa (CD). Appena questa si forma, viene rapidamente ossidata a dopacromo (DC) mediante uno scambio redox con una molecola di DQ ($k = 5.3 \cdot 10^6/M/s$), che a sua volta ritorna a L-DOPA. Per via delle diverse

velocità di formazione, la ciclodopa non si accumula mai a differenza del dopacromo. Quest'ultimo, con una emivita di 30 minuti, spontaneamente si decompone a formare DHI e DHICA con rapporto 70:1 a pH neutro. Tuttavia, in presenza dell'enzima dopacromo tautomerasi (DCT), chiamato anche *tyrosinase related protein 2* (Tyrp2), la dopacromo tautomerizza a formare preferibilmente DHICA. Quindi il rapporto tra DHICA e DHI nelle eumelanine naturali è determinato dall'attività dell'enzima Tyrp2. Segue poi una successiva ossidazione, nel caso della DHI, mediante uno scambio redox con il DQ, e nel caso del DHICA, mediante l'intervento ancora della tirosinasi (nell'uomo) o della *tyrosinase related protein 1* (Tyrp1, nel topo). Di conseguenza questi enzimi, Tyr, Tyrp1 e Tyrp2 influenzano molto la qualità e la quantità delle eumelanine prodotte.

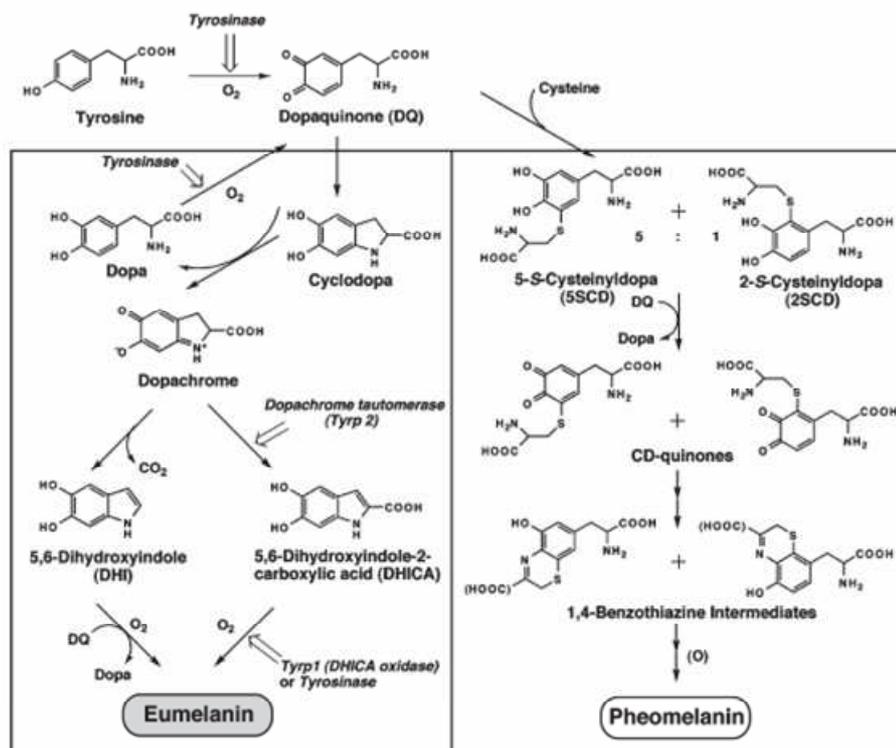


Figura 3.2 Step iniziali nella biosintesi delle eumelanine e della feumelanine. Abbreviazioni e composti sono descritti nel testo. Immagine adattata da Ito & Wakamatzu 2008⁷⁰.

Così come per la eumelanogenesi, nella feomelanogenesi, la formazione del DQ rappresenta la tappa che dà inizio alla sintesi. Infatti, se la tirosinasi ossida la L-tirosina in un eccesso di cisteina, questo porta alla formazione di 5-S-cisteinildopa (5SCD) e 2-S-cisteinildopa (2SCD) insieme ad una serie di altri

prodotti in bassa percentuale. La sintesi procede mediante uno scambio redox con i DQ a formare i rispettivi CD chinoni. A questo segue una deidratazione a formare le rispettive orto-chinolammine (QI) e una serie di forme riarrangiate, con o senza decarbossilazione, di intermedi benzotiazinici dalla quale la sintesi delle feomelanine continua.

3.1.1.2 Il modello “casting”

Come descritto, la melanogenesi in vivo produce una miscela di eumelanine e feomelanine. La quantità totale di melanina prodotta è direttamente proporzionale alla quantità di DQ formata, e quindi all'attività della tirosinasi. Come rappresentato in Figura 3.3 è possibile suddividere temporalmente la melanogenesi in tre parti: nella prima la tirosinasi catalizza la formazione e l'accumulo di isomeri della CD, che continua finché la concentrazione di cisterna supera la concentrazione di $0.13 \mu\text{M}$. Nella seconda parte l'accumulo di CD sopra i $9 \mu\text{M}$ favorisce la formazione delle feomelanine.

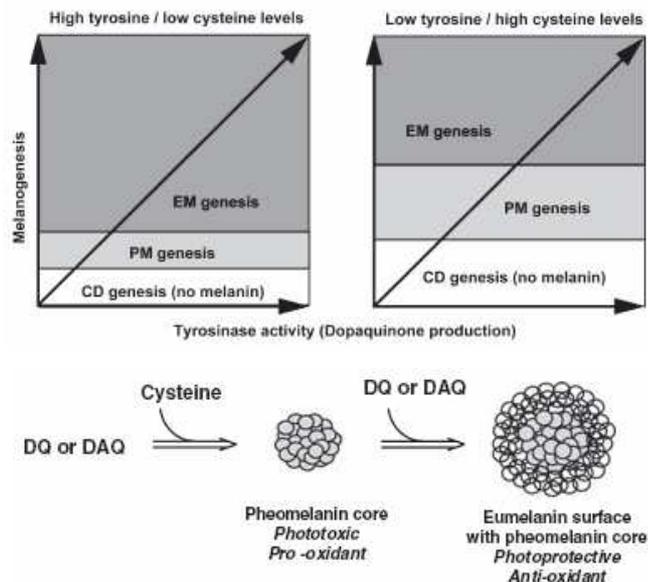


Figura 3.3

Sopra, la dipendenza tra l'attività tirosinasi e la quantità e il tipo di melanine formate, è associato alla alta o bassa disponibilità dei substrati iniziali, tirosina e cisterna. Sotto, schematizzato il *casting model* che porta alla formazione dei granuli di melanina. Immagini adattate da Ito & Wakamatsu 2008⁷⁰.

Termina infine con la formazione dell'eumelanina quando la maggior parte della cisterna e della CD è consumata. Perciò il rapporto secondo cui si formano eumelanine e feomelanine è strettamente correlato alla disponibilità di tirosina,

cisterna, dall'attività della tirosinasi e, non di meno, dall'acidità del pH che favorisce la feumelanogenesi rispetto all'eumelanogenesi. La conseguenza morfologica di questa sintesi temporalmente suddivisa è rappresentata in Figura 3.3, nella quale ad un nucleo iniziale di feumelanina segue il rivestimento di uno strato di eumelanina. Questo modello di struttura definita "casting" caratterizza la melanina, in qualunque sede essa venga sintetizzata, dai granuli di neuromelanina che caratterizza la *substantia nigra* nel cervello, ai melanosomi dello stomato dell'iride⁷¹. È inoltre ormai generalmente accettato che l'eumelanina svolga un ruolo fotoprotettivo antiossidante, mentre la feumelanina è fototossica e pro-ossidante.

3.1.2 La tirosinasi: una proteina a rame di tipo 3

La tirosinasi costituisce un enzima chiave nella melanogenesi, dove catalizza l'ossidazione della L-tirosina a L-DOPA, quest'ultima a dopachinone, l'ossidazione della DHICA a acido indole-5,6-chinone carbossilico e l'ossidazione della DHI a indole-5,6-chinone^{72, 73}. Il suo sito attivo è caratterizzato da due atomi di rame accoppiati in modo antiferromagnetico che legano l'ossigeno molecolare, attivandolo, mediante la formazione di perossido reattivo in conformazione $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ secondo una modalità definita *side-on*⁷⁴. Questa modalità di legame dell'ossigeno è tipica delle proteine a rame di tipo 3.

3.1.2.1 Le proteine a rame

Le metallo-proteine a rame sono divise in quattro tipi in base alle differenti proprietà spettroscopiche e alle modalità di coordinamento del rame: in quelle di tipo 1, anche chiamate proteine a rame blu a causa del loro intenso assorbimento a 600 nm, il rame è legato da due atomi d'azoto di residui istidinici, uno zolfo cisteinico ed uno metioninico; le tipo 2 sono caratterizzate da un atomo di rame centrale coordinato da quattro atomi di azoto o di ossigeno con una geometria tetragonale; nelle proteine a rame di tipo 3, invece, due atomi di rame sono tenuti molto vicini e coordinati da tre atomi di azoto istidinici; infine, nel tipo 4, il sito a rame è formato dall'unione di un sito a rame di tipo 2 e uno di tipo 3, a formare un *cluster* trinucleare⁷⁵.

Il centro delle proteine a rame di tipo 3 contiene due atomi di rame ravvicinati che, a loro volta, legano l'ossigeno molecolare e lo rendono chimicamente reattivo. Attualmente, mediante l'analisi delle sequenze amminoacidiche delle regioni nei siti attivi di queste proteine, è possibile inserire due famiglie proteiche (Pfam) all'interno di questo gruppo: uno definito '*the central domain of tyrosinase*' che include le tirosinasi, le emocianine dei molluschi e le polifenoloossidasi delle piante; il secondo, invece, è rappresentato dalla famiglia definita '*copper containing domain*', che comprende l'emocianina degli artropodi e proteine larvali di insetto. Le strutture cristallografiche disponibili di proteine appartenenti alle proteine a rame di tipo 3 mostrano sempre l'^εN dell'anello imidazoico come l'azoto direttamente coordinante l'atomo di rame.

Le emocianine, come trasportatori, legano l'ossigeno molecolare reversibilmente e le catecolo ossidasi, o più in genere le polifenolo-ossidasi, convertono gli *o*-difenoli nei corrispondenti *o*-chinoni, mentre la tirosinasi ortodrossila i monofenoli così come converte gli *o*-difenoli nei corrispondenti chinoni. Come si osserva dalle strutture note di emocianine^{76, 77}, di catecolo ossidasi e tirosinasi⁶ ogni atomo di rame è coordinato da tre residui istidinici. La distanza Cu–Cu nella catecolo ossidasi varia da 2.9 Å a 4.5 Å in base allo stato di ossidazione degli stessi. È interessante notare come sia le emocianine che la catecolo ossidasi contengano una cisterna che blocca una delle istidine coordinanti il rame mediante un ponte tioestere. Questo non è presente nella tirosinasi. Tuttavia la differente funzione tra le varie proteine sembra imputabile alla diversa accessibilità dei substrati al sito attivo: ridotta nel caso delle emocianine e maggiore nel caso della catecolo ossidasi e della tirosinasi.

Studi condotti sulle sequenze primarie hanno dimostrato che queste proteine sono probabilmente evolute da un' ancestrale proteina a rame la cui funzione poteva essere quella di proteggere l'organismo dalla tossicità dell'ossigeno (Figura 3.4). Gradualmente, con l'emergere di un metabolismo aerobio, si intuisce come un sistema di trasporto dell'ossigeno fosse indispensabile, portando alla formazione di precursori delle attuali emocianine di artropode e di mollusco, a partire da primitive tirosinasi e polifenolo-ossidasi⁷⁸.

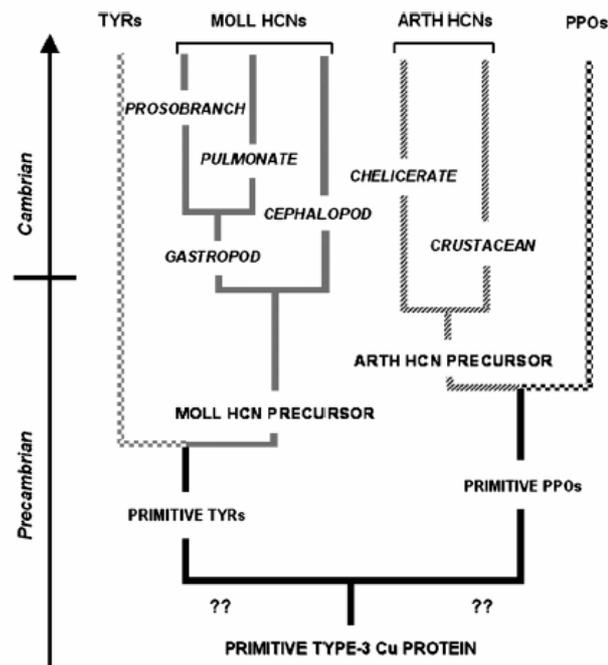


Figura 3.4
 Filogenesi delle attuali proteine a rame di tipo 3. Adattato da Ray *et al.* 2007⁷⁸.

3.1.2.2 La tirosinasi

La tirosinasi rappresenta probabilmente l'enzima più studiato tra le proteine a rame di tipo 3, a causa del suo importante ruolo nella pigmentazione della pelle e nell'imbrunimento di frutta e verdura⁷⁹. L'enzima catalizza l'orto-idrossilazione di un monofenolo e la successiva ossidazione del prodotto di-fenolico per dare un chinone. Entrambe le reazioni avvengono con il consumo di una molecola di ossigeno.

In funzione della presenza o assenza dell'ossigeno, il sito attivo si presenta in diverse forme⁸⁰: la forma deossigenata, o forma *deoxy*, che presenta i due atomi di rame nello stato di ossidazione [Cu(I) Cu(I)]; la forma ossigenata, anche indicata come forma *oxy* [Cu(II)-O₂-Cu(II)], consiste di Cu(II) con una configurazione tetragonale, ognuno coordinato da due N_{His} equatoriali ed una N_{His} assiale. La molecola di ossigeno esogena si lega come ponte perossido tra i due atomi di legame secondo il modello chiamato *side on* (μ - η^2 : η^2); la forma indicata come *met* [Cu(II)-OH-Cu(II)] contiene due atomi di Cu(II) con configurazione tetragonale accoppiati in modo antiferromagnetico e potenzialmente legati da

ponti esogeni. Purificando, la tirosinasi si ottiene una miscela composta per l'85% da Ty-met e per il 15% da Ty-oxy.

La prima e unica struttura cristallografica risolta di tirosinasi è stata ottenuta mediante la co-cristallizzazione dell'enzima di *Streptomyces castaneoglobisporuse* con una piccola proteina, chiamata ORF378, ritenuta necessaria per l'inserimento del rame nel sito attivo⁶. La struttura principale è rappresentata dall' α -elica e ricorda quella dell'emocianina di piovra o la catecolo ossidasi di *ipomea batatas*. Nei tre stati ossidativi, che verranno successivamente discussi, la distanza tra gli atomi di rame varia. Nello stato definito *met* la distanza tra $\text{Cu}^{\text{I}}-\text{Cu}^{\text{I}}$ varia da 3.9 Å a 3.3 Å in base al numero di molecole d'acqua legate, rispettivamente una o due. Nella forma *deoxy* la distanza $\text{Cu}^{\text{I}}-\text{Cu}^{\text{I}}$ aumenta a 4.1 Å, con una molecola di solvente che funge da ponte. Infine la forma *oxy* la distanza $\text{Cu}^{\text{II}}-\text{Cu}^{\text{II}}$ è di 3.4 Å.

3.1.2.3 Il meccanismo catalitico

I primi studi biochimici sull'enzima, sono stati portati avanti nel 1985 sulla tirosinasi del fungo *Russula nigricans*. Le tirosinasi più caratterizzate sono rispettivamente quelle del batterio *Streptomyces glaucascens* e i funghi *Neurospora crassa* e *Agaricus bisporus*. Il dibattito che riguarda le tappe attraverso le quali l'enzima catalizza l'ossidazione dei mono e difenoli è, tuttavia, ancora aperto.

Diversi modelli sono stati adattati e modificati da quello pubblicato dal gruppo di Solomon^{81, 82}. Il meccanismo attraverso il quale l'enzima manifesta la sua doppia attività (monofenolo monoossigenasi, E.C 1.14.18.1; catecolo ossidasi E.C 1.10.3.1) prevede l'alternarsi dei tre stati dell'enzima precedentemente descritti (*oxy*, *deoxy*, e *met*) e di due cicli catalitici, come rappresentato in Figura 3.5.

Nel meccanismo di Solomon, viene indicato lo stato *oxy* come il punto di partenza dell'attività monofenolasica (vedi *cresolase cycle* in Figura 3.5). Un substrato monofenolico, si lega all'enzima della forma *oxy* e viene ossigenato a *o*-difeno. E' proprio l'attività monofenolasica (o cresolasica) della tirosinasi che permette di distinguerla da altri enzimi fenolo-ossidanti, come le laccasi e le ossidasi, e rappresenta il primo step nella melanogenesi, nonché quello più lento.

Il substrato monofenolico, inizialmente si coordina in posizione assiale rispetto agli atomi di rame della tirosinasi *oxy*. Successivi riarrangiamenti del complesso, portano all'*o*-idrossilazione del monofenolo da parte del perossido, il rilascio di una molecola d'acqua e la formazione del complesso *met* tirosinasi-difenolo, come supportato da esperimenti di EPR e a raggi X⁸². A questo punto la reazione può procedere in due modi: (i) il difenolo viene rilasciato o (ii) il difenolo rientra nel ciclo e viene ossidato a chinone dalla *met*-tirosinasi; il processo di ossidazione ad opera dell'enzima fa sì che il rame nel sito attivo venga ridotto a dare *deoxy*-tirosinasi. Il processo di ri-ossidazione dello stato ridotto, avviene con l'attacco di nuovo ossigeno molecolare al sito attivo. Nel caso in cui siano presenti solo molecole di difenolo, questo si lega all'enzima *oxy* e viene ossidato a *o*-chinone, restituendo la tirosinasi in forma *met*. Questa è in grado trasformare un'altra molecola di difenolo in *o*-chinone, riducendosi quindi allo stato *deoxy*.

Il meccanismo dell'attività difenolasica (detta anche catecolasica), comincia invece dagli stati *oxy* e *met* dell'enzima. Il ciclo catecolasico coinvolge l'ossidazione di due difenoli in concomitanza con la riduzione della molecola di O₂ con 4 elettroni, restituendo due molecole di acqua. In questo ciclo, sia la forma *oxy* che quella *met* reagiscono con due difenoli, ossidandoli a chinoni. Studi cinetici⁷³, mostrano che l'attività monofenolasica possiede una caratteristica *lag-phase* iniziale. Questa fase, e dovuta all'incapacità della forma *met* di convertire il monofenolo a difenolo, legandolo invece in modo reversibile, formando un complesso "*dead-end*" che sequestra temporaneamente l'enzima dal ciclo catalitico. Possiamo quindi considerare questo come lo step limitante del processo. Il tempo richiesto affinché lo stato stazionario si instauri, dipende da due diversi fattori: la concentrazione di monofenolo (la *lag-phase* iniziale si allunga con l'aumento di concentrazione del monofenolo che agisce da inibitore competitivo) e la concentrazione di enzima (aumentando la concentrazione la *lag-phase* diminuisce). Inoltre, la presenza di quantità stechiometriche di difenolo o ioni di metalli di transizione aboliscono completamente la *lag-phase* iniziale⁸⁰.

Il fatto che l'attività *o*-idrossilasica dell'enzima sia espressa in stretta associazione con l'ossidazione degli *o*-difenoli a *o*-chinoni (il secondo passaggio della melanogenesi) ha portato alcuni autori a definire erroneamente l'attività monofenolasica come la completa conversione del monofenolo a *o*-chinone.

Come già detto, la differenza nella reattività tra tirosinasi, catecolo ossidasi ed emocianine è attribuita a differenze strutturali, come si evince dal confronto delle relative strutture cristallografiche. La prima consiste in una differenza nelle dimensioni del sito catalitico, che porta ad una diversa capacità dei substrati di coordinarsi agli ioni rame: mentre l'ossigeno può accedere liberamente in tutte tre le proteine, il difenolo può coordinare solo la catecolo ossidasi e la tirosinasi, mentre il monofenolo solo quest'ultima. Tuttavia è stato dimostrato che aumentando l'accessibilità dei substrati mediante l'utilizzo di detergenti, anche le emocianine dimostrano attività difenolasica⁸³.

In base alla specie di provenienza della tirosinasi, alcuni substrati difenolici sono ossidati con una consistente anomalia rispetto allo stechiometrico consumo di ossigeno: la reazione cessa prima che l'ossigeno o il substrato difenolasico sia terminato e la successiva aggiunta di substrato o la riossigenazione non produce alcun effetto, mentre l'aggiunta di enzima fa ricominciare la reazione che ha una durata proporzionale alla quantità di enzima aggiunto. Appare chiaro che, in questi casi, avviene un fenomeno di inattivazione dell'enzima. Diversi studi sono stati fatti su questo tipo di inibizione negli ultimi cinquanta anni⁸⁴⁻⁸⁷ e recentemente, un meccanismo che giustifica questo fenomeno, è stato proposto da Riley e collaboratori⁸⁸⁻⁹⁰. Si propone che l'inattivazione della tirosinasi sia causato da un erroneo posizionamento del substrato difenolasico alla forma *oxy* dell'enzima, che porta all'ossidazione in posizione meta del difenolo mediante l'attività cresolasica dell'enzima, rilasciando quindi un 3-idrossi-chinone e portando gli ioni nel sito catalitico in conformazione inattiva, con uno stato ossidativi del rame rispettivamente Cu^0 - Cu^2 . In accordo con questo modello, la possibilità di un difenolo di agire come inibitore, dipende dalla probabilità con cui questo non si posizioni correttamente del sito attivo, quindi, dalle dimensioni della tasca catalitica e del substrato. A seconda della specie di tirosinasi i substrati difenolici possono, perciò, agire anche come inibitori, in un processo definito come "*suicide inhibition*". Anche se tale modello poggia su uno studio sperimentale, non è ancora stata dimostrata la formazione di un enzima nello stato Cu^0 - Cu^2 .

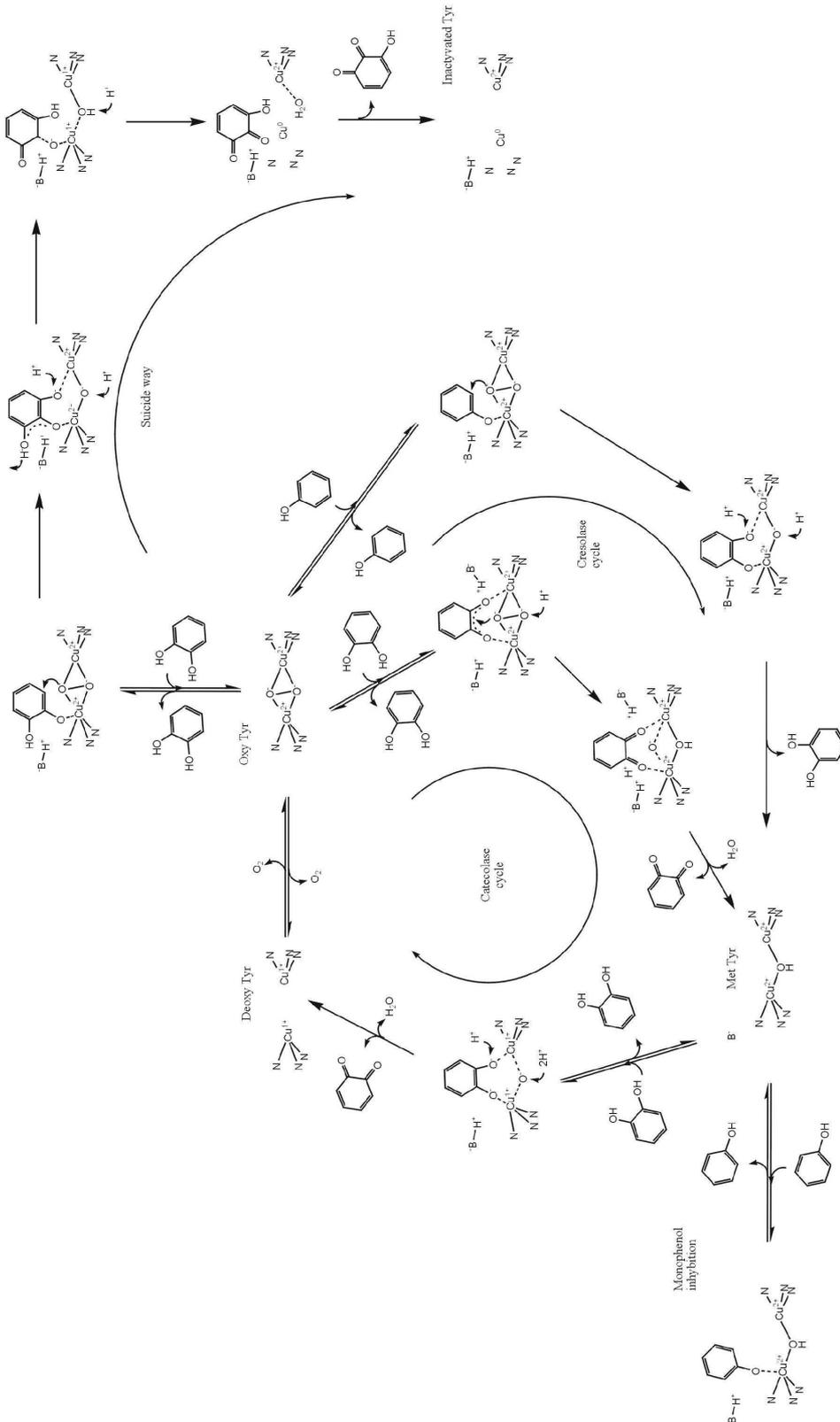


Figura 3.5
 Schema di reazione dell'enzima tirosinasi. Si distinguono il ciclo catecolasico e quello cresolasico e i tre stati ossidativi dell'enzima. Sono inoltre mostrati l'inibizione da monofenolo, che determina la *lag-fase*, e il meccanismo di *suicide inhibition*. Immagine adattata e modificata^{75, 78}.

3.1.2.4 La tirosinasi umana

Come precedentemente descritto, nei mammiferi la tirosinasi rappresenta l'enzima chiave nel processo di sintesi delle melanine. Nell'uomo l'enzima è espresso in tre tipi di cellule: (a) nei melanociti, che derivano da cellule della cresta neurale migrate a colonizzare l'iris, la coclea e la pelle; (b) cellule del RPE, che derivano dalla coppa ottica⁷⁸; (c) nei neuroni dopaminergici della *substanza nigra* del cervello, a livelli di espressione più bassi⁹¹.

La tirosinasi umana è una glicoproteina di membrana di tipo I, che contiene 529 aminoacidi (NP_000363.1), compresi i 18 aminoacidi che costituiscono la sequenza segnale N-terminale (Figura 3.6). La sequenza nucleotidica dell'enzima è codificata dal gene 11q14-q21 (MIM 606963) che da un trascritto maturo di 2082 basi (NM_000372.4). La proteina matura può essere divisa in tre domini: (i) il dominio N-terminale e luminale di 455 aminoacidi, (ii) un singola porzione trans membrana e (iii) una coda citoplasmatica. L'ectodominio della tirosinasi umana possiede l'attività catalitica. Tale dominio è costituito da 7 siti di glicosilazione conservati e 17 residui di cisteina. La glicosilazione della proteina è fondamentale per l'attività dell'enzima. Infatti la presenza di residui glicosilati, come ad esempio Asn68 e Asn353, è indispensabile per il corretto *fold*ing della proteina. Una cisteina è localizzata nella sequenza segnale che viene rimossa, lasciando 15 cisteine libere di formare ponti disolfuro nelle condizioni ossidanti del reticolo endoplasmatico. L'analisi in SDS-PAGE di tirosinasi in forma ridotta ed ossidata, indica che l'enzima contiene ponti disolfuro, ma la scarsa differenza di mobilità elettroforetica tra una forma e l'altra, suggerisce che i ponti disolfuro si formano tra residui prossimali, senza coinvolgere ampi loops. I siti di glicosilazione sono dispersi lungo la sequenza nel dominio luminale, mentre i residui di cisteina sono localizzati in tre *clusters*. Il dominio idrofobico trans membrana, di 26 aminoacidi, ancora la tirosinasi sulla membrana dei melanosomi, con il dominio N-terminale rivolto verso il lume dell'organello.

La porzione C-terminale contiene due sequenze segnale ben caratterizzate: un motivo di-leucinico (LL) ed un motivo a base di tirosina (YXXB, dove B è un residuo idrofobico). Ognuno dei due domini che legano il rame nelle proteine a rame di tipo 3, è coordinato da tre residui di istidina.

L'organizzazione nella sequenza primaria dell'enzima è schematizzata in Figura 3.6. La numerazione dei residui della tirosinasi viene assegnata considerando la forma matura della proteina, cioè priva della sequenza segnale che comprende i primi 18 residui. Per questa ragione il residuo iniziale è rappresentato dall'istidina successiva al sito di taglio, mentre i residui precedenti sono indicati con un valore negativo. Secondo questa assegnazione, tipica delle proteina di membrana, la metionina iniziale è in posizione -18, il sito CuA comprende l'His 162, 184 e 193, mentre nel sito CuB troviamo His 345, 349 e 371. la regione transmembrana inizia dal residuo 456 e termina al residuo 481, mentre la coda citosolica procede fino al residuo 511.

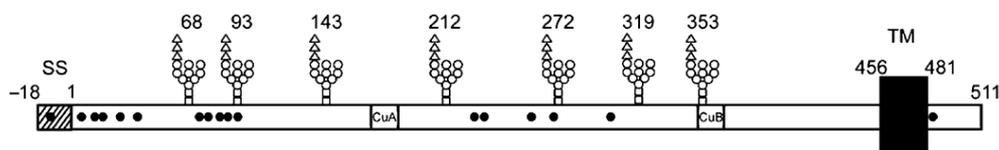


Figura 3.6

Struttura della tirosinasi umana. Sono indicati i siti di glicosilazione (strutture ramificate), i *cluster* di cisteine (●), la sequenza segnale (SS), la regione transmembrana (TM), e i due siti leganti il rame CuA e CuB. Immagine adattata da Wang *et al.* 2006⁹².

3.1.2.5 Modelli strutturali della tirosinasi umana

La tirosinasi di mammifero nella sua forma purificata e completa non è ancora stata cristallizzata. La presenza di glicosilazioni associate a residui Asn e la porzione trans membrana, rendono molto difficile la cristallizzazione della proteina. Nel 2002, Garcia Borron⁹³ ha proposto un modello per la tirosinasi murina (che mostra un'identità del 85% con la forma umana), basandosi su: (i) strutture cristallografiche ottenute da emocianine e catecolo ossidasi di piante, che condividono le stesse proprietà di legame al rame tipiche della tirosinasi; (ii) allineamento di sequenze di diverse tirosinasi e proteine “*tyrosinase related*” da differenti organismi, per poter discriminare i residui conservati che conferiscono le tipiche proprietà catalitiche a questa famiglia proteica ed i residui responsabili delle proprietà caratteristiche di ciascun membro. Il risultato è mostrato in Figura 3.7.

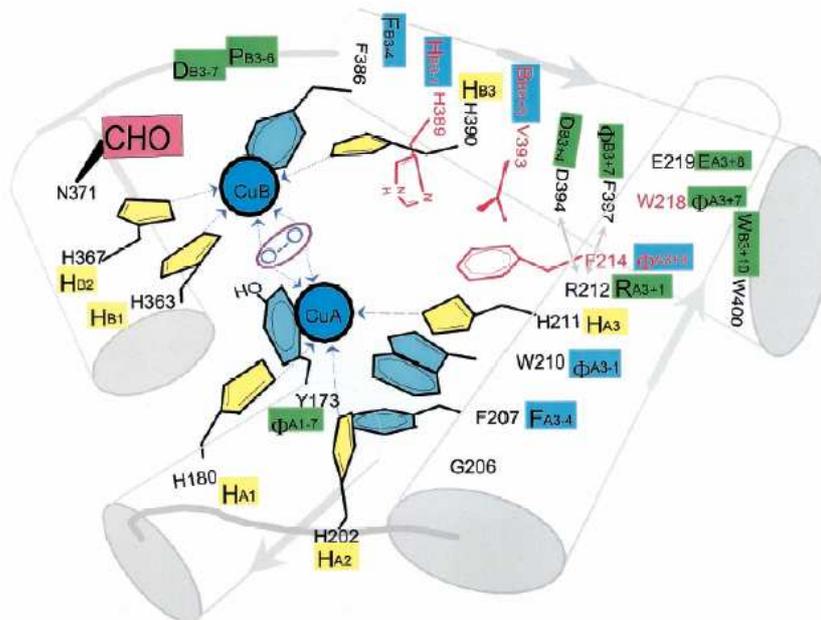


Figura 3.7

Modello schematico della tirosinasi di mammifero, che mostra le quattro α -eliche, i residui coinvolti nella struttura del sito attivo e di iterazione con il substrato. In giallo i residui che direttamente legano il rame; in blu, i residui che formano una *aromatic shell*; in rosso possibili residui che discriminano l'attività della tirosinasi da quella delle proteine "tyrosinase related"; in verde altri residui conservati che contribuiscono alla struttura. Figura adattata da Borron *et al.* 2002⁹³.

In seguito alla pubblicazione della struttura cristallografica della tirosinasi di *Streptomyces castaneoglobisporus* (la prima ed unica struttura cristallografica di una tirosinasi), un nuovo modello per la tirosinasi murina è stato proposto dallo stesso gruppo⁹⁴ (Figura 3.8).

In accordo con il modello proposto, le His che coordinano gli ioni rame sono localizzate in un *cluster* che comprende quattro alfa eliche impacchettate. Un loop, che comprende i residui M374, S375 e V377, contiene i siti di legame CuA e CuB. Gli ossigeni di M374 e V377 fungono da accettori di protoni del gruppo NH degli anelli imidazolici delle His367 e 180 che coordinano il rame. Il loop è essenziale per la stabilità dell'architettura del sito attivo. Il modello inoltre giustifica due mutazioni che determinano un fenotipo albino, S380P e V393F. In particolare il gruppo idrossilico della S380 contribuisce al corretto orientamento della M374 mentre la sostituzione della V393 con un residuo ingombrante di fenilalanina, stericamente impedisce la corretto *fold*ing del sito attivo.

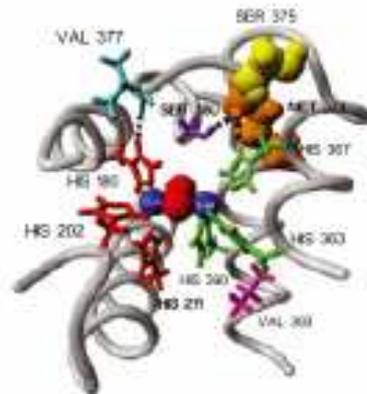


Figura 3.8

Recente modello proposto per la tirosinasi murina, ottenuto mediante *molecular modeling*. In viola, l'effetto stabilizzante di S380, rosso: CuA, verde: CuB, blu: rame, azzurro: V377, giallo: S375, arancio: M374, linee tratteggiate: legami idrogeno. Figura adattata da Schweikard *et al.* 2007⁹⁴.

La tirosinasi umana possiede un'identità dell'85% con la tirosinasi murina e del 29% con quella di *Streptomyces castaneoglobisporus*, ma l'identità aumenta notevolmente in prossimità del sito attivo (Figura 3.9). Un'altra tirosinasi studiata per chiarire il meccanismo e la struttura del sito attivo, e la tirosinasi di *Streptomyces antibioticus*⁹⁵⁻⁹⁸. L'identità di sequenza tra l'enzima di *S. castaneoglobisporus* e *S. antibioticus* è del 82%. Di seguito viene riportato l'allineamento eseguito sulle sequenze della tirosinasi di uomo, topo, *S. castaneoglobisporus* e *S. antibioticus*.

```

Human      MLLAVLYCLLWSFQTSAGHFPRACVSSKNLMEKECCPPWSGDRSPCGQLSGRGSCQNILL 60
Mouse      MFLAVLYCLLWSFQISDGHFPRACASSKNLLAKECCPPWMGDGSPCGQLSGRGSCQDILL 60
S.castan.  -----
S.antib.   -----

Human      SNAPLGPQFPFTGVDDRESWPSVFNRTQCQSGNFMGFNCGNCKFGFWGPNCTERRLLVR 120
Mouse      SSAPSGPQFPFKGVDDRESWPSVFNRTQCQSGNFMGFNCGNCKFGFGGPNCTEKRVLIR 120
S.castan.  -----MTVR 4
S.antib.   -----MTVR 4
                                     : : *

Human      RNIFDLSAPEKDKFFAYLTAKHTISSDYVIPIGTYGQMKNGSTPMFNDINIYDLFVWMH 180
Mouse      RNIFDLSVSEKNKFFSYLTAKHTISSVVIPTGTYGQMNGSTPMFNDINIYDLFVWMH 180
S.castan.  KNQATLTADEKRRFVAAVLELKRSGR-----YDEFVTRTH 38
S.antib.   KNQASLTAEEKRRFVAALLELKRTGR-----YDAFVTTH 38
: *      * : .  * * : * . : :      * : :
                                     * * * * *
                                     ↑
    
```


covalente che insieme cooperano per un appropriato processo di maturazione della proteina nascente.

Grazie della natura molto visibile della sua attività e la sua connessione con molte patologie, la tirosinasi umana è stata scelta come proteina modello per studiare il processo di maturazione delle proteine di membrana nell'uomo e la sua maturazione è schematicamente riassunta in

Figura 3.10⁹².

Quando nel ribosoma inizia la sintesi della tirosinasi, la sequenza segnale (ss) inizialmente prodotta, lega la particella di riconoscimento del segnale (SPR) la quale indirizza la sintesi all'interno del ER legando il recettore della SPR. Questo è associato al canale Sec 61. La sintesi dunque procede all'interno del ER e la ss viene tagliata quando è distante 142 residui dal ribosoma. Le glicosilazioni vengono inserite in blocco, di seguito, durante la sintesi, quando un residuo Asn è posizionato a 12-14 aa all'interno del ER.

La tirosinasi umana è glicosilata in maniera eterogenea, con sei o sette glicosilazioni (l'Asn 272 è ipoglicosilata a causa della sua prossimità alla Pro 275). La glicosilazione è essenziale per l'attività tirosinasi; la sua inibizione abolisce completamente l'attività dell'enzima. È stato dimostrato che le glicosilazioni in posizioni Asn 68 e Asn 353 sono fondamentali per il corretto *fold*ing della proteina. Le glicosilazioni sono necessarie per una efficiente operazione di reclutamento all'interno del sistema chaperoninico della calnessina. È stato proposto che il sistema di controllo della qualità opera localmente, e ogni singola glicosilazione riveste un ruolo diverso nel *fold*ing. Mutazioni nei siti di glicosilazione determinano la formazione di tirosinasi con una parziale o totale assenza di attività.

La BiP (una Hsp70, che lega regioni idrofobiche), la calnessina e la calreticulina (che lega regioni idrofobiche associate a N modificati), assistono la corretta maturazione della proteina. La BiP è la prima che si associa alla tirosinasi durante la sua maturazione, quando l'N-terminale è distante 142-170 residui dal ribosoma. La calnessina (una chaperonina di membrana) e la calreticulina (la sua paraloga in forma solubile) si legano alla proteina in sintesi finché, nel processo di maturazione del carboidrato associato alle Asn, il glucosio finale viene tagliato dalla glucosidasi II. La co-espressione della tirosinasi e di calnexina in cellule

COS7 raddoppia l'attività della tirosinasi rispetto alla sua espressione da sola. Mutazioni della tirosinasi che determinano una prematura terminazione dell'enzima, con la scomparsa del dominio trans-membrana, determinano la formazione di una tirosinasi in forma solubile ma inattiva, a causa di una mancata iterazione con la calnessina, proteina associata alle membrane⁹⁹.

La tirosinasi possiede 15 cisteine luminali distribuite in tre *cluster* principali. La formazione di ponti disolfuro è catalizzata da proteine della famiglia delle disolfuro isomerasi. In particolare è stata osservato che, durante la sua maturazione, la tirosinasi interagisce con l'ossidoreduttasi ERp57, associata alla calnessina e alla calreticulina.

La maturazione dell'enzima procede poi con la formazione di omodimeri, dopo aver raggiunto il corretto *folding* nel ER e prima di essere trasportato nel Golgi. Questi dimeri non sono covalentemente legati. La dimerizzazione necessita un corretto *folding* della proteina e la presenza di proteina *tyrosinase related*, precedentemente descritte. Infatti queste proteine sembrano stabilizzare la tirosinasi nella sua dislocazione lungo la via di secrezione, e sembrano andare a costituire un complesso melanogenico che incrementa l'attività della tirosinasi. L'enzima maturato correttamente nel ER viene quindi inviato mediante vescicole ricoperte da COPII al cis-Golgi. Successivamente vengono tolti dei mannosili dalle glicosilazioni mediante la mannosidasi I e II, mentre la glicotransferasi aggiunge altri zuccheri complessi (l'enzima diventa resistente al trattamento con l'endoglicosidasi).

Le metallo-ciaperonine HAH1 o ATOX1 trasportano il rame all'interno del trans-Golgi. Due trasportatori ATPasici (ATP7A e ATP7B) sembrano intervenire nel caricamento del rame nel complesso melanogenico. Difetti dell'ATP7A sono associati a disordini nel trasporto del rame che causano una malattia chiamata Menkes, letale. L'espressione della tirosinasi in fibroblasti Menkes immortalizzati porta alla formazione di una tirosinasi inattiva.

La tirosinasi, così come altre proteine associate al melanosoma, possiedono una sequenza di riconoscimento nella coda citoplasmatica costituito da due leucine consecutive, precedentemente descritte, che indirizzano l'enzima nel corretto compartimento. L'eliminazione della coda citoplasmatica nella tirosinasi murina, o la mutazione puntiforme di questi residui, determina una errata

localizzazione dell'enzima nella superficie extracellulare della membrana plasmatica delle cellule pigmentate epiteliali della retina nei topi albi di tipo *agouti*. L'espressione della tirosinasi nelle cellule non melanogeniche HeLa, determina il suo confinamento nel lisosoma, precursore evolutivo del melanosoma, mentre una mutazione nelle due leucine della coda citoplasmatica, ne indirizza la localizzazione nella superficie esterna della membrana plasmatica. Recentemente è stato scoperto che due proteine AP-1 e AP3, indipendentemente giocano un ruolo importante nel trasferimento dell'enzima nel melanosoma. Infine, è stato dimostrato che altre proteine specifiche dei melanociti svolgono un ruolo chiave nell'assistere il *folding* della tirosinasi o regolarne l'indirizzamento, come la proteina di membrana P e la MATP.

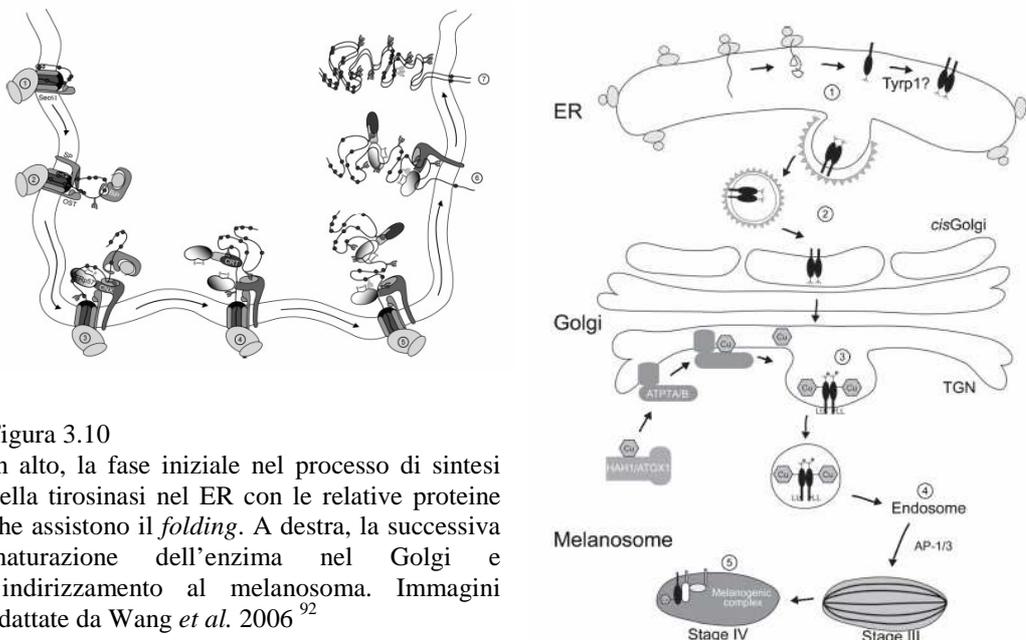


Figura 3.10
In alto, la fase iniziale nel processo di sintesi della tirosinasi nel ER con le relative proteine che assistono il *folding*. A destra, la successiva maturazione dell'enzima nel Golgi e l'indirizzamento al melanosoma. Immagini adattate da Wang *et al.* 2006⁹²

3.1.3 Il ruolo della tirosinasi umana in patologie e trattamenti

Problemi di pelle associati ad una erronea pigmentazione rappresentano i disturbi dermatologici più frequenti. Molteplici meccanismi sono coinvolti in questi cambiamenti, implicati soprattutto nella regolazione della funzionalità dei melanociti. In questa parte focalizzeremo l'attenzione sul ruolo della tirosinasi nelle malattie dermatologiche come l'ipopigmentazione (albinismo) e il suo *targeting* farmaceutico nel trattamento dell'iperpigmentazione. Inoltre ci

focalizzeremo nella possibile implicazione della tirosinasi nella formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e in generale nello stress ossidativo, che potrebbe rappresentare una causa delle cause portano allo sviluppo di patologie che interessano cellule dove l'enzima è espresso, come il Parkinson e il melanoma, così come ci focalizzeremo sull'utilizzo della tirosinasi per il loro trattamento.

3.1.3.1 L'albinismo

Difetti nel funzionamento dell'enzima tirosinasi possono causare la depigmentazione della pelle e sono associati all'Albinismo Occulocutaneo di tipo 1 (OCA1), una delle più comuni forme di albinismo. I classici casi di OCA1, sono caratterizzati dalla totale assenza di melanina nella pelle, nei capelli e negli occhi. Più di 100 diverse mutazioni del gene della tirosinasi possono essere associate ad un fenotipo amelanotico (*Albinism database*: <http://albinismdb.med.umn.edu/>). L'analisi delle mutazioni, riscontrate in diversi pazienti albinici, rappresenta uno strumento molto utile per trarre conclusioni sui domini funzionali ed i residui critici per l'attività dell'enzima, nonché sulle regioni regolatorie della sua espressione (Figura 3.11). Queste mutazioni si presentano in un ampio numero di forme: missenso, non-senso, *frameshift* e delezioni. Alcune di queste mutazioni coinvolgono direttamente residui cisteinici (C71R) o dei siti di glicosilazione (T355K), che impediscono una corretta maturazione della tirosinasi, mentre altre coinvolgono direttamente il sito attivo dell'enzima (H349Y).

Il classico tipo di casi OCA1 sono caratterizzati dalla totale assenza di melanina nella pelle, negli occhi e nei peli fino dalla nascita. L'iride può essere blu chiaro e traslucido così come l'iris appare rosso o rosa alla luce, mentre con l'aumentare dell'età può acquisire qualche forma di pigmentazione. La pelle rimane bianca o diventa leggermente pigmentata nel tempo; se rimane non protetta, si possono sviluppare eritemi qualora sia esposta al sole. Tuttavia, in generale, si osservano differenti fenotipi nell'OCA1, che dipendono dall'attività residua della tirosinasi, prodotta dagli alleli mutanti dell'enzima.

L'OCA1 è stata classificata in due categorie: (a) OCA1A, quando l'attività della tirosinasi è completamente assente e (b) OCA1B, quando un'attività residua dell'enzima rimane. L'OCA1A rappresenta ovviamente la forma più grave di

OCA1. La capacità visiva dei pazienti affetti da OCA1A è notevolmente ridotta a tal punto che essi sono riconosciuti come ciechi, dal momento che la pigmentazione del RPE, che regola la proliferazione e la differenziazione della retina neurale durante lo sviluppo è cruciale per sviluppare una corretta visione. Astigmatismo, strabismo, fotofobia sono normalmente molto gravi in questi soggetti, e l'iride, che appare loro rosa alla nascita, spesso diventa blu-grigio con l'età. Il fenotipo OCA1A è lo stesso in tutti i gruppi etnici, indipendente dall'età, ed è caratterizzato da un'assenza di melanina per tutta la vita del paziente. Diversamente nell'OCA1B, seppure ci sia poca o nessuna presenza di melanina alla nascita, una progressiva melanizzazione può avvenire nel tempo. Il livello può variare da un basso livello fino a una quasi normale pigmentazione e il fenotipo è influenzato dall'appartenenza etnica e famigliare del paziente⁷⁸.

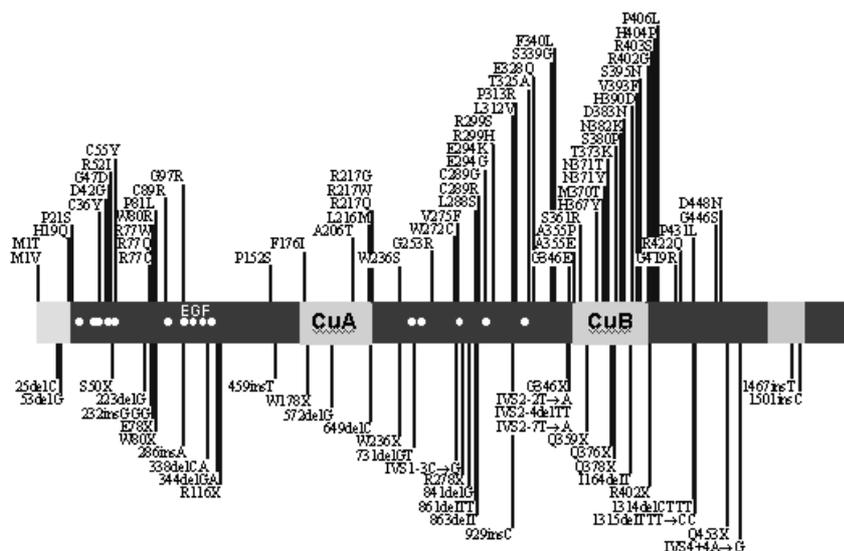


Figura 3.11
Principali siti di mutazione nella sequenza aminoacidica della tirosinasi, che comprende mutazioni missenso, non-senso, *frameshift* e delezioni. Immagine adattata dal database dell'albinismo (<http://albinismdb.med.umn.edu/>).

3.1.3.2 Discromie cutanee e trattamento dell'iperpigmentazione

L'incremento nella produzione e nell'accumulo di melanine caratterizza un ampio numero di malattie associate alla pelle, che include iperpigmentazioni acquisite come melasma, iperpigmentazioni post infiammatorie, lentigo solari, etc. L'iperpigmentazione dell'epidermide può dipendere sia da un aumento del numero di melanociti, sia da un'aumentata attività degli enzimi coinvolti nella

melanogenesi. La luce ultravioletta, le infiammazioni croniche, l'irritazione meccanica della pelle, così come un'anormale rilascio dell'ormone di stimolazione degli α -melanociti (α -MSH), sono le principali cause di questi disturbi. Come risultato della loro principale localizzazione in aree esposte alla luce, le iperpigmentazione acquisite hanno un'importanza psicologica e cosmetica rilevante, al punto tale che molti studi si sono focalizzati nella ricerca e allo *screening* di possibili agenti depigmentanti¹⁰⁰.

Il principale meccanismo *target* per il trattamento di queste patologie è rappresentato dalla melanogenesi. Sono stati identificati una serie di inibitori della melanogenesi, sia di origine naturale che sintetica (Figura 3.12). Le varie tipologie di inibitori della melanogenesi sono state raggruppate in sei diversi tipologie: (1) agenti riducenti che determinano la riduzione del dopachinone al suo precursore L-DOPA, evitando la formazione del dopacromo e la successiva formazione delle melanine: così ad esempio agisce l'acido L-ascorbico; (2) reattivi contro gli *o*-dopachinoni, come molti composti tiolici, che sono ben noti inibitori della melanogenesi in quanto reagiscono con l'*o*-dopachinone a formare prodotti poco colorati. (3) Substrati alternativi, come molti composti fenolici, le cui relative forme chinoniche assorbono in una regione spettrale diversa da quella del dopacromo e possono competere con il substrato naturale L-tirosina, rallentando o modificando la sintesi delle melanine. Tuttavia queste prime tipologie di inibitori rallentano la melanogenesi fintanto che non sono completamente consumati, dopo di che, la melanogenesi riprende con la stessa velocità che aveva prima del trattamento. (4) Inattivatori non specifici della tirosinasi, come acidi o basi, che in maniera non specifica denaturano l'enzima inibendone la sua attività. (5) Inattivatori specifici della tirosinasi, come inibitori specifici nel meccanismo di catalisi, anche detti substrati suicidi. Questi inibitori sono riconosciuti dal sito attivo dell'enzima e portano alla formazione di legami covalenti con l'enzima o alla formazione di stati inattivi dell'enzima, in maniera irreversibile. Tra questi, quei substrati che inducono l'enzima a reagire seguendo la via del suicidio (vedi paragrafo 3.1.2.3). (6) Inibitori specifici della tirosinasi che legano l'enzima in modo reversibile e riducono la sua capacità catalitica, come molti composti di origine naturale. Tipicamente questi inibitori sono classificati a loro volta in

quattro gruppi, costituiti dagli inibitori competitivi, un-competitivi, inibitori misti, e non competitivi^{101, 102}.

La disponibilità commerciale della tirosinasi di fungo ha giocato un ruolo cruciale dello studio degli inibitori di questo enzima e molte ricerche sono state condotte su questo unico enzima purificato dal fungo *A. bisporus*. Tuttavia l'utilizzo di questo enzima ha dato alcune limitazioni per quanto riguarda l'utilizzo di inibitori della tirosinasi di fungo in applicazioni sull'uomo, a causa delle differenze che distinguono la tirosinasi di fungo rispetto a quella umana: la tirosinasi di fungo è un enzima citosolico mentre quello umano è associato alle membrane. In più, quello di fungo è un tetramero mentre quello umano è un dimerico ed viene altamente glicosilato durante il suo complesso processo di maturazione. Per questo motivo rimane ancora molto limitata l'informazione riguardo gli inibitori scoperti per la tirosinasi umana ed uno studio biochimico, cinetico, strutturale e del meccanismo di azione di questi inibitori nei confronti dell'enzima deve ancora essere sviluppato.

Attualmente nessuno studio sull'inibizione è stato effettuato utilizzando la tirosinasi umana, a causa della mancanza di un sistema di espressione ricombinante dell'enzima e di purificazione, sebbene alcuni studi siano stati effettuati utilizzando un estratto crudo di melanociti umani come fonte di enzima.

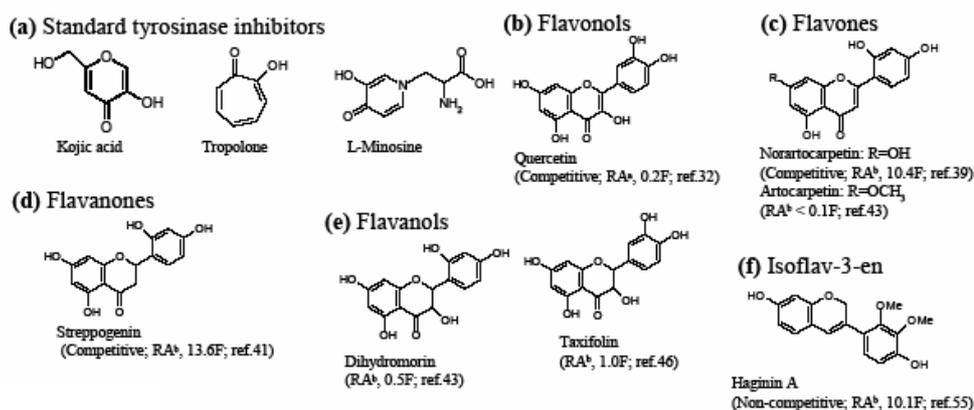


Figura 3.12
 Alcuni gruppi di molecole inibitrici della tirosinasi. Adattato da Chang 2009¹⁰¹.

3.1.3.3 Il morbo di Parkinson

La malattia di Parkinson rappresenta una delle patologie, associate al movimento, più frequenti e, dopo la malattia di Alzheimer, la più diffusa malattia neurodegenerativa che affligge 1-2% delle persone sopra i 65 anni. Essa rappresenta una patologia progressiva caratterizzata dall'incapacità di iniziare, eseguire e controllare i movimenti.

Dal punto di vista neuronale, la malattia è caratterizzata da una perdita selettiva dei neuroni dopaminergici nella *substantia nigra* nella regione *pars compacta*, accompagnata da una dispersione della dopamina nello *striatum* e dalla presenza di inclusioni citoplasmatiche conosciute come corpi di Lews. La maggior parte delle forme di Parkinson sono sporadiche, sebbene in alcuni casi una correlazione familiare sia stata osservata. Se la patogenesi della malattia nei casi sporadici rimane sconosciuta, le forme associate a mutazioni genetiche, che caratterizzano le forme familiari, hanno dimostrato in modo evidente come la patogenesi sia associata a disfunzioni mitocondriali, all'incremento dello stress ossidativo, a deregolazioni del sistema ubiquitina-proteosoma e alla scorretta strutturazione di proteine e la loro relativa aggregazione in strutture fibroidali. Inoltre, a causa del significativo contenuto di dopamina che caratterizza le cellule coinvolte da questa patologia, è stato proposto che la dopamina stessa, o un suo metabolita, come i dopammino-chinoni che derivano dall'ossidazione dell'anello catecolico, possono costituire la selettiva vulnerabilità di questi neuroni.

Quando la quantità di dopamina citosolica supera le concentrazioni fisiologiche, la dopamina può essere metabolizzata mediante la monoammino ossidasi e aldeide ossidasi a formare il relativo acido 3,4-diidrossifenilacetico, non tossico, e perossido, o può essere sequestrato all'interno dei lisosomi dove si auto ossida a formare neuromelanina. Quest'ultima, precedentemente introdotta, rappresenta un polimero stabile, responsabile della pigmentazione scura della *substantia nigra*, che potrebbe svolgere all'interno delle cellule, un ruolo neuroprotettivo riducendo l'attività citotossica dai dopamminochinoni e sequestrare al suo interno pericolosi metalli come ferro, rame, manganese e

catalizzando la formazione di neuromelanina. Il suo ruolo in questa patologia, dunque, rimane ancora da chiarire.

3.1.3.4 La tirosinasi come target per il trattamento del melanoma.

Il melanoma maligno è uno dei più mortali cancri dell'uomo. Si stima che 55.100 nuovi casi di melanoma invasivo siano diagnosticati in USA ogni anno, e 7.910 quelli che moriranno per questa malattia. L'età in cui questa malattia può colpire va da 1 a 74 anni. Attualmente la principale terapia per il trattamento del melanoma consiste nell'intervento di rimozione chirurgico, che tuttavia ha un'elevata probabilità di fallire nei casi più avanzati o metastatici, che risultano anche quelli più fatali.

È stato dimostrato che, quando i melanociti diventano maligni, il gene per l'espressione della tirosinasi risulta sovraespresso, con il conseguente incremento dei livelli di tirosinasi presenti all'interno delle cellule cancerose. Non è comunque ancora chiaro se l'enzima in sé o la diversa composizione in feomelanine ed eumelanine possa favorire la formazione di specie citotossiche. Il più diffuso e utilizzato *marker* specifico per determinare la presenza di cellule di melanoma circolante è rappresentato da una RT-PCR per l'espressione del gene della tirosinasi.

Per questo motivo, dal momento che la tirosinasi rappresenta una proteina naturalmente presente nella cellula tumorale di questo tipo e virtualmente assente nelle altre cellule, se confrontati i livelli di espressione, essa rappresenta un putativo enzima *target* per indirizzare farmaci selettivi per il trattamento di melanomi. Una serie di profarmaci, che vengono attivati dalla tirosinasi, sono stati oggetto di studio per il trattamento del melanoma. In generale esistono due tipi di approcci per questi farmaci, il primo definito come a "tallone d'Achille" e il secondo come "Cavallo di troia".

L'approccio a "tallone d'Achille" (Figura 3.14) si basa sull'utilizzo di substrati analoghi a quelli della tirosinasi, disegnati per massimizzare la produzione di prodotti di ossidazione altamente reattivi e la loro diffusione. Una volta rilasciati nel citosol, questi andranno ad interagire con vari componenti cellulari, causando danni irreversibili. Il limite di questa strategia è rappresentato dall'elevata reattività degli ortochinoni con i composti tiolici, rispetto ad altre

macromolecole, e di conseguenza la citotossicità dipende anche dalla mancanza di questi ultimi composti.

Nel caso invece delle molecole “cavallo di Troia”, il profarmaco è costituito da una porzione di molecola analoga ai substrati della tirosinasi, a cui è legata la molecola effettrice, il profarmaco che inizialmente non risulta tossico per la cellula. Il processamento della molecola ad opera dell'enzima, produce il relativo chinone instabile, che evolve spontaneamente liberando la porzione citotossica. Questo tipo di modalità chemioterapia nota come MDEPT (*melanocyte directed enzyme activated pro-drug therapy*) è attualmente in fase di sviluppo.

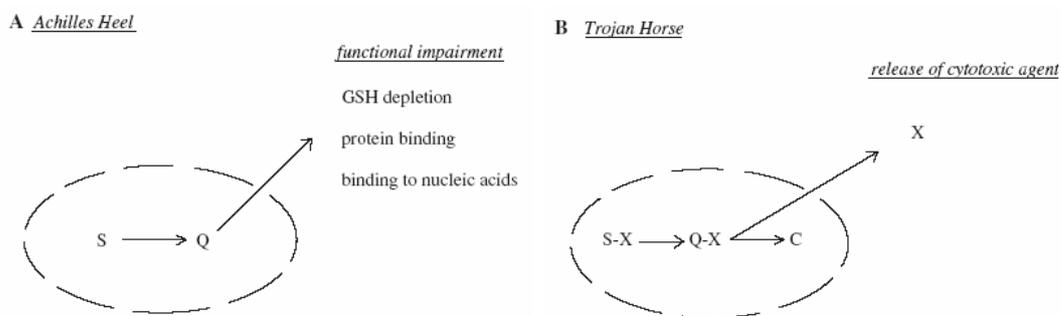


Figura 3.14 Strategie adottate che utilizzano la tirosinasi come enzima *target* per il trattamento del melanoma: a sinistra la strategia a “tallone d’achille”, a destra a “cavallo di troia”. Immagine adattata da Riley 2003.

3.2 Scopo del progetto

Seppure le informazioni riguardo sequenza genetica primaria della tirosinasi umana sia disponibile da tempo, l'enzima non è ancora stato ottenuto in forma ricombinante, attivo e purificato. Probabilmente il suo complicato processo di *folding*, che prevede l'intervento di numerosi sistemi di controllo di qualità e l'iterazione con numerose altre proteine, rende la sua produzione, in organismi semplici, inefficace nel tentativo di ottenerla in forma attiva.

L'utilizzo dell'enzima umano purificato rappresenta uno strumento fondamentale per conoscere i meccanismi d'inibizione degli attuali inibitori utilizzati e la progettazione dei futuri. Inoltre l'ottenimento di un'unica isoforma dell'enzima rappresenta uno strumento fondamentale per tentare di risolvere la struttura cristallografica dell'enzima: attualmente tutti gli esperimenti di *docking* con inibitori della tirosinasi vengono condotti sul modello della tirosinasi di *Streptomyces castaneoglobusporus*. Tuttavia si ritiene che notevoli differenze strutturali, in particolare sull'accessibilità al sito catalitico, differenziano le due tirosinasi.

Ottenere quindi un sistema per produrre un'unica isoforma dell'enzima, riproducibile, standardizzabile ed economicamente accessibile, rappresenta il primo traguardo da raggiungere per studiare l'enzima. Gli studi che poi possono essere effettuati sull'enzima prodotto, possono riguardare l'individuazione di nuovi inibitori per il trattamento delle iperpigmentazioni, lo studio del meccanismo catalitico e la definizione di residui coinvolti nell'attività catalitica, aggiungere nuovi dettagli nel suo ruolo in patologie associate a ROS e il suo potenziale utilizzo come *target* contro i melanomi.

In questo lavoro ci proponiamo di esprimere la tirosinasi umana in forma ricombinante e attiva, utilizzando cellule di insetto di *Spodoptera frugiperda* in coltura (Sf9) e il baculovirus (AcPMV), la sua purificazione e caratterizzazione al fine di aggiungere nuove informazioni strutturali a quelle già esistenti.

3.3 Risultati

3.3.1 Espressione della tirosinasi mediante il sistema baculovirus

Precedenti tentativi di esprimere la tirosinasi umana in sistemi procariotici, o eucariotici poco evoluti, sono falliti nell'ottenimento dell'enzima in forma attiva, probabilmente per il complesso *folding* dell'enzima, che necessita di sistemi articolati di glicosilazione, trasporto del rame e controllo di qualità come precedentemente descritto^{99, 103-106}.

Rispetto a sistemi di espressione in cellule di mammifero, uno più economico e semplice è costituito dal sistema baculovirus, che consente di esprimere la proteina di interesse in cellule di insetto, sia adese che in sospensione. Per l'espressione in forma ricombinante della tirosinasi umana, è stato scelto questo sistema, spesso utilizzato per produrre proteine di membrane di organismi evoluti, come i mammiferi. La linea cellulare sf9 scelta (cellule di ovaio di *Spodoptera frugiperda*), rappresenta il tipo cellulare più economico e facilmente maneggiabile per sfruttare questo sistema.

3.3.1.1 Il sistema baculovirus

Negli ultimi vent'anni il sistema di espressione che utilizza cellule di insetto, associato a una forma di baculovirus (AcMNPV) appositamente ingegnerizzato, è diventato uno dei sistemi più diffusi per la produzione di proteine complesse ed è stato utilizzato con successo per l'espressione di centinaia di diverse tipologie di proteine come, ad esempio, recettori associati alla proteina G o citocromi p450. Si ritiene che questo sistema possieda proteine eucariotiche capaci di foldare, modificare, trasportare ed assemblare polipeptidi di nuova sintesi generando proteine molto simili a quelle originali.

Tuttavia è anche vero che la via di processamento delle proteine negli insetti non è esattamente sovrapponibile a quella degli eucarioti evoluti, come i mammiferi, in particolare per quanto riguarda il sistema di glicosilazione. È noto che la maggior parte delle linee cellulari di insetto convertono l'N-glicano l'intermedio, ad elevato contenuto di mannosio, comune anche per gli organismi

mammiferi, in un prodotto paucimannosico specifico solo degli insetti (Figura 3.15). Questo limite del sistema baculovirus può essere o meno considerato, in base al tipo di proteina di interesse, al ruolo degli N-glicani in essa e al contributo che da l'acido sialico terminale alla funzione della proteina. In ogni caso questo limite può essere superato utilizzando linee cellulari di insetto appositamente modificate con un sistema di glicosilazione tipico dei mammiferi¹⁰⁷.

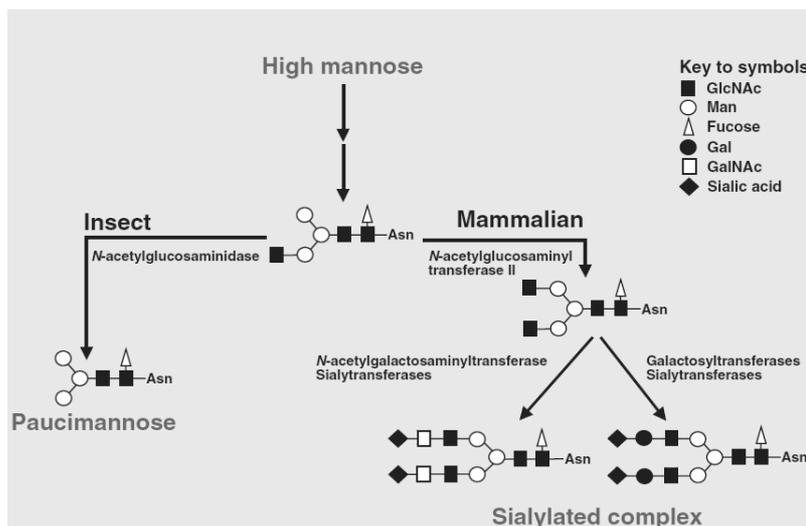


Figura 3.15 Schematizzata la differente modalità di glicosilazione che distingue il sistema dei mammiferi rispetto al sistema degli insetti. Immagine adattata da Kost *et al.* 2005¹⁰⁷.

Nei seguenti paragrafi verrà descritto come l'enzima, nella sua forma intera e in una forma solubile, sia stato clonato ed espresso. Saranno trattati, poi, gli le procedure adottate nella purificazione e la caratterizzazione della forma intera e attiva. La forma solubile, costituita dal solo dominio luminale, putativamente non glicosilato e non associato a membrane, è stata espressa solo come controllo negativo, inizialmente nella fase di espressione e successivamente nei test di attività. Infatti, la sequenza segnale che caratterizza la forma intera è riconosciuta, nell'uomo, dalla particella di riconoscimento del segnale (SRP, vedi introduzione); che questa sequenza umana sia riconosciuta anche dall'omologa particella nelle cellule d'insetto, è plausibile, ma non ovvio. Nel caso l'enzima, nella sua forma intera non fosse stato espresso, un controllo negativo privo della sequenza segnale, avrebbe potuto evidenziare la causa del problema.

3.3.1.2 Clonaggio nel vettore pFastBac ®

In un primo costrutto il gene per la tirosinasi umana è stato clonata nel vettore pFastBac ® nella sua intera lunghezza (aa 1-529), codificante per la sequenza segnale (ss), il dominio luminale, quello transmembrana e quello citosolico. Nel secondo costrutto è stata clonata solo la porzione codificante per il dominio luminale (aa 22-471). Entrambi i costrutti sono stati ottenuti da sequenze clonate in diversi vettori, disponibili presso il nostro laboratorio, da un iniziale sequenza ottenuta da Spritz¹⁰⁸ clonata dal vettore pBR322.

Il cDNA codificante per la sequenza intera dell'enzima è stato ottenuto da una sequenza precedentemente clonata in nel vettore pCDNA3, dove la sequenza era stata inserita tra due siti di restrizione EcoRI-EcoRI, mentre la sequenza della forma solubile è stata ottenuta da quella precedentemente clonata nel vettore pCR2.1 tra i siti di restrizione EcoRI e XbaI. La strategia di clonaggio prevede l'inserimento delle due sequenze nel vettore pFastBac ® (Figura 3.16) mediante gli stessi siti di restrizione. La procedura è descritta in Materiali e Metodi. Il principale controllo del clonaggio è mostrato in Figura 3.17.

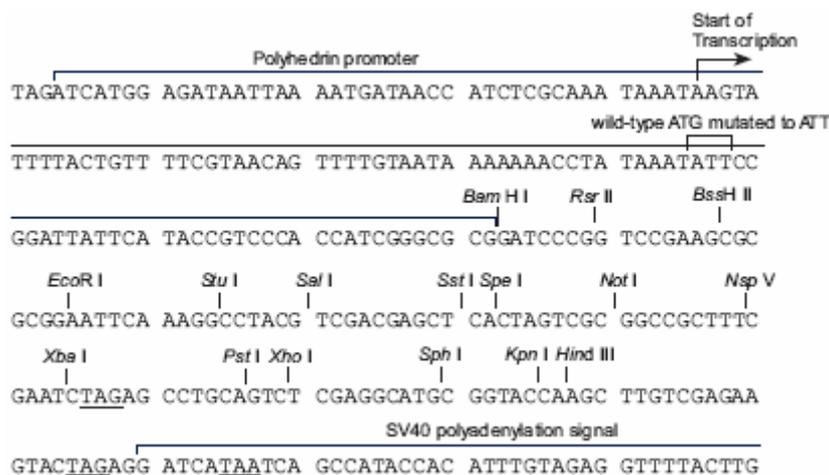


Figura 3.16
Mappa dei siti di restrizione che caratterizzano il *multi cloning site* del pFastBac ®, immagine tratta dal manuale Bac to Bac.

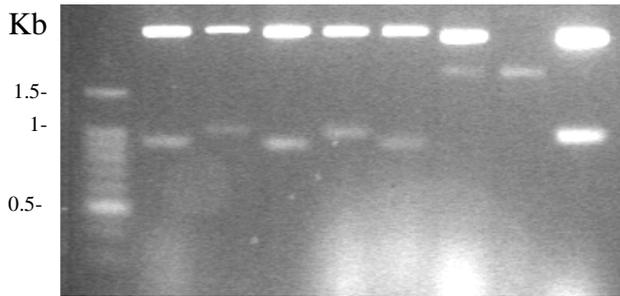


Figura 3.17
A sinistra, gel al 2%, gel d'agarosio all'1% con i plasmidi purificate da colonie casualmente scelte e digerite con BamHI e NcoI, per evidenziare le dimensioni del frammento ottenuto (vedi Materiali e Metodi).

Di seguito vengono dettagliatamente mostrate, nella sequenza nucleotidica della tirosinasi, i principali siti utilizzati per il clonaggio e il sequenziamento dell'enzima, nonché i siti che distinguono la forma intera dalla forma luminale (Figura 3.18).

	Nt	AA
cttgtgaggattcgaggaagaatgctcctggctgttttgtactgctgctgtggagtttc	39	
M L L A V L Y C L L W S F		13
cagacctccgctggccatctccctagagcctgtgtctcctctaagaacctgatggagaag	99	
Q T S A G H F P R A C V S S K N L M E K		33
gaatgctgtccaccgtggagcggggacaggagtcctctgtggccagctttcaggcagaggt	159	
E C C P P W S G D R S P C G Q L S G R G		53
tcctgtcagaatatccttctgtccaatgcaccacttgggcctcaatttcccttcacaggg	219	
S C Q N I L L S N A P L G P Q F P F T G		73
gtggatgaccgggagctgtggccttccgtctttataataggacctgccagtgtctggc	279	
V D D R E S W P S V F Y N R T C Q C S G		93
aacttcattgggactcaactgtggaactgcaagtttggcttttgggaccaaactgcaca	339	
N F M G F N C G N C K F G F W G P N C T		113
gagagacgactccttggtgagaagaacatcttcgatttgagtgcccagagaaggacaaa	399	
E R R L L V R R N I F D L S A P E K D K		133
tttttgcctacctcacttagcaagcataccatcagctcagactatgtcatccccata	459	
F F A Y L T L A K H T I S D Y V I P I		153
gggacctatggcctaaatgaaaaatggatcaacacctatgtttaaagacatcaatatttat	519	
G T Y G Q M K N G S T P M F N D I N I Y		173
gacctcttctgtctggatgcattattatgtgtcaatggatgcactgcttgggggatctgaa	579	
D L F V W M H Y Y V S M D A L L G G S E		193
atctggagagacattgattttgccatgaagcaccagcttttctgccttggcatagactc	639	
I W R D I D F A H E A P A F L P W H R L		213
ttcttgttgcggtgggaacaagaatccagaagctgacaggagatgaaaacttcactatt	699	
F L L R W E Q E I Q K L T G D E N F T I		233
ccatattgggactggcgggatgcagaaaagtgtgacatttgcacagatgagtacatggga	759	
P Y W D W R D A E K C D I C T D E Y M G		253
ggtcagcaccacaaaatcctaacttactcagccagcatcattcttctcctcttggcag	819	
G Q H P T N P N L L S P A S F F S S W Q		273
attgtctgtagccgattggaggaatgacaacagccatcagcttttatgcaatggaacgcc	879	
I V C S R L E E Y N S H Q S L C N G T P		293
gagggacctttacggcgtaatcctggaaacctgacaaaatccagaaccccaaggctcccc	939	
E G P L R R N P G N H D K S R T P R L P		313
tcttcagctgatgtagaattttgcctgagtttgaccaatatgaaatctggttccatggat	999	
S S A D V E F C L S L T Q Y E S G S M D		333
aaagctgccaatttcagctttagaatacactggaaggatttgcagctccacttactggg	1059	
K A A N F S F R N T L E G F A S P L T G		353
atagcggatgcctctcaaagcagcatgcacaatgccttgcacatctatatgaatggaaca	1119	
I A D A S Q S S M H N A L H I Y M N G T		373
atgtcccaggtacagggatctgccaacgatcctatcttcttcttccaccatgcatttgtt	1179	
M S Q V Q G S A N D P I F L L H H A F V		393
gacagtatTTTTGagcagtggtccgaaggcaccgtcctcttcaagaagtttatccagaa	1239	
D S I F E Q W L R R H R P L Q E V Y P E		413
gccaatgacccccatgggacataaccgggaatcctacatggtttctttataccactgtac	1299	
A N A P I G H N R E S Y M V P F I P L Y		433
agaaatggtgattctttatcttcatccaaagatctgggctatgactatagctatctacaa	1359	
R N G D F F I S S K D L G Y D Y S Y L Q		453
gattcagaccagactcttttcaagactacattaagtctatttggacaacggcagtcgg	1419	

D S D P D S F Q D Y I K S Y L E Q A S R	473
atctggtc[atgggctccttggggcgcgatggtaggggcccgcctcactgccctgctggca	1479
I W S W L L G A A M V G A V L T A L L A	493
ggccttgtagcttgctgtgtcgtcacaagagaaaagcagcttcctgaagaaaagcagcca	1539
G L V S L L C R H K R K Q L P E E K Q P	513
ctcctcatggagaaaggattaccacagcttgatcagagccattataaaaggcttag	1599
L L M E K E D Y H S L Y Q S H L Stop	529
gcaatagagtggggcaaaaagcctgacctcactctaactcaaagtaatgtccaggttcc	1659
cagagaatatctgctggtatTTTTctgtaaagaccatttgcaaaattgtaacctaataca	1719
aagtgtagccttcttccaactcaggtagaacacacctgtctttgtcttgctgttttcaact	1779
cagcccttttaacattttccctaagcccatatgtctaagaaaggatgctatttggtaa	1839
tgaggaactgttatttggatgtgaattaaagtgtcttatttttaaaaaaccggaattca	1899

Figura 3.18

cDNA della tirosinasi (NM_00032) e relativa sequenza proteica (NP00363). I nucleotidi (nt) sono numerati nella colonna di sinistra, iniziando dall'atg, mentre gli amminoacidi (aa) nella colonna di destra. In evidenza: il sito di restrizione EcoRI iniziale e quello finale utilizzato per il clonaggio della forma intera (in grigio); sequenza iniziale della forma luminale, in cui i residui indicati (in blu) sono sostituiti con la sequenza gaattcatg, contenente un sito di restrizione EcoRI e l'atg iniziale, mentre il relativo codone di stop è inserito sostituendo i nucleotidi indicati (in rosso) gtc con ata; le regioni utilizzate per il sequenziamento sono indicate ripetutamente per la Tyr02Fow (in azzurro) la Tyr01Rev (in viola) e la 3TyrFow(in giallo). Infine è evidenziata anche una mutazione silente individuata nella nostra sequenza (in grigio chiaro)

3.3.1.3 Trasformazione delle cellule di E. coli DH10Bac ®

I plasmidi ottenuti pFastBac contenenti la sequenza nucleotidica della tirosinasi nella sua forma intera e nella sua forma luminale, sono stati utilizzati per trasformare cellule DH10Bac ® di *E. coli* chimicamente competenti. Come descritto su manuale di riferimento Bac-to-Bac ® (Invitrogen), queste cellule contengono il bacmide e il plasmide *Helper* che aiuta la ricombinazione del bacmide con il pFastBac mediante le regioni Tn7L, e la conseguente soppressione del gene *lacZ* contenuta nel Bacmide (vedi Figura 3.19). Quando la ricombinazione avviene, queste cellule, piastrate in un terreno contenente X-gal e IPTG, saranno facilmente distinguibili, perchè di colore bianco, da quelle non ricombinante, di colore blu. Sono state ottenute alcune colonie bianche per ciascun tipo di costrutto (vedi Figura 3.19). I primer M13 *forward* e M13 *reverse*, sono stati utilizzati per controllare l'effettivo inserimento della sequenza mediante PCR da colonia.

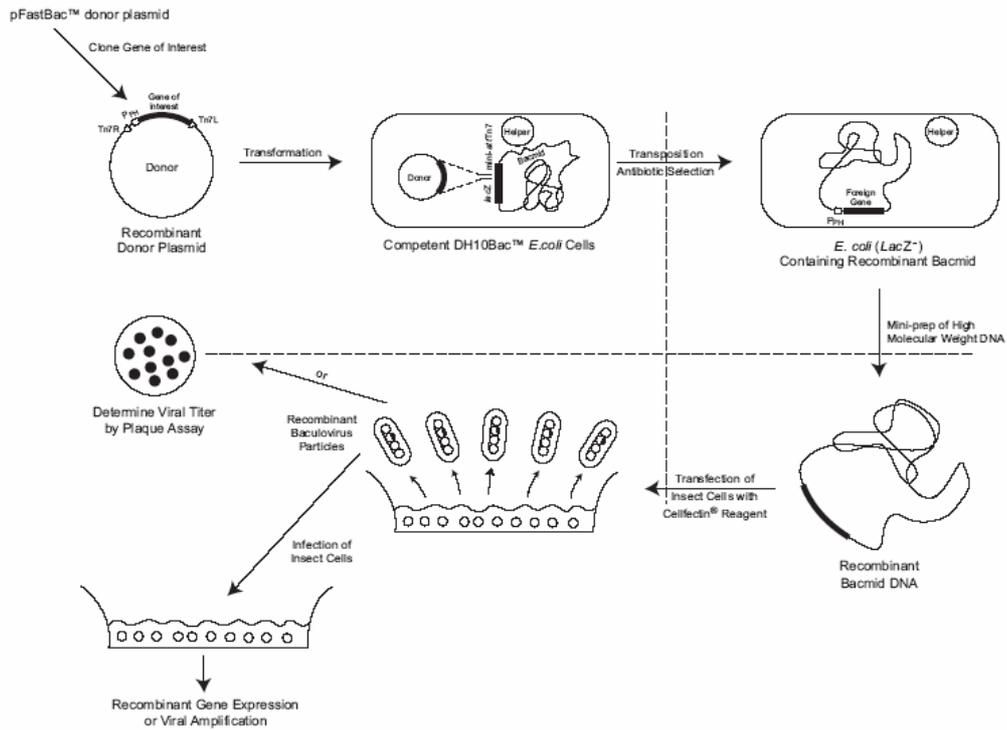
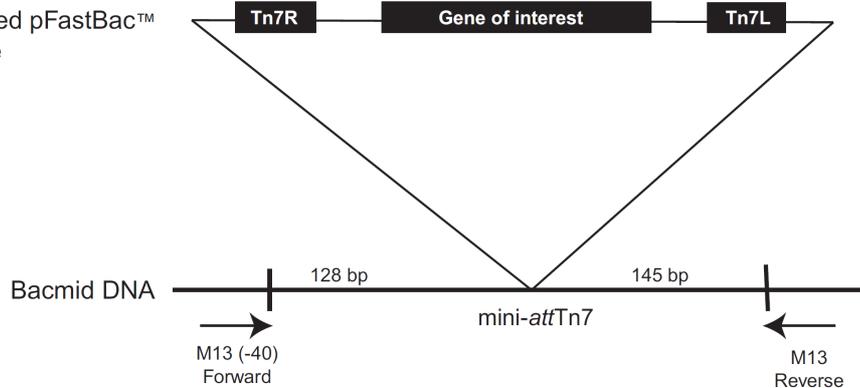


Figura 3.19
 Sopra, schema della procedura di preparazione del baculovirus ingegnerizzato. Immagine adattata dal manuale Bac-to-Bac® (Invitrogen).
 A destra, particolare delle piastra contenente X-gal e IPTG, utilizzata per lo screening delle colonie ricombinanti con il costrutto contenente il gene della tirosinasi. Tra le colonie bianche, alcune sono state utilizzate per un successivo controllo mediante PCR da colonia utilizzando i primers M13 come sotto schematizzato (immagine adattata dal manuale Bac to Bac®, Invitrogen).



Transposed pFastBac™ sequence



3.3.1.4 Trasfezione delle cellule sf9 e amplificazione del virus

Dalle cellule identificate mediante il precedente *screening*, i relativi Bacmidi sono stati purificati tramite midi-prep. Questi sono stati successivamente utilizzati per trasformare cellule sf9 di insetto, come da protocollo, usando il reagente lipidico Cellfectin (Invitrogen). Dopo 5 giorni le cellule sono state separate dal medium, contenente il virus e quest'ultimo, dopo microfiltrazione, è stato conservato a 4°C e utilizzato per le successive infezioni, rappresentando lo stock virale P0 per ciascun costrutto. Dopo aver aggiunto differenti volumi (100µl, 500µl o 1000µl) di stock P0 a cellule sf9 piastrate in flasche da 75 cm³ (1x10⁶ cellule/ml in 25 ml di medium), la variazione morfologica e la velocità di crescita cellulare sono state osservate nei tre giorni successivi all'infezione.

Quando il titolo virale è adeguato, si osserva un blocco della crescita cellulare e variazioni morfologiche consistenti delle cellule che aumentano notevolmente di dimensione o si deformano allungandosi; in più cambia la morfologia delle membrane cellulari che sono visibilmente granulose (Figura 3.20).

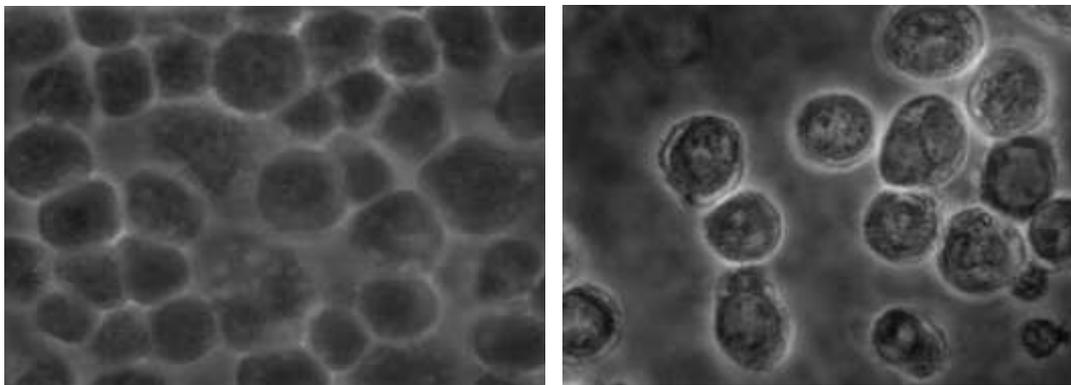


Figura 3.20

A sinistra, cellule sf9 non infettate, che crescendo formano uno strato confluyente di cellule; a destra, cellule sf9 infettate con il baculovirus ricombinante: le cellule smettono di crescere, aumentano in dimensione e possiedono una membrana granulosa. Immagine adattata¹⁰⁹.

Una adeguata quantità di stock virale, stimata in questo modo, è stata utilizzata per infettare tre flasche di cellule nelle stesse condizioni appena descritte. Dopo tre giorni le cellule sono state separate dal medium di crescita che, dopo essere stato microfiltrato, è stato utilizzato come stock virale P1 per le successive infezioni. In questo modo è stata aumentata la quantità totale di virus disponibile: nelle successive infezioni e negli stock successivamente preparati, il

titolo virale e la relativa quantità di stock di virus da utilizzare per le infezioni, è stata valutata nuovamente come descritto. Il titolo virale, infatti, dipende da diversi fattori: si riduce con il tempo, l'esposizione alla luce, il congelamento e altri processi fisici, quindi la stima del titolo deve essere ripetuto spesso. Non di meno, il consumo di stock virale necessita la preparazione di nuovi stock e la conseguente stima del titolo virale: con l'aumento dei volumi delle colture cellulari, la preparazione di nuovi stock diventa frequente.

Il metodo di stima del titolo virale utilizzato, seppure meno accurato rispetto al sistema di valutazione descritto nel manuale (Bac to Bac ®), che prevede l'identificazione di un valore di MOI/ml di stock, è stato sempre utilizzato in quanto più semplice e meno dispendioso in termini economici e temporali.

3.3.1.5 Espressione proteica

Al fine di osservare l'espressione dei costrutti della tirosinasi nelle cellule sf9, quattro fiasche da 75 cm³ contenenti cellule sf9 adese in 25 ml di medium (1x10⁶ cell/ml) sono state infettate con 300µl di stock virale P1 per l'espressione della tirosinasi nella sua forma intera e quattro fiasche per la forma solubile. Dopo rispettivamente 24, 48, 72 e 96 ore dall'infezione, le cellule sono state raccolte da una fiasca, lavate dal medium con una soluzione isotonica 0,9% NaCl e preparate per l'analisi SDS-PAGE e *western blot*. Sviluppando la membrana con due diversi anticorpi, un anticorpo monoclonale (T311) e uno policlonale (αPEP7h), è stato ottenuto il risultato mostrato in figura Figura 3.21.

Gli anticorpi scelti per sviluppare la membrana sono commercialmente disponibili o sono stati forniti da altri gruppi di ricerca: il T311, monoclonale, riconosce specificatamente una regione compresa tra le due regioni leganti gli atomi di rame del sito attivo¹¹⁰, mentre il secondo, l' αPEP7h, policlonale, riconosce la coda C-terminale della tirosinasi¹¹¹ come schematizzato in

Figura 3.22.

Come risulta dall'analisi western blot, l'enzima nella sua forma intera, inizia ed essere identificato 48 ore dopo l'infezione, aumentando poi in quantità dopo 72 e 96 ore. Il peso apparente di circa 66 kDa osservato coincide con quello atteso¹¹² e con quello del controllo positivo, ottenuto da cellule di melanoma parzialmente purificato.

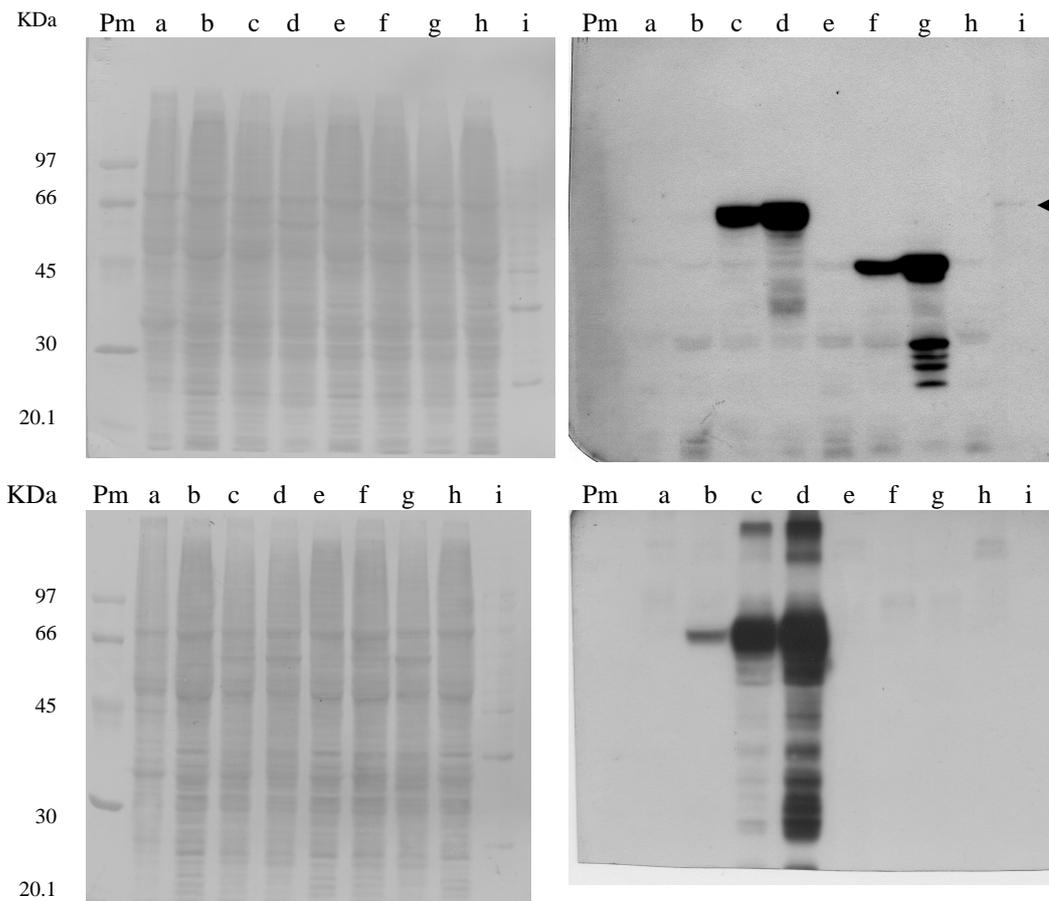


Figura 3.21

Analisi temporale del contenuto proteico delle cellule sf9 infettate con baculovirus, per l'espressione dei costrutti della tirosinasi. A destra, il risultato dello sviluppo mediante l'anticorpo T311(sopra) e α PEP7h (sotto); a sinistra le relative membrane PVDF. Caricamento dei campioni: pesi molecolari (Pm); cellule sf9 dopo 24 (a), 48 (b), 72 (c) e 96 (d) ore dall'infezione per l'espressione della tirosinasi intera e 48 (e), 72 (f) e 96 (g) ore dall'infezione con il costrutto per l'espressione del dominio luminale; controllo negativo costituito da cellule non infettate (h); controllo positivo costituito da un estratto parzialmente purificato di cellule le melanoma (i), la freccia evidenzia la banda relativa alla tirosinasi (\leftarrow).

```

MLLAVLYCLLWSFQTSAGHFPRACVSSKNLMEKECCPPWSGDRSPCGQLSGRGSCQNILL 60
SNAPLGPQFPFTGVDDRESWPSVVFYNRTCQCSGNFMGFNCGNCKFGFWGPNCTERRLLVR 120
RNIFDLSAPEKDKFFAYLTLAKHTISSDYVIPIGTYGQMKNGSTPMFNDINIYDLFVMMH 180
YYVSMDALGGSEIWRDIDFAHEAPAFLPWHRLFLLRWEQEIQKLTGDENFTIPYWDWRD 240
AEKCDICTDEYMGQHPPTNPPLLSPASFFSSWQIVCSRLEEYNSHQSLCNGTPEGPLRRN 300
PGNHDKSRTPRLPSSADVEFCLSLTQYESGSMDKAANFSFRNTLEGFASPLTGIADASQS 360
SMHNALHIYMNGTMSQVQGSANDPIFLLHHAHVDSIFEQWLRRHRPLQEVYPEANAPIGH 420
NRESYMPVFIPLYRNGDFFISSKDLGYDYSYLQSDPDSFQDYIKSYLEQASRIWSWLLG 480
AAMVGAULTALLAGLVSLLCRHKRKLPEEKQPLLMKEDYHSLYQSHL 529
    
```

Figura 3.22

Sequenza aminoacidica della tirosinasi nella sua forma intera, con evidenziati i frammenti riconosciuti dagli anticorpi T311 (grigio) e α PEP7h (grigio scuro). Sono inoltre sottolineati alcuni residui significativi: l'istidina iniziale (H) che caratterizza la forma matura della tirosinasi dopo l'eliminazione della sequenza segnale; l'arginina (R) sostituita con la metionina nel costrutto luminale dove ne costituisce il primo amminoacido; isoleucina terminale del costrutto luminale (I).

Questo suggerisce che l'enzima viene correttamente processato durante la sua sintesi, con un opportuno taglio della sequenza segnale e glicosilazione. Dopo 96 ore si osservano anche alcuni prodotti di degradazione ad indicare un tempo eccessivo dall'infezione. Nonostante l'espressione della proteina sia sufficiente per individuarla mediante western blot, nel relativo PVDF il profilo del contenuto proteico non sembra cambiare durante il tempo, e non appare significativamente differente dal controllo negativo costituito da cellule non infettate: questo suggerisce un basso livello di espressione.

Le stesse conclusioni si possono trarre per quanto riguarda il dominio luminale. Pur non possedendo un controllo positivo, il peso molecolare di ~51 KDa, rispetta quello atteso, determinato dalla mancanza della sequenza segnale, della regione transmembrane e di quella citoplasmatica. L'incapacità dell'anticorpo α PEP7h di riconoscere il costrutto lumenale è causato proprio dall'assenza in quest'ultimo della frazione citosolica. La sua espressione, come precedentemente introdotto, funge da controllo per il costrutto intero. Questi risultati iniziali dimostrano che 72 ore dall'infezione sono il tempo ideale per ottenere il più alto livello di enzima per procedere alla purificazione, senza contaminazione da prodotti di degradazione.

3.3.2 Individuazione di un protocollo di purificazione

La purificazione della tirosinasi umana da cellule di melanoma o da altri tessuti pigmentati è stata ottenuta mediante diversi protocolli, tutti caratterizzati da elevate quantità di materiale iniziale¹¹²⁻¹¹⁸.

L'espressione in cellule sf9 non consente di ottenere elevate quantità di materiale iniziale (~0,15g di peso bagnato di cellule in coltura su fiasca da 75 cm³), tuttavia un primo approccio nella purificazione della tirosinasi nella sua forma intera, è stato adatto e ridisegnato da questi protocolli, dove l'enzima viene purificato con una strategia simile a quella adottata per le proteine associate a membrane. La procedura può essere brevemente schematizzata nei seguenti passaggi (Figura 3.23): (i) in ghiaccio o in camera fredda le cellule infettate vengono centrifugate a 6000g per 10 minuti e il surnatante, contenente il medium di crescita, eliminato; (ii) il pellet cellulare viene lavato in un buffer isotonic (NaCl 0,9%) e centrifugato nuovamente a 6000g per 10 minuti; (iii) le cellule

lavate vengono risospese nello stesso buffer e lisate mediante omogeneizzazione tramite politron, in dieci colpi intervallati da pause di un minuto; (iv) la frazione membranosa delle cellule viene così separata dalla frazione citosolica mediante ultracentrifugazione (un'ora a 100000g, 4°C); (v) la frazione membranosa, contenente la tirosinasi, viene risospesa in un buffer a bassa forza ionica (tampone fosfato 10 mM pH7.2), contenente un detergente blando, in modo da estrarre l'enzima dalle membrane e renderlo solubile; (vi) una seconda ultracentrifuga separa le proteine estratte, nel surnatante, dalla frazione lipidica rimanente, nel pellet (un'ora a 100000g, 4°C); (vii) mediante eluizione in cromatografia a scambio anionico (DEAE), le proteine estratte vengono separate da un gradiente di tampone fosfato.

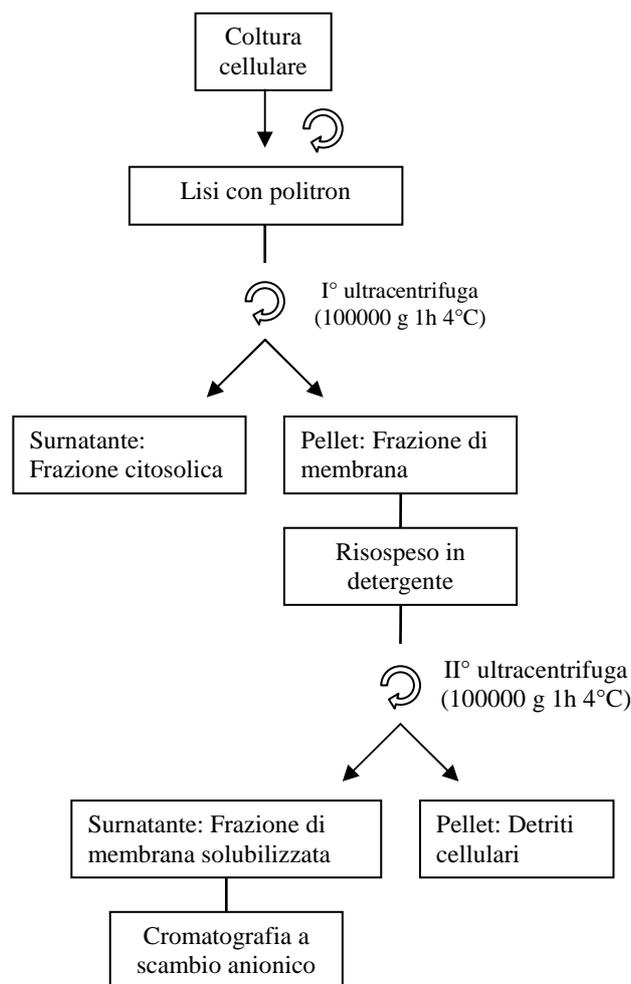


Figura 3.23

Schema del protocollo preliminare di purificazione adottato per l'enzima tirosinasi da cellule sf9.

La messa a punto del protocollo descritto è iniziata dai primi passaggi, in particolare dalla rottura delle cellule e dalla solubilizzazione delle proteine di membrana. Una preliminare purificazione è stata effettuata su cellule sf9 provenienti da quattro flasche, contenenti 20 ml di medium ciascuna a 1×10^6 cell/ml, infettate con 500 μ l di stock di baculovirus per l'espressione della forma intera dell'enzima. Le cellule sono state infettate 72 ore prima e tenute a 28°C al buio. Il risultato della preliminare purificazione è mostrato in figura Figura 3.24, costituito dall'analisi western blot dei campioni conservati ad ogni passaggio. In questo primo caso il detergente utilizzato è stato il Nonidet P40 (NP40) all'1% (v/v), considerato, in letteratura, uno dei migliori detergenti per estrarre la tirosinasi dalla membrana di melanosomi^{113, 119}.

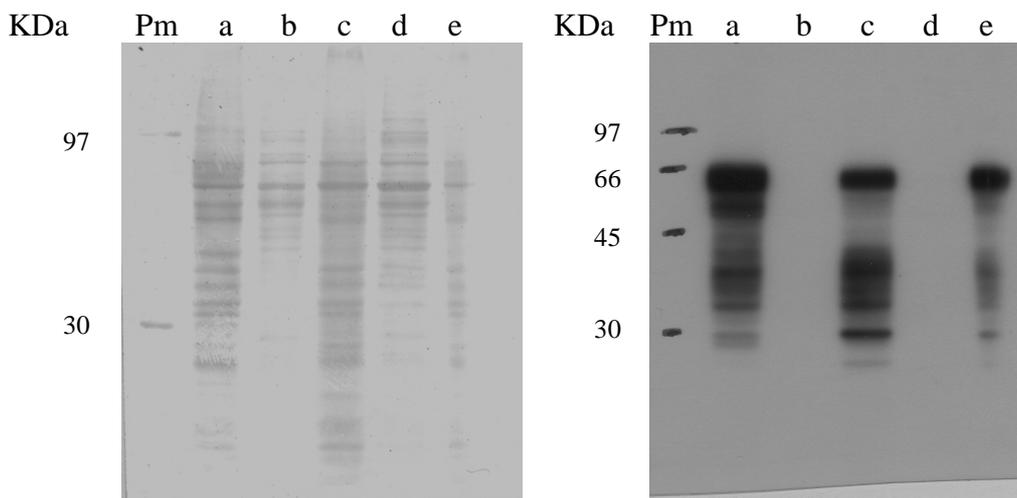


Figura 3.24

Risultato dell'iniziale purificazione della tirosinasi nella sua forma intera. A destra, western blot sviluppato mediante l'anticorpo T311, a sinistra la relativa membrana PVDF. Sono stati analizzati: cellule sf9 dopo il lavaggio (a), surnatante I° ultracentrifugazione (b), risospeso nel buffer di solubilizzazione con NP40 (c), surnatante II° ultracentrifuga (d) e pellet II° ultracentrifuga (e).

L'analisi dei campioni mostra chiaramente che la tirosinasi è, come atteso, fortemente associata alle membrane: essa rimane infatti completamente nella frazione membranosa dopo la rottura delle cellule. Inoltre i primi step della purificazione consentono di eliminare in maniera soddisfacente la frazione di proteine solubili non associate alle membrane. Tuttavia la successiva solubilizzazione delle membrane con il detergente NP40 1% non porta l'enzima nella frazione solubile ma rimane ancora associato alla frazione lipidica. Questo

detergente, dunque, alle concentrazioni utilizzate non sembra essere sufficientemente forte per estrarre l'enzima.

Questi risultati iniziali suggeriscono di sviluppare il protocollo di purificazione testando nuovi detergenti, al fine di trovare un appropriato buffer di solubilizzazione da utilizzare per risospendere il pellet di membrane dopo la prima ultracentrifugazione. Sono quindi stati individuati una serie di detergenti con differenti proprietà, da utilizzare per uno *screening* a diverse concentrazioni, al fine di identificare il buffer di solubilizzazione appropriato.

I detergenti oggetto di *screening* e le relative concentrazioni utilizzate sono stati: il Nonidet P40 al 2 e al 5%, il Triton X-100 e il Tween 20 entrambi all'1 e al 5%, l'*n*-Dodecyl- β -D-maltoside e la L- α -Phosphatidylcholine sia all'1 che al 3% e infine l'SDS all'1% come controllo. Il protocollo per la preparazione delle membrane è stato quindi ripetuto come nell'esperimento preliminare. In seguito, il pellet di membrane ottenuto dalla prima ultracentrifugazione è stato risospeso in diversi buffer di estrazione, costituito da tampone fosfato 10 mM pH7.2 con i diversi detergenti alle concentrazioni indicate. Successivamente la frazione membranosa rimanente è stata separata mediante la seconda ultracentrifugazione.

Al fine di individuare non solo il miglior detergente per solubilizzare la tirosinasi, ma anche quello più appropriato per la successiva cromatografia a scambio anionico, il surnatante ottenuto è stata mescolato in "in batch" con della resina DEAE sephadex precedentemente equilibrata con lo stesso tampone di solubilizzazione. Quindi le proteine sono state eluite in unico step, sempre "in batch", aggiungendo una soluzione 0.5 M di buffer fosfato pH 7.2. Nei principali passaggi sono stati prelevati dei campioni per l'analisi mediante western blot. In Figura 3.25 sono riportati i risultati dello *screening*.

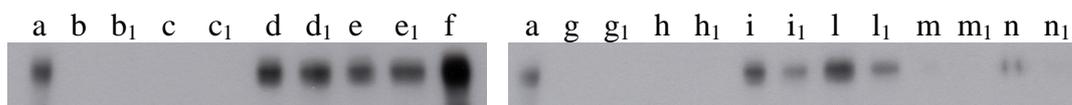


Figura 3.25

Analisi western blot dello *screening* dei diversi detergenti, sviluppata mediante l'anticorpo T311. Campioni caricati: pellet I° ultracentrifuga come controllo positivo (a), surnatante II° ultracentrifuga e relativa eluizione in "batch" dalla resina DEAE utilizzando L- α -Phosphatidylcholine all'1% (b e b₁), L- α -Phosphatidylcholine al 3% (c e c₁), *n*-Dodecyl- β -D-maltoside all'1% (d e d₁), *n*-Dodecyl- β -D-maltoside al 3% (e ed e₁), SDS all'1% (f), NP40 al 2% (g e g₁), NP40 al 5% (h e h₁), Triton X-100 all'1% (i e i₁), Triton X-100 al 5% (l e l₁), Tween 20 all'1% (m e m₁) ed infine Tween 20 al 5% (n e n₁).

Risulta chiaro che alcuni detergenti come l'L- α -Phosphatidylcholine, il Nonidet P40 e il Tween 20, a diverse concentrazioni, non solubilizzano, o molto debolmente l'enzima, diversamente da quanto riportato in letteratura¹¹⁹. Questa differenza può essere dovuta dal diverso tipo di materiale di partenza o dalla quantità. Tuttavia gli altri detergenti, come l'*n*-Dodecyl- β -D-maltoside, il Triton X-100, a tutte le concentrazioni utilizzate, sembrano, con diversa efficienza, solubilizzare l'enzima e non precludono l'eluizione dalla resina DEAE. L'SDS all'1% viene utilizzato come controllo positivo nella fase di solubilizzazione, rappresentando il più forte detergente a nostra disposizione; tuttavia non si è proceduto in questo caso al successivo mescolamento con la resina DEAE. Il Triton X-100 è probabilmente il più utilizzato detergente per solubilizzare la tirosinasi da cellule di melanoma^{114, 118}. È stato deciso, dunque, di optare per questo detergente al fine di mettere appunto i successivi passaggi nel protocollo di purificazione.

Una coltura di 300 ml di cellule sf9 a 1×10^6 cell/ml, cresciute in sospensione in un apposito incubatore da 1l (vedi paragrafo 3.3.4.3), in agitazione a 28°C, è stato infettato con 7.5 ml di stock virale. Assieme al virus, una aggiunta di CuSO₄ per una concentrazione finale di 8 μ M, è stata effettuata supponendo che possa contribuire al rifornimento di atomi di rame e quindi aiutare il *folding* e l'espressione dell'enzima (vedi paragrafo 3.3.4.1). Esperimenti preliminari hanno evidenziato la tossicità di questo composto, per le cellule sf9, a concentrazioni superiori. Dopo tre giorni, una prova di purificazione è stata effettuata partendo da circa 1.25g di cellule ottenute (peso umido). La frazione membranosa è stata risospesa in 20 ml di tampone fosfato 20 mM pH 7.2, con Triton X-100 all'1% (v/v), la più bassa concentrazione che efficacemente solubilizza l'enzima, come precedentemente dimostrato.

Il processo di solubilizzazione è stato effettuato a 4°C per un'ora mediante blando mescolamento. Di seguito, la seconda ultracentrifugazione ha consentito di separare le membrane, nel pellet, dalle proteine solubilizzate, nel surnatante. A quest'ultima frazione sono stati aggiunti 5 ml di resina DEAE e la sospensione è stata mescolata overnight "in batch" a 4°C. Successivamente la resina è stata caricata in colonna e lavata utilizzando il buffer di solubilizzazione. Le proteine

sono state eluite in un unico step con l'aggiunta di buffer fosfato 200 mM pH 7.2, Triton X-100 1%, raccogliendo frazioni da 2 ml. Le frazioni sono state successivamente testate per osservare se e quali possedessero attività tirosinasi, aggiungendo alcuni microlitri di queste a delle gocce di L-DOPA 20 mM in tampone fosfato 100 mM. Infatti, se l'attività fosse presente, ci si attende la formazione di dopacromo (paragrafo 3.1.2.2) che, a differenza della L-DOPA incoloro, possiede un caratteristico colore arancio. Dopo alcuni minuti, il cambiamento di colore delle gocce indicava quali frazioni contenessero l'attività tirosinasi. Durante tutta la purificazione sono stati conservati dei campioni al fine di osservarne il relativo contenuto proteico, il livello di purificazione della tirosinasi ed eventualmente identificare la banda corrispondente mediante analisi SDS-PAGE. Il risultato di tale analisi è mostrato in Figura 3.26. In questo caso, inoltre, il contenuto proteico delle cellule sf9, dopo 3 giorni dall'infezione, è stato confrontato con quello di cellule non infettate; il fatto che non appaia alcuna banda significativamente intensa a ~66 KDa nel campione con le cellule infettate, rispetto a quelle non infettate, indica un basso livello di espressione della tirosinasi, confermando i dati precedentemente ottenuti.

I passaggi successivi dimostrano l'efficacia del Triton X-100 nel solubilizzare la tirosinasi dalle membrane, insieme ad una serie di altre proteine che la cromatografia a scambio anionico consente di eliminare solo parzialmente. Tra le frazioni raccolte, solo quelle contenenti attività tirosinasi sono state analizzate mediante SDS-PAGE sviluppato mediante Coomassie (Figura 3.27) o mediante la più sensibile colorazione ad argento e relativa analisi western blot. Tuttavia, a causa dell'elevato numero di proteine ancora presenti e al basso livello di espressione dell'enzima, non è possibile individuare con certezza la banda corrispondente alla tirosinasi, certamente presente come conferma il test di attività e l'analisi *western blot*.

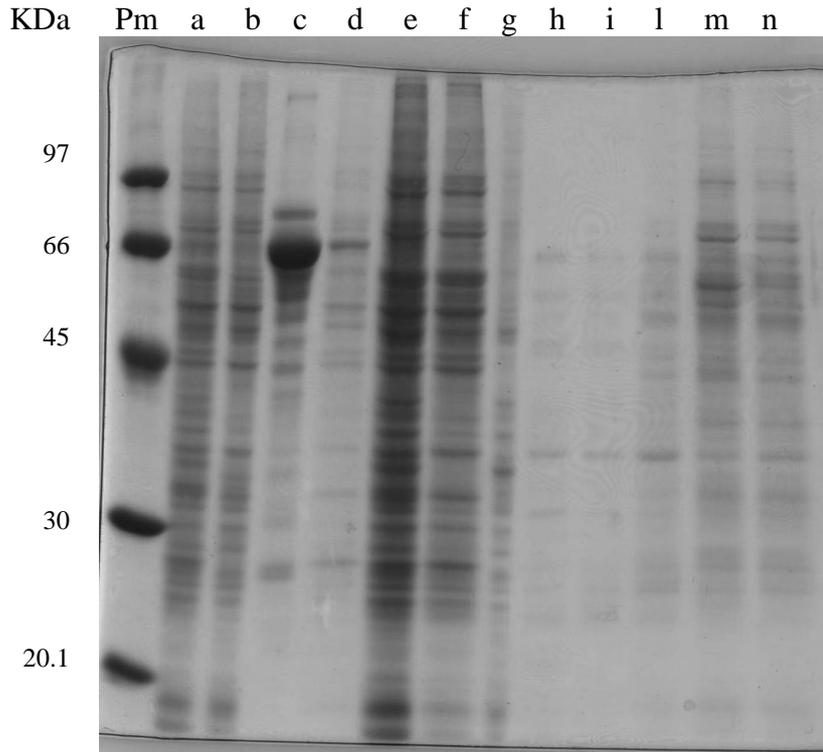
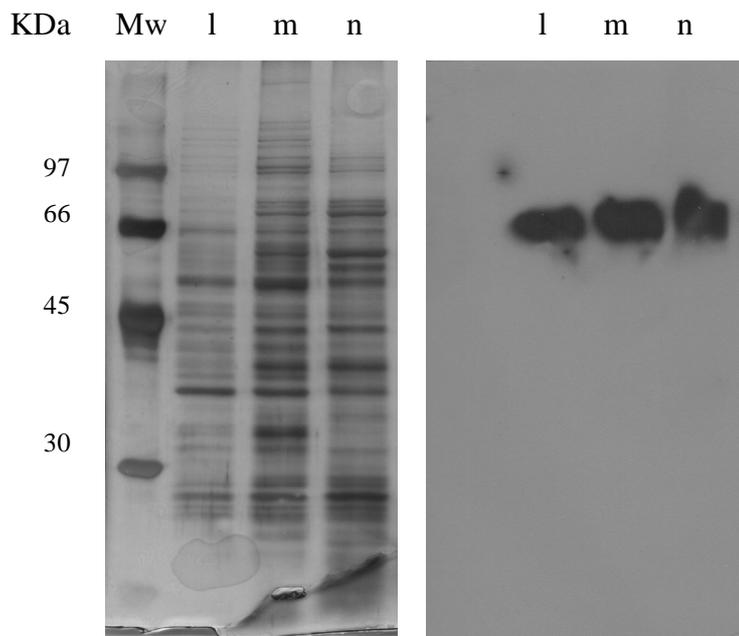


Figura 3.26

Analisi SDS-PAGE dei principali passaggi nella purificazione preliminare della tirosinasi. Sono stati caricati i seguenti campioni: pesi molecolari (Pm), cellule sf9 intere dopo tre giorni di infezione (a), cellule non infettate come controllo negative (b), medium di crescita (c), surnatante prima ultracentrifugazione (d), pellet risospeso nel buffer di solubilizzazione (Triton X-100 1%)(d), surnatante seconda ultracentrifugazione (g), flow through DEAE (h), lavaggio colonna (i), prima (l), seconda (m) e terza (n) frazione eluita con attività.

Figura 3.27

A sinistra, analisi SDS-PAGE colorato ad argento dei campioni eluiti con attività tirosinasi. A destra, relativa analisi western blot.



Ottenute quindi delle frazioni contenenti la tirosinasi in forma solubile e parzialmente purificata, è stato provato un test di attività, non ancora ottimizzato, al fine di quantificare l'effettiva attività dell'enzima.

Il test consiste nella misurazione della velocità di formazione del dopacromo a 475 nm, mediante spettrofotometro, dopo aver aggiunto 20µl della frazione contenente l'enzima a una soluzione di L-DOPA (in tampone fosfato 100 mM pH7.2) ad una concentrazione finale di 4 mM e un volume di 0.1 ml. Si è andata quindi a valutare l'attività difenolasica della tirosinasi. Le frazioni 1, 2 e 3 risultano positive al test, con una velocità di ossidazione dell'L-DOPA comparabile tra loro (0,044 U/ml), e significativamente superiore alla velocità di autoossidazione (Figura 3.28a). La stima complessiva di unità ottenute è di ~0,25 U distribuita nelle tre frazioni da due ml.

Al fine di confermare che l'attività catalitica fosse effettivamente associabile all'enzima tirosinasi espressa in forma ricombinante, e non da una putativa ossidasi co-purificata dalle cellule sf9, è stato aggiunto alla soluzione di L-DOPA un potente inibitore noto della tirosinasi, l'acido Kojico. La velocità di catalisi confrontata con quella priva di inibitore (Figura 3.28b) ha mostrato un deciso decremento della velocità di catalisi caratterizza la trasformazione in presenza di inibitore.

Inoltre è stato messo a punto un test per osservare anche l'attività monofenolasica, tipica solo della tirosinasi, utilizzando il reagente MBTH che stabilizza e incrementa l'assorbanza e quindi la possibilità di osservare la formazione della specie chinonica. È noto, infatti, che l'attività monofenolasica della tirosinasi è molto ridotta rispetto a quella difenolasica, soprattutto per quanto concerne la forma umana, dove ci si aspetta un rapporto di velocità di trasformazione della tirosina di qualche centinaia di volte inferiore rispetto alla DOPA^{120, 121}. Il campione analizzato consiste in una soluzione di volume finale 0,1 ml, 3 mM di tirosina (e di 5 mM di L-DOPA per il confronto) in tampone 100 mM pH7.2, 4% N,N dimethylformaldeide e MBTH 6.2 mM, e 20µl di campione. Anche in questo caso (Figura 3.28c) il test conferma la duplice attività catalitica presente nelle frazioni isolate.

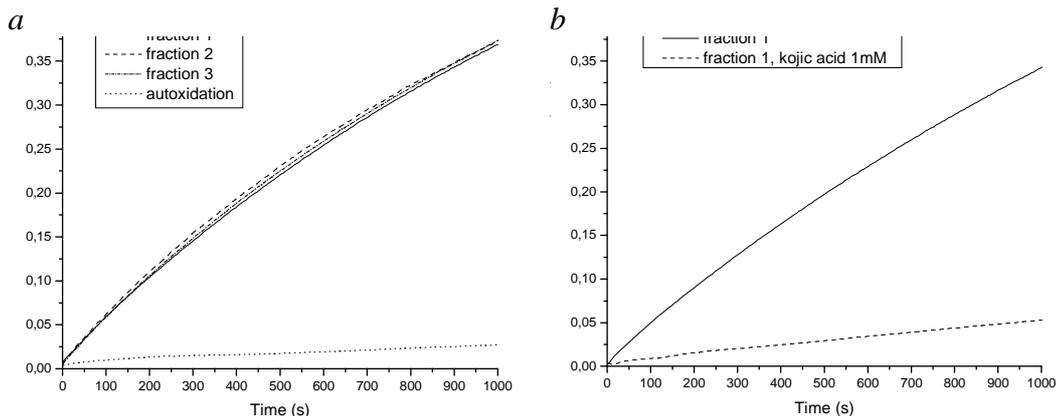
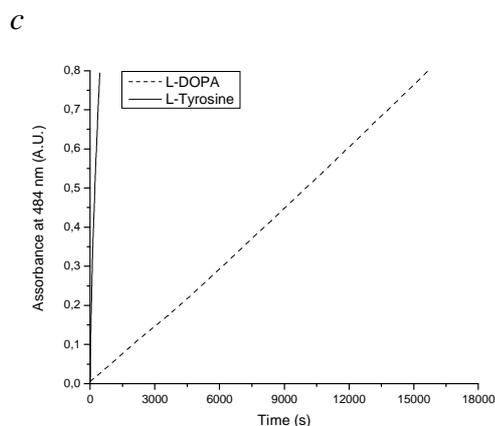


Figura 3.28

Diversi tests effettuati al fine di osservare l'attività tirosinasi posseduta dalle frazioni eluite: (a) assorbimento a 457 nm in funzione del tempo di una soluzione di L-DOPA dopo l'aggiunta delle frazioni eluite 1, 2 e 3 e (b) il confronto con l'aggiunta di acido Kojico 1mM; (c) assorbanza a 484 nm in funzione del tempo di una soluzione di L-DOPA confrontata con quella di L-tirosine, dopo l'aggiunta delle rispettivamente delle frazioni 1 e 3. Per i dettagli fare riferimento al testo.



3.3.3 Controllo negativo

Sebbene le precedenti prove suggeriscano che l'attività osservata sia determinata dalla tirosinasi espressa in forma ricombinante nelle cellule sf9, non è escluso che l'enzima possa essere espresso in forma inattiva, osservato mediante riconoscimento anticorpale, mentre l'attività catecolasica e cresolasica osservata derivi da una putativa tirosinasi endogena dalle cellule sf9, co-purificata.

Per confutare anche questa improbabile coincidenza è stato effettuata una purificazione partendo da cellule non infettate con baculovirus come controllo negativo. Una coltura di 100ml di cellule sf9 cresciute in sospensione, ad una concentrazione 1×10^6 cell/ml, a cui è stata aggiunto CuSO_4 ad una concentrazione finale di $8\mu\text{M}$, è stata lasciata a 28°C al buio per tre giorni, cioè nelle stesse condizioni della precedente preparazione infettata con il virus.

Successivamente le cellule sono state raccolte per centrifugazione, lavate dal medium di crescita, lisate, private delle proteine citosoliche mentre le proteine associate alle membrane sono state estratte utilizzando il tampone di solubilizzazione (Triton X-100 1%, in tampone fosfato 10 mM pH7.2), mantenendo quindi gli stessi passaggi del protocollo precedentemente descritto. Il contenuto proteico totale della cellule non infettate è stato inoltre confrontato con quelle delle cellule infettate (Figura 3.26) e non si evidenziano significative differenze nel pattern di espressione delle cellule.

L'attività tirosinasi, se presente, dovrebbe essere osservabile anche prima della cromatografia. Per questo motivo non si è proceduto oltre nel protocollo e la frazione contenente le proteine di membrana solubilizzata è stata utilizzata per l'analisi dell'attività difenolasica utilizzando L-DOPA come substrato e MBTH per aumentare la sensibilità della misurazione: non è stata però osservata alcuna significativa attività difenolasica significativamente diversa dall'autossidazione.

Infine, si è voluto escludere anche la possibilità che una polifenoloossidasi ossidasi possa essere espressa durante il ciclo virale di baculovirus e che l'attività osservata nelle cellule infette sia causata da questa, perciò non presente nelle cellule non infettate. Per questo motivo un secondo controllo negativo è stato preparato a partire da cellule sf9 infettate con baculovirus, ingegnerizzato per consentire l'espressione ricombinante del dominio luminale della tirosinasi. Come precedentemente discusso, questo costrutto, inizialmente ideato come controllo negativo per l'espressione della tirosinasi in forma intera, è sicuramente caratterizzato da una forma enzimatica inattiva perchè priva di regione transmembrana e quindi non glicosilata. Il resto delle proteine virali invece dovrebbero essere espresse allo stesso modo del costrutto per l'espressione della tirosinasi in forma attiva.

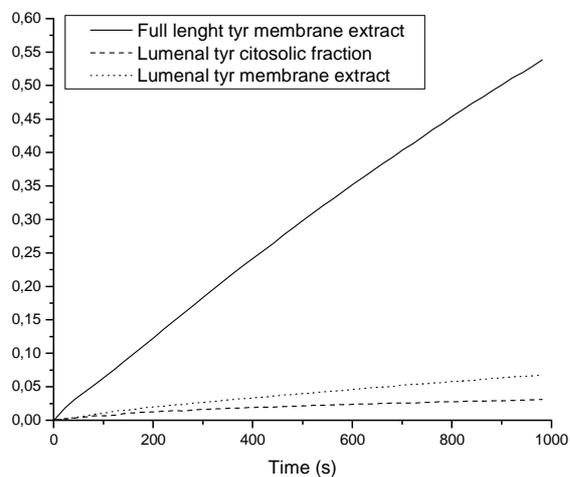
Due flasche da 75 cm² contenenti ciascuna 10 ml di medium di crescita e cellule sf9 (1×10^6 cell/ml, CuSO₄ 8µM), sono state parallelamente infettate con le opportune quantità di stock di baculovirus, rispettivamente per l'espressione della forma intera e la forma solubile. Dopo tre giorni, le cellule sono state raccolte e trattate come da protocollo, escludendo ancora la cromatografia. Nel caso della preparazione da cellule esprimenti il dominio luminale della tirosinasi, sia il surnatante della prima ultracentrifuga che della seconda, sono stati oggetto di

controllo mediante test di attività su spettrofotometro. I risultati ottenuti sono stati confrontati con l'attività ottenuta nella frazione di proteine solubilizzata a partire da cellule infettate con baculovirus per l'espressione della tirosinasi in forma intera (Figura 3.29).

I livelli di ossidazione della L-DOPA in presenza di frazioni ottenute a partire da cellule infettate con baculovirus, per l'espressione dell'enzima in forma luminale, sono equiparabili a quelli dell'autossidazione, mentre l'estratto di membrana proveniente da cellule esprimenti la tirosinasi intera, mantiene la significativa attività precedentemente osservata.

Se questo secondo controllo ci permette di escludere definitivamente la presenza di altre polifenolossidasi co-purificate, ci permette anche di confermare l'importanza della glicosilazione e della presenza della regione transmembrana nel folding e quindi nell'ottenimento della tirosinasi umana in forma attiva. Infatti la forma solubile, indipendentemente dalla sua localizzazione, che non è stata determinata (nel citosol, quindi nel surnatante della I° centrifuga) o adesa alle membrane (quindi nel surnatante della II° centrifuga), appare completamente inattiva.

Figura 3.29
Confronto nella velocità di ossidazione dell'L-DOPA, utilizzando di frazioni ottenute partendo da cellule infettate con baculovirus, per l'espressione della forma solubile e intera.



Questa prima parte di esperimenti ha consentito dunque di confermare che il sistema ricombinante utilizzato è ideale per l'espressione dell'enzima in forma attiva. Tuttavia si evince chiaramente che il livello di espressione è molto basso e sarà quindi necessario effettuare una serie di miglioramenti, sia nell'espressione che nella purificazione, per ottenere una sufficiente quantità di proteina isolata da studiare.

3.3.4 Miglioramento dell'espressione della tirosinasi

Come le purificazioni preliminari hanno dimostrato, il basso livello di tirosinasi espresso, mediante infezione delle cellule sf9 con baculovirus ingegnerizzato, rappresenta uno step limitante nel tentativo di standardizzare un protocollo per la produzione della tirosinasi umana. Per superare questo problema, alcune variazioni nelle condizioni di crescita e di infezione delle cellule sono state apportate al protocollo iniziale al fine di ottenere una maggiore espressione dell'enzima.

3.3.4.1 Aggiunta di rame

Una coppia di ioni rame caratterizza, come già descritto, il sito catalitico della tirosinasi, coordinato ciascuno da tre istidine con la tipica conformazione di tutte le proteine a rame di tipo III. Nei mammiferi, il loro inserimento nel corso della maturazione della tirosinasi, avviene nel trans-Golgi per merito di specifiche proteine carrier. Analogamente nelle tirosinasi batteriche, come quella di *S.castaneoglobusporus* la proteina ORF378 aiuta questo processo⁶. Allo stesso modo, dal momento che viene ottenuta una tirosinasi in forma attiva, si suppone che il caricamento del rame avvenga durante la maturazione della tirosinasi umana nelle cellule sf9, anche se il sistema di trasporto del rame in queste cellule non è noto; tuttavia l'efficienza di questo sistema potrebbe non essere sufficiente per supportare la richiesta del metallo durante la sintesi.

Per questo motivo è stato deciso di aggiungere al medium di crescita una fonte di ioni rame, al momento dell'infezione, sottoforma di sale Cu_2SO_4 . Esperimenti preliminari suggerivano di non superare la concentrazione di $8\mu\text{M}$ Cu_2SO_4 per non interferire con la crescita cellulare delle sf9 (a $20\mu\text{M}$ si sono osservati alcuni effetti di tossicità, in particolare sulla velocità di duplicazione). Le preparazioni precedenti sono state condotte utilizzando cellule infettate in queste condizioni.

Tuttavia l'infezione mediante baculovirus rappresenta certamente un trauma metabolico per le cellule sf9, trasformandosi da un complesso sistema vitale ad un "macchinario" per la produzione di virus, semplificato e di vita breve: se da un lato, in queste condizioni, un incremento di Cu_2SO_4 nel medium potrebbe

costituire un ostacolo nella produzione di proteine, dall'altro potrebbe sopperire efficacemente la mancanza dello ione nella sintesi dell'enzima.

Per questo motivo è stato effettuato un tentativo di incrementare la disponibilità di rame infettando parallelamente cellule sf9 adese, in fiasche da 75 cm², in un medium di crescita contenente concentrazioni crescenti di Cu₂SO₄. Dopo tre giorni le rispettive cellule sono state raccolte e le proteine di membrana estratte mediante il protocollo precedentemente descritto. In seguito l'attività enzimatica delle frazioni ottenute da ciascuna fiasca è stata stimata (Tabella 3.1), così come è stata stimata qualitativamente il livello di espressione della tirosinasi, mediante analisi western blot (Figura 3.30).

	A			B			C
Concentrazione μM di Cu ₂ SO ₄ nel medium	0	10	20	100	200	1000	2000
Attività surnatante II ultracentrifuga (U/ml)	0,0098	0,02	0,0225	0,0765	0,093	0,0955	0,0595

Tabella 3.1

Attività media ottenuta dalle frazioni di membrana solubilizzata ottenuta a partire da cellule sf9 infettate in differenti concentrazioni di rame. L'immagine sovrastante è costituito dal relativo pellet cellulare. Il contenuto proteico dei campioni A, B e C è stato analizzato e riportato in Figura 3.30.

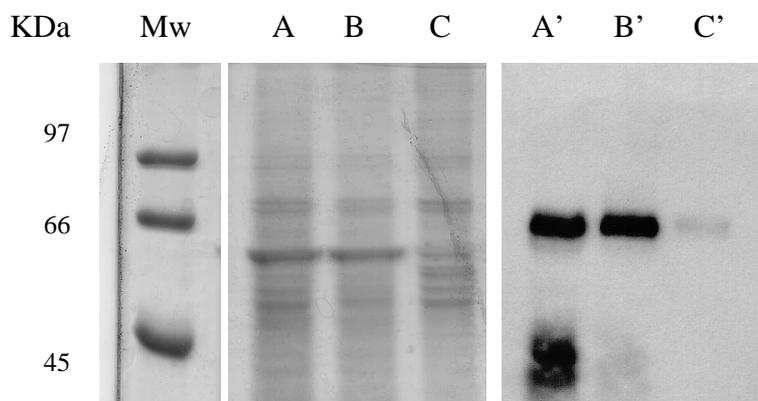


Figura 3.30
A sinistra, analisi SDS-PAGE dell'intero contenuto proteico di cellule sf9 infettate in presenza di 0 μM (A), 200 μM (B) e 2000 μM (C) Cu₂SO₄ nel medium di crescita. A destra, il relativo rilevamento anticorpale (A', B', C').

Durante la fase di raccolta e lavaggio delle relative frazioni cellulari è stato osservato un imbrunimento delle cellule in funzione del contenuto di rame presente (Tabella 3.1), escludendo la concentrazione più elevata utilizzata, così come la relativa attività rilevata, dopo solubilizzazione delle proteine di membrana.

È già stata ampiamente discussa la correlazione tra la tirosinasi e la formazione delle melanine (paragrafo 3.1.1). Perciò non sorprende che sia stata trovata l'attività tirosinasi più alta nelle cellule più scure, cioè probabilmente quelle a maggior contenuto di melanina. Tuttavia questa corrispondenza non è stata osservata quando, mediante western blot, si è andati a rilevare qualitativamente il livello di espressione dell'enzima: infatti, se da un lato l'incremento della concentrazione di rame determina una riduzione nella formazione di sub-prodotti dell'enzima, dall'altro sembra ridursi anche la produzione totale di proteina alle concentrazioni più elevate (vedi campione C in Figura 3.30).

Presi insieme, questi dati, suggeriscono la mancanza di una corrispondenza diretta tra il livello di espressione dell'enzima e il livello di attività rilevato. Questo si giustifica con il fatto che della proteina non foldata e quindi inattiva, può essere rilevata mediante riconoscimento anticorpale ma non contribuisce ad incrementare le unità di attività del campione analizzato. Il duplice insegnamento ottenuto da questo esperimento consiste nel fatto che (i) il folding della tirosinasi aumenta con l'aumentare della concentrazione di Cu_2SO_4 nel medium, mentre (ii) il suo livello di espressione diminuisce, probabilmente a causa di un'eccessiva tossicità determinata dal sale e/o dalla melanina prodotta all'interno del sistema cellulare. Un corretto bilanciamento nell'aggiunta di rame può quindi preservare l'enzima da un inappropriato *fold*ing e non risultare eccessivamente tossico da consentire un significativo livello di espressione dell'enzima. Una concentrazione 0.2 mM di Cu_2SO_4 nel medium, è stata considerata la più appropriata e stata utilizzata nelle preparazioni successive.

3.3.4.2 Infezione con baculovirus

Come precedentemente descritto il sistema Bac to Bac (Invitrogen) prevede l'infezione della coltura cellulare con un certo numero di PFU. Il valore di PFU

per millilitro di stock virale può essere stimato mediante una procedura relativamente complessa e costosa. Questa è stata sostituita con una valutazione della capacità infettiva dello stock, meno precisa ma più rapida ed economica, che consiste in una valutazione morfologica e della velocità di crescita delle cellule infettate (vedi paragrafo 3.3.1.4).

Non escludendo che questo sistema potesse rappresentare una delle cause del basso livello di espressione dell'enzima la procedura è stata modificata in tal senso: tre fiasche di cellule sf9 sono state infettate con diluizioni crescenti di stock virale da analizzare (da 1:10 a 1:100). Dopo tre giorni le cellule sono state raccolte e, estraendo la relativa componente proteica associata alle membrane, una valutazione delle U/ml è stata ottenuta mediante test di attività. La diluizione che dava l'attività più alta veniva utilizzata per la successiva infezione. In base alla virulenza dello stock utilizzato, sono stati ottenuti diversi valori di diluizioni; in alcuni casi, la diluizione più spinta dava la maggiore attività. Non si esclude, dunque, che una eccessiva quantità di virus utilizzato, determini una precoce lisi cellulare e un basso livello di proteina espressa.

3.3.4.3 *Scale up in fermentatore*

Per aumentare la quantità totale di materiale iniziale per la purificazione dell'enzima, è stato considerato un aumento dei volumi di cellule sf9 in coltura. Dalla fiasca al fermentatore la concentrazione di cellule, di rame e la diluizione virale utilizzata è stata mantenuta proporzionalmente. Tuttavia alcune differenze appaiono inevitabilmente tra i due sistemi di coltura utilizzati. Nel primo le cellule crescono aderenti alla fiasca e non sono meccanicamente stressate dalle pale meccaniche che agitano il fermentatore. In più, il rapporto tra aria e medium appare completamente diverso tra la fiasca e il fermentatore, così come la superficie di scambio tra le due fasi, molto favorevole nella prima modalità. Probabilmente per questo motivo, quando l'infezione veniva effettuata nel fermentatore, è stato spesso ottenuto un basso valore di attività tirosinasi per volume della coltura utilizzato, rispetto a quelle ottenute dalle cellule cresciute in fiasca. Per ridurre questa differenza si è optato per aumentare il rapporto tra aria e medium nel fermentatore, non superando 1 litro di coltura su 2 litri di volume totale, e preferendo un rapporto 3:1.

3.3.4.4 Condizioni di conservazione dell'enzima

Per disporre sempre di campioni contenenti tirosinasi in forma attiva sono state messe a punto le condizioni di conservazione dell'enzima aggiungendo diverse concentrazioni di glicerolo alla frazione con attività enzimatica, e conservando l'enzima a diverse temperature (-20°C o -80°C). L'enzima stoccato è stato successivamente utilizzato in test di attività, al fine di valutare l'attività residua della frazione e confrontarla con quella misurata prima dello stoccaggio. Lo studio condotto ha individuato le migliori condizioni di conservazione nello stoccaggio in 18% (v/v) glicerolo a -20°C, previo congelamento in azoto liquido.

3.3.5 Miglioramento della purificazione

Nonostante il Triton X-100 si sia rivelato utilizzabile nella solubilizzazione della tirosinasi, alcuni effetti collaterali dovuti al suo utilizzo, si sono osservati durante la purificazione: il suo elevato assorbimento a 280 nm (lunghezza d'onda spesso utilizzata quantificare le proteine o per valutare profili cromatografici durante la loro purificazione) e l'interazione con il gel di acrilammide, che determina un fenomeno di *smearing* delle bande proteiche a allargamento delle corsie di corsa durante l'analisi SDS-PAGE.

Per superare questi inconvenienti, un buffer di solubilizzazione contenente *n*-dodecyl- β -D-maltoside 1% (v/v), un opportuno detergente precedentemente identificato (vedi paragrafo 3.3.2), è stato sostituito al Triton X-100 1% nel protocollo di purificazione. Il protocollo di purificazione modificato è stato testato su materiale ottenuto da 450 ml di coltura di cellule sf9, infettate tre giorni prima con una diluizione 1:20 di stock virale e in presenza di 200 μ M Cu₂SO₄. Dopo il lavaggio con NaCl 0.9%, le cellule sono state risospese su 26ml di tampone fosfato 10 mM pH7.2 e lisate mediante Politron. Sono stati inoltre aggiunte RNasi e DNasi in quantità opportune al fine di prevenire la formazioni di aggregati filamentosi di origine nucleotidica che in cromatografia potrebbero costituire un problema se non eliminati. La prima ultracentrifugazione è stata condotta a 100000g x 30 minuti a 4°C, per separare le membrane dalla frazione citosolica. Successivamente il pellet membranoso è stato risospeso in 22 ml di tampone fosfato 10 mM, pH 7.2, *n*-Dodecyl- β -D-maltoside 1% e mescolato

mediante *glass homogeniser* per 10 minuti in ghiaccio. La seconda ultracentrifugazione, 100000g x 30 minuti a 4°C, ha permesso di separare le proteine solubilizzate dalla rimanente frazione membranosa. Una resina DEAE precedentemente equilibrata è stata poi aggiunta al surnatante e mescolata in batch. Il tempo di mescolamento e la quantità di resina aggiunta è stata determinata mediante successivi test di attività sulla frazione acquosa della sospensione, dopo aver sedimentato momentaneamente la resina: se dell'attività residua fosse ancora osservabile, altra resina veniva aggiunta, dal momento che non tutta la tirosinasi solubilizzata si era ancora legata alla resina. Dopodichè la resina è stata caricata in colonna, lavata usando il tampone di solubilizzazione con ridotto contenuto di detergente (0.1% *n*-Dodecyl- β -D-maltoside), e le proteine eluite in un unico step usando tampone fosfato 200 mM, pH 7.2, 0.1% *n*-Dodecyl- β -D-maltoside e raccolte in frazioni da 1 ml. In tutti gli step il contenuto proteico è stato analizzato mediante SDS-PAGE come mostrato in Figura 3.31.

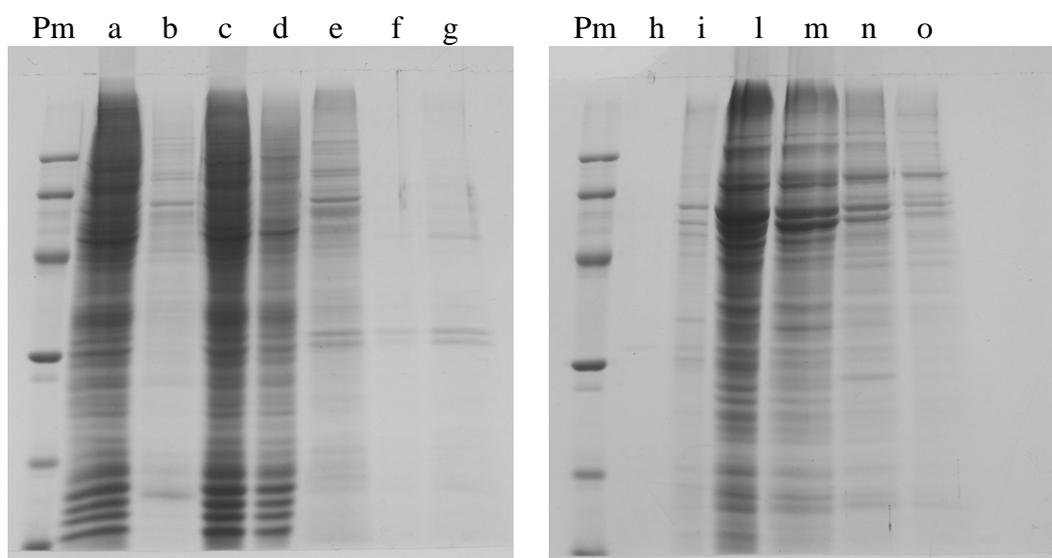


Figura 3.31

Analisi SDS-PAGE dei campioni ottenuti durante la purificazione con il protocollo modificato. Sono stati caricati: pesi molecolari (Pm), estratto grezzo (a), surnatante I° ultracentrifuga (b), pellet I° ultracentrifuga (c), surnatante II° ultracentrifuga (d), pellet seconda ultracentrifuga (e), flow trough (f), lavaggio (g), 2° (h), 3°(i), 4° (l), 5° (m), 6° (n) e 7° (o) frazione eluita.

La frazione di membrana solubilizzata e le frazioni eluite 4, 5 e 6 che possedevano attività enzimatica sono stata sottoposte a test di attività per stimare le unità totali e la resa della purificazione, come riassunto in Tabella 3.2.

Campione	Volume (ml)	U/ml	Unità totali	Resa
Membrane solubilizzate	22	8,72E-04	1,92E-02	100%
Frazione 4	1	1,79E-03	1,79E-03	75%
Frazione 5	1	5,45E-03	5,45E-03	
Frazione 6	1	7,24E-03	7,24E-03	

Tabella 3.2

Schema riassuntivo della purificazione, con la resa stimata in funzione alle unità di enzima inizialmente ottenute.

Come nel primo approccio di purificazione, anche in questo caso la purificazione non consente di evidenziare chiaramente la banda corrispondente all'enzima tirosinasi, a circa 66 KDa, seppure l'uso della *n*-Dodecyl- β -D-maltoside consenta una migliore risoluzione della bande in SDS-PAGE. Inoltre, se l'effetto collaterale del Triton X-100 è stato superato mediante la sua sostituzione con *n*-Dodecyl- β -D-maltoside, con quest'ultimo sono stati ottenuti un numero di unità totali inferiore, a parità di quantità di materiale di partenza utilizzato. Per questo motivo, e per l'eccessivo costo, il suo utilizzo è stato abbandonato.

3.3.5.1 Digestione con proteinasi K

Diversi lavori in letteratura hanno dimostrato la capacità della tirosinasi umana di resistere a trattamenti con proteasi ed è stato anche speculato che possa esistere una proteasi specifica, nei melanosomi, che possa tagliare la tirosinasi dalla membrana e consentirli di agire liberamente nel lume di questi organelli cellulari. La proteinasi K e la tripsina sono state utilizzate in alcuni lavori per ridurre il numero totale di proteine degli estratti solubili dei melanosomi^{116, 117, 122}. Se degli studi preliminari ci hanno fatto escludere la tripsina, a causa dell'elevata concentrazione da utilizzare per ottenere una significativa riduzione del contenuto proteico estratto dalle cellule infettate, la proteinasi K si è rivelata invece un ottimo strumento, come i risultati seguenti dimostrano.

Sono state testate diverse concentrazioni di proteinasi K (da 0.5 a 50 U/ml), tempi di trattamento (da 1 ora a *overnight*) e temperature (4°C e temperatura ambiente) sul campione contenente la frazione di proteine di membrana solubilizzate mediante Triton 100-X. Si è andati poi ad analizzare mediante SDS-PAGE la variazione in termini di contenuto proteico, e mediante test di attività,

l'attività residua della frazione, trovando le migliori condizioni per diminuire il numero complessivo di proteine: un buon compromesso è rappresentato dalla digestione per un'ora con 5 U/ml di proteasi a temperatura ambiente (in particolare 50 U/ml a 4°C oppure 5 U/ml a 4°C *overnight*).

Un nuovo protocollo è stato quindi progettato e testato, aggiungendo una fase di digestione con 5 U/ml di proteinasi K *overnight* a 4°C, alla frazione solubilizzata utilizzando Triton 100-X 3%, prima di effettuare la cromatografia a scambio anionico, questa volta eseguita mediante un gradiente di tampone fosfato da 10 a 100 mM. Le frazioni contenenti attività sono state unite e concentrate mediante Amicon® e Vivaspin 500®. In Tabella 3.3 e nella Figura 3.32 sono schematizzati i principali risultati ottenuti.

Campione	Attività (U/ml)	Volume (ml)	Unità totali (U)	Resa (%)
Surnatante II ultracentrifuga	0,01622	10	0,1622	100
Digerito <i>overnight</i> a 4°C con 5U/ml	0,00967	10	0,0967	59,6
Frazione III della cromatografia	0,00389	10	0,0511	31,49
Frazione IV della cromatografia	0,00187	6,5		
Frazione III concentrata	0,0277	0,225	0,0091	5,615
Frazione IV concentrata	0,0115	0,25		

Tabella 3.3

Tabella purificativa e resa relativa per ogni passaggio, riferita alle unità totali del campione.

I risultati ottenuti mostrano alcuni aspetti interessanti del protocollo adottato. In primo luogo il trattamento con la proteinasi K riduce drasticamente il numero di proteine individuabili mediante SDS-PAGE, lasciando solo alcune proteine ancora visibili (compresa la stessa proteinasi K a ~30 KDa Figura 3.32). Il fatto che non fosse stata osservata, nelle prove preliminari, una significativa diminuzione dell'attività della tirosinasi tra prima e dopo il trattamento con la proteinasi K, inizialmente aveva suggerito che questa non fosse digerita dalla proteasi. Tuttavia, come è possibile osservare dall'analisi western blot, l'anticorpo monoclonale T311, non è in grado di riconoscere la tirosinasi dopo il trattamento, come se l'epitopo riconosciuto dall'anticorpo (frammento 233-247,

Figura 3.22), fosse stato tagliato o comunque modificato.

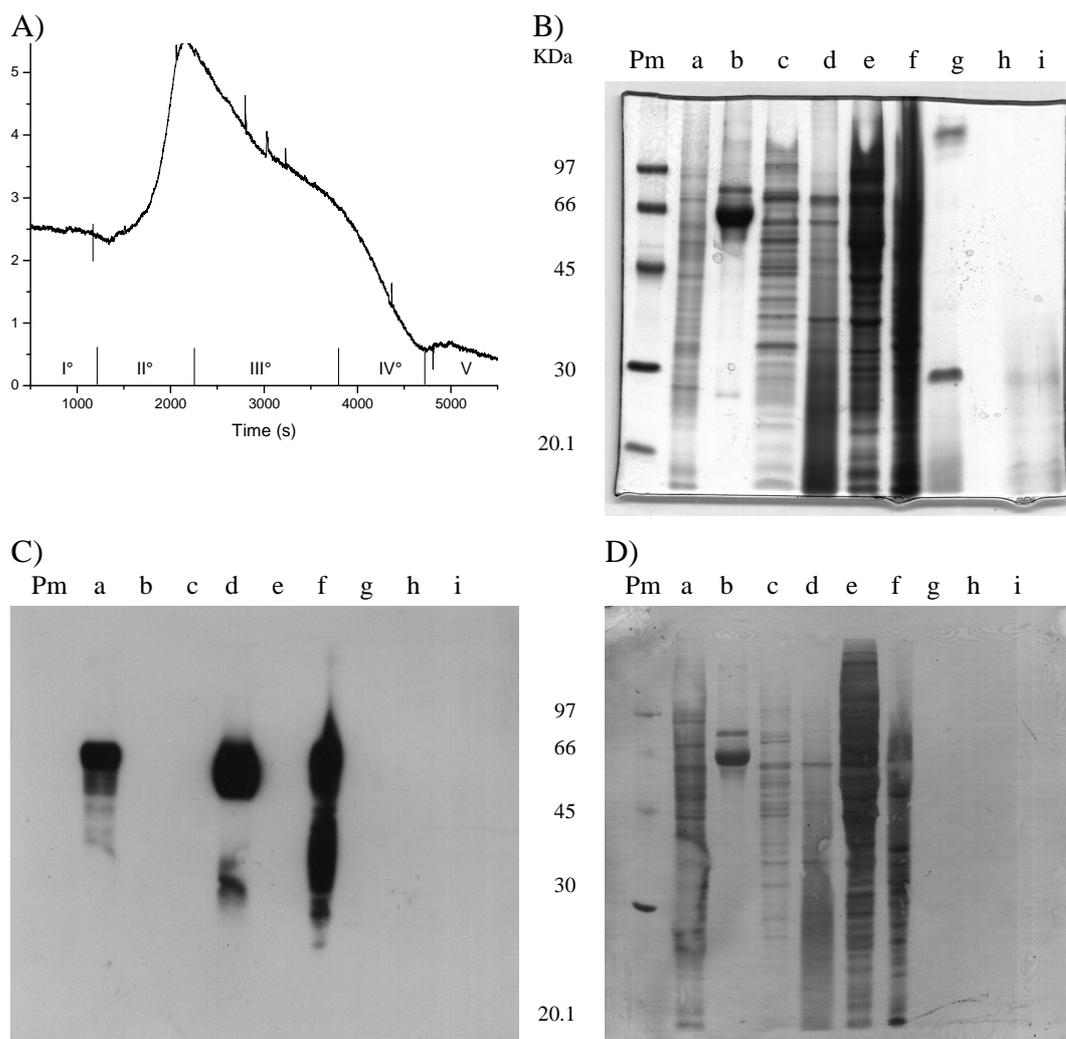


Figura 3.32

Risultati della purificazione effettuata mediante il protocollo modificato. (A) Cromatogramma relativo alla purificazione; vedi testo per dettagli. (B) Analisi SDS-PAGE, (D) western blot e (C) relativa membrana PVDF effettuata sui principali passaggi della purificazione, di seguito elencati: campione grezzo (a), medium di crescita (b), surnatante I° ultracentrifuga (c), surnatante II° ultracentrifuga (d), surnatante II° ultracentrifuga controllo negativo (e) pellet II° ultracentrifuga (f), digerito con 5 U/ml di proteinasi K, *overnight* a 4°C (g), flow trough (h), frazione contenente attività dopo concentrazione (i), pesi molecolari (Pm).

Dalla cromatografia sono comunque ottenute delle frazioni con attività tirosinasi, confermando che l'enzima, nonostante la parziale modifica da parte della proteasi, appare ancora attivo. La successiva concentrazione delle frazioni determina però un notevole decremento della resa finale.

Se da un lato quindi, il trattamento con la proteinasi K consente di ridurre drasticamente il numero totale di proteine dopo la solubilizzazione, dall'altro si perde la capacità di individuare con certezza la tirosinasi mediante analisi SDS-

PAGE, a causa dell'incapacità dell'anticorpo di riconoscerla. Il basso livello di enzima ottenuto e la bassa risoluzione del SDS-PAGE, dovuta alla presenza di Triton 100-X, non permette di individuare alcuna banda significativamente intensa associabile alla tirosinasi, dopo l'eluizione e la concentrazione della frazioni con attività.

Nuovi approcci per purificare la tirosinasi sono stati ideati o adattati dalla letteratura, al fine di aumentare la quantità di enzima solubilizzato dalle membrane. Uno *screening* è stato effettuato come riportato in Tabella 3.4, dove diverse condizioni di solubilizzazione sono state testate su membrane purificate come da protocollo. Si sono poi ottenuti i valori di attività tirosinasi nella frazione solubile, dopo ultracentrifugazione, e confrontati con quelli ottenuti dal controllo positivo, rappresentato dal buffer di solubilizzazione Triton 100-X 3%. Sono state provate diverse condizioni: utilizzano la proteinasi K con diverse concentrazioni di SDS come descritto in letteratura¹¹⁴, oppure senza SDS, assumendo che la proteinasi K solubilizzasse direttamente l'enzima, tagliando l'enzima tra la regione luminale e l'ancora transmembrana. Infine anche l'utilizzo di *porcine pancreatic lipase* è stato testato come riportato in letteratura¹²³ per purificare l'enzima da cellule da particolato derivante da melanomi, determinando la solubilizzazione delle membrane lipidiche.

Solubilizzazione con	Temperatura	Attività
Triton 3%	4°C	100%
B-dodecil maltoside 1%	4°C	74,7%
B-dodecil maltoside 3%	4°C	67%
Prot K 50 U/ml SDS 2%	Temperatura ambiente	85,5%
Prot K 50 U/ml SDS 1%	Temperatura ambiente	109 %
Prot K 50 U/ml	4°C	27,8%
Prot K 150 U/ml	4°C	31%
Prot K 150 U/ml + SDS 0,1%	4°C	59%
Prot k 150 U/ml + SDS 0,05%	4°C	60%
Prot k 150 U/ml + SDS 0,01%	4°C	53%
PPL 1mg/ml	4°C	43,4%

Tabella 3.4

Diverse condizioni di solubilizzazione testate e la relativa attività tirosinasi rilevata dopo 2 ore, nella frazione solubilizzata, espressa relativamente al buffer Triton 100-X 3%.

Tutte le condizioni testate dimostrano la capacità di solubilizzare l'enzima, anche se con differente efficacia. È interessante osservare che, anche il solo trattamento con la proteinasi K, consente di ottenere una discreta solubilizzazione dell'enzima, a sostegno dell'ipotesi della parziale proteolisi dell'enzima. Anche il trattamento con la lipasi sembra liberare l'enzima dalla frazione membranosa. Tuttavia la migliore condizione testata è rappresentata dall'utilizzo di SDS 1% e proteinasi K. Si è pensato dunque di sostituire il Triton 100-X, con l' SDS 1% nel protocollo di purificazione precedentemente utilizzato.

Una preparazione in piccola scala è stata dunque provata solubilizzando la frazione di membrana preparata come da protocollo in tampone fosfato 10 mM SDS1% pH 7.2, mantenendo invariato il rapporto tra quantità di membrane e buffer di solubilizzazione.

Dopo la seconda ultracentrifugazione il surnatante è stato trattato con 50 U/ml di proteinasi K per due ore a temperatura ambiente e successivamente mescolato "in batch" con la resina DEAE come da protocollo. Dopo caricamento in colonna e successivo lavaggio, le proteine sono state eluite in un unico step, mediante l'aggiunta di tampone fosfato 200 mM pH7.2 e raccolte in frazioni da 1 ml. La scelta di eluire le proteine senza un gradiente, spesso utilizzata anche nei protocolli precedenti, deriva dalla necessità di non diluire l'enzima e la relativa attività, utilizzata per identificare le frazioni da analizzare. La

Tabella 3.5 e la Figura 3.33 riassumono i risultati di quest'ultimo protocollo.

Campione	Attività (U/ml)	Volume (ml)	Unità (U)	Resa (%)
Surnatante II ultracentrifuga SDS 1%	0,020179	1	0,020179	100
Digerito per 2 ore a room temperature con 50 U/ml	0,0133	1	0,0133	65
Frazioni unite con attività	0,005172	2	0,0103	51

Tabella 3.5

Tabella riassuntiva di purificazione; la resa è relativa alle unità ottenute rispetto a quelle iniziali.

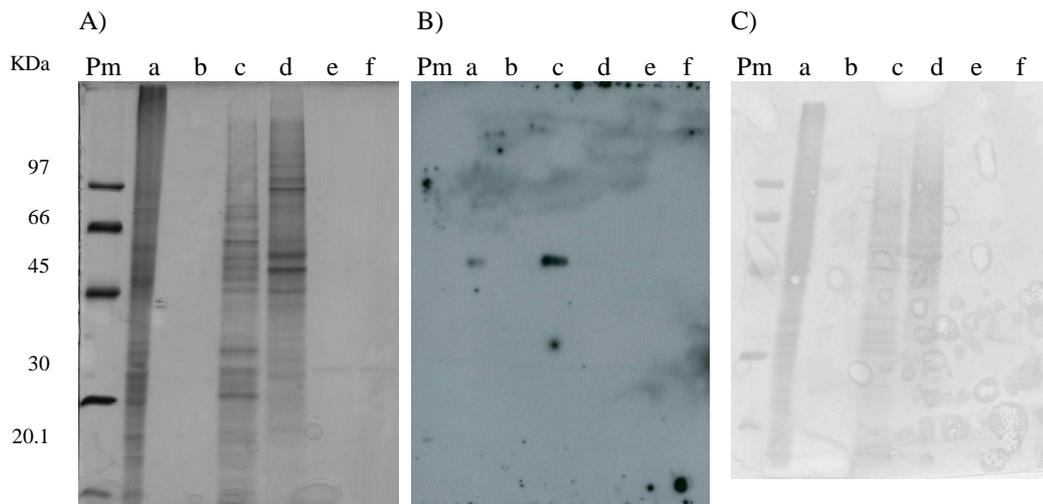


Figura 3.33
 Analisi SDS-PAGE (A), western blot (B) e relativa membrane PVDF (C) della purificazione mediante solubilizzazione con SDS 1%. Campioni caricati: estratto grezzo (a), surnatante prima ultracentrifuga (b), surnatante II ultracentrifuga (c), pellet II ultracentrifuga (d), digerito prot K (e) frazione eluita con attività (f).

Se la solubilizzazione con SDS consente una migliore risoluzione su SDS-PAGE e western blot, ancora non è possibile identificare alcuna banda significativa associabile alla tirosinasi dopo l'eluizione dalla resina, anche a causa del mancata identificazione mediante riconoscimento anticorpale, come precedentemente ottenuto. Inoltre l'eluizione in un unico step non consente di eliminare la proteinasi K, che co-eluisce con la tirosinasi.

3.3.5.2 Isolamento della tirosinasi in gel nativo

Se i tentativi precedenti non consentono di isolare in modo soddisfacente la tirosinasi umana a causa della sua bassa espressione, un nuovo approccio è stato ipotizzato considerando la capacità dell'enzima di lavorare in SDS. In particolare, data la ridotta quantità di enzima espressa e quindi l'impossibilità di isolare l'enzima mediante le classiche tecniche cromatografiche, è stata considerata la possibilità di isolare direttamente l'enzima mediante separazione su gel di acrilamide, in un SDS-PAGE nativo, cioè sviluppato immergendo il gel in una soluzione di L-DOPA e MBTH incolore (zimogramma). La colorazione rossa, data dall'addotto MBTH-dopachinone, prodotto dall'attività enzimatica, consente di localizzare nel gel la banda corrispondente alla tirosinasi.

Una serie di esperimenti preliminari hanno permesso di individuare in un SDS-PAGE all'8% di acrilamide, non riducente, la migliore condizione per separare la frazione proteica estratta mediante SDS 1% dalle membrane cellulari ottenute come da protocollo. In questo gel infatti le proteine vengono separate, in base alla loro mobilità elettroforetica, definita dalla carica e dalle dimensioni complessive. Se l'SDS agisce normalmente da denaturante per le altre proteine, l'enzima tirosinasi preserva la propria attività catalitica, consentendo di localizzare la banda corrispondente dopo la corsa elettroforetica. Al fine però di ridurre il numero complessivo di proteine nella corsa elettroforetica è stato anche aggiunto un passaggio di digestione con proteinasi K (un'ora 5 U/ml a temperatura ambiente) del campione, prima della sua analisi.

Effettuata la corsa elettroforetica, il gel è stato sviluppato nella soluzione DOPA-MBTH e, dopo alcuni minuti, la posizione della tirosinasi è stata localizzata da una debole banda rosa visualizzabile nel gel. Successivamente il gel è stato colorato con Coomassie al fine di osservare tutte le altre proteine. Il risultato dell'analisi è rappresentato in Figura 3.34.

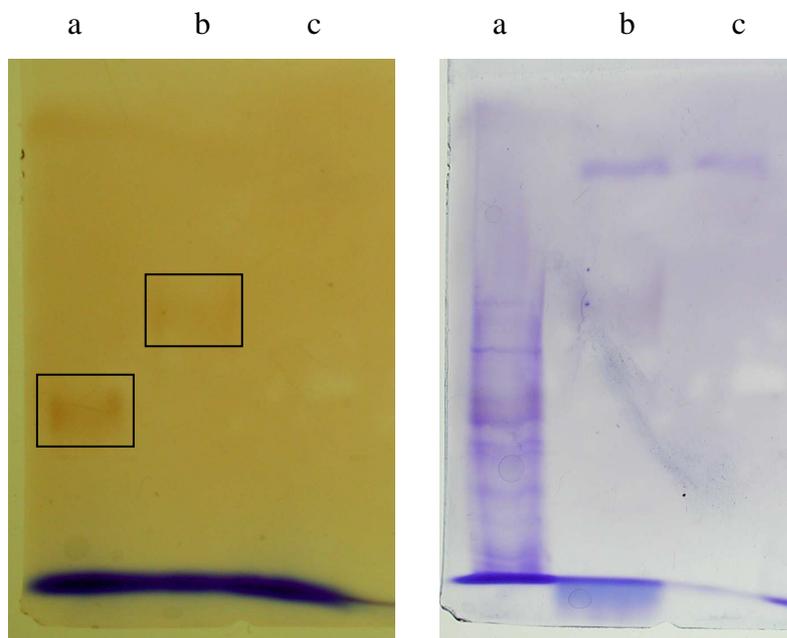


Figura 3.34

Analisi SDS-PAGE (8% acrilamide, non riducente) con colorazione nativa, sinistra e successiva colorazione con Coomassie, a destra. I campioni caricati sono rispettivamente: estratto proteico delle membrane con SDS 1% (a), estratto proteico delle membrane con SDS 1%, digerito un'ora a temperatura ambiente con proteinasi K (0,05 mg/ml) (b), proteinasi K (0,05 mg/ml) (c). In evidenza () le banda con attività tirosinasi.

Come risulta dall'analisi effettuata la colorazione con substrato consente effettivamente di localizzare una banda che possiede attività tirosinasi, nell'estratto grezzo solubilizzato dalle membrane. La relativa colorazione al Coomassie evidenzia tuttavia la notevole sovrapposizione di questa con altre bande proteiche non consentendo di associare univocamente l'attività ad una banda. Dopo la digestione però, l'altezza relativa della banda evidenziata mediante colorazione con substrato, risulta spostata verso l'alto, dimostrando una differente mobilità elettroforetica della tirosinasi dopo il trattamento con la proteinasi K. Risulta inoltre drasticamente ridotto il numero di proteine visualizzabili dopo colorazione con Coomassie, mostrando solo uno *smear* nella regione più bassa, associabile a peptidi prodotti della digestione, la presenza della proteinasi K, come dimostra il campione di controllo, e una debole banda, poco risolta, alla stessa altezza di quella con attività catalitica.

La banda corrispondente alla tirosinasi è stata successivamente tagliata da gel, solubilizzata in condizioni denaturanti e analizzata nuovamente mediante SDS-PAGE (12% acrilammide, condizioni riducenti), parallelamente alla frazione trattata con proteinasi K (Figura 3.35).

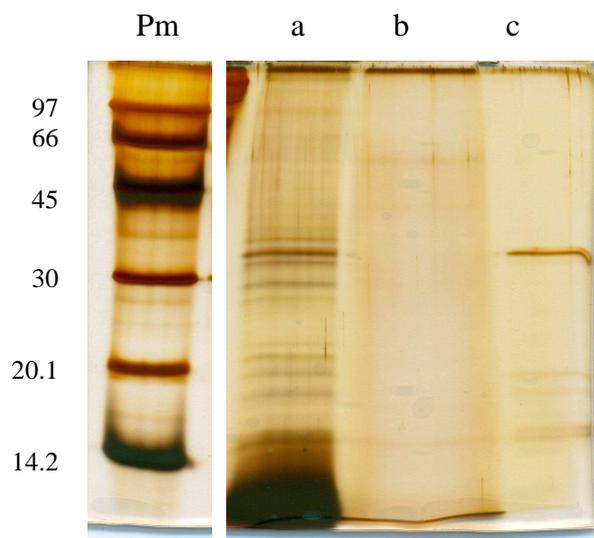


Figura 3.35

Analisi SDS-PAGE (12% acrilammide) in condizioni riducenti, sviluppato mediante colorazione ad argento. Sono caricati rispettivamente i campioni: estratto proteico delle membrane con SDS 1%, digerito un'ora a temperatura ambiente con proteinasi K (0,05 mg/ml) (a), banda isolata della tirosinasi mediante gel nativo, dopo digestione con proteinasi K (b), proteinasi K (0,05 mg/ml) (c).

Come si osserva da quest'ultima analisi, se mediante analisi in gel nativo una banda associabile alla tirosinasi poteva essere identificata mediante la comparazione tra le due modalità di colorazione, in condizioni riducenti, diverse bande caratterizzano la frazione digerita con la proteinasi K e, anche se isolata mediante gel nativo, non è ancora possibile associare con certezza una banda alla tirosinasi.

3.4 Conclusioni prima parte

La tirosinasi umana è stata espressa in forma ricombinante in cellule d'insetto, attiva e correttamente processato. Tuttavia il livello di espressione risulta molto basso e i tentativi di purificazione consentono di ottenere una frazione arricchita di enzima, ma non una forma completamente purificata.

I diversi approcci però utilizzati consentono di trarre alcune informazioni utili sulla struttura globale dell'enzima e della sue caratteristiche: (i) l'enzima è, come noto, associato alle membrane e (ii) la sua digestione mediante proteinasi K consente di ottenerne una forma solubile; (iii) l'enzima è SDS e proteinasi K resistente: anche se parzialmente digerito, come dimostra la sua differente mobilità elettroforetica e il riconoscimento anticorpale, il sito catalitico preserva la sua funzione.

3.5 Caratterizzazione strutturale del sito attivo dell'enzima

Lo *screening* di substrati ed inibitori è un metodo da tempo utilizzato per caratterizzare il sito attivo degli enzimi quando la relativa struttura cristallografica non sia ancora stata risolta. Un esempio storico è rappresentato dal primo modello della *pig liver esterase* ottenuta mediante *screening* di decine di substrati artificiali e analisi delle costanti cinetiche ottenute per ciascuno di questi. Il modello ottenuto è stato per molto tempo utilizzato per un approccio biocatalitico nella risoluzione enantiomerica di miscele racemiche¹²⁴.

Se L-tirosina e L-DOPA rappresentano i substrati naturali della tirosinasi, fenolo e catecolo rappresentano le strutture base sulle quali l'enzima agisce. Non necessariamente, quindi, i substrati naturali rappresentano gli unici substrati possibili, ma possono esserlo anche tutta una serie di molecole fenoliche e catecoliche variamente sostituite. Con questo tipo di approccio, al fine di ottenere informazioni strutturali dalla tirosinasi espressa in forma ricombinante, sono stati individuati una serie di substrati ed inibitori putativi (Figura 3.36) per uno *screening* da effettuare utilizzando la frazione solubilizzata delle membrane mediante SDS 1%.

3.5.1 Individuazione di substrati ed inibitori

I substrati scelti, differiscono dalla struttura base del catecolo, per modificazioni di diversa entità, essendo l'attività difenolasica quella più consistente. Tali differenze si ripercuotono sulle costanti cinetiche che caratterizzando il legame di un substrato all'enzima. Ingombro sterico, lunghezza della catena, idrofobicità, presenza di gruppi carichi o in grado di formare ponti a idrogeno sono tutte caratteristiche che potranno essere valutate sulla base dei parametri cinetici osservati. Ciò fornirà informazioni sulle caratteristiche spaziali e chimiche del sito attivo dell'enzima. Anche nella scelta degli inibitori, si è proceduto secondo gli stessi criteri che hanno dettato la scelta dei substrati. Per ottenere informazioni sulla struttura e sul funzionamento del sito catalitico dell'enzima, la classe più informativa di inibitori è ovviamente rappresentata dagli inibitori competitivi, che agiscono direttamente legandosi al sito di legame al

substrato. Tali molecole, entrano nel sito attivo dell'enzima in un modo del tutto simile a quello dei substrati, essendo in alcuni casi degli analoghi strutturali degli intermedi di reazione. Il meccanismo di inibizione proposto per l'acido Kojico e la Mimosina, prevede la formazione di un complesso bidentato in cui i due atomi di rame nel sito attivo dell'enzima, vengono chelati dal gruppo idrossichetonico sull'anello aromatico di tali molecole. Lo stesso meccanismo si verifica per gli inibitori come l'acido benzoico, in cui il rame viene chelato dagli ossigeni della porzione carbossilica.

Oltre a queste due classi di inibitori, abbiamo inserito nella nostra analisi anche la feniltiourea e l'Esculetina. La prima è stata scelta poiché esiste uno studio in cui una catecolo-ossidasi è stata cristallizzata con feniltiourea legata al sito attivo¹²⁵ l'Esculetina invece è un composto naturale che sembrerebbe in grado di inibire il processo di melanogenesi in vivo ed in vitro, con costanti di inibizione molto basse.

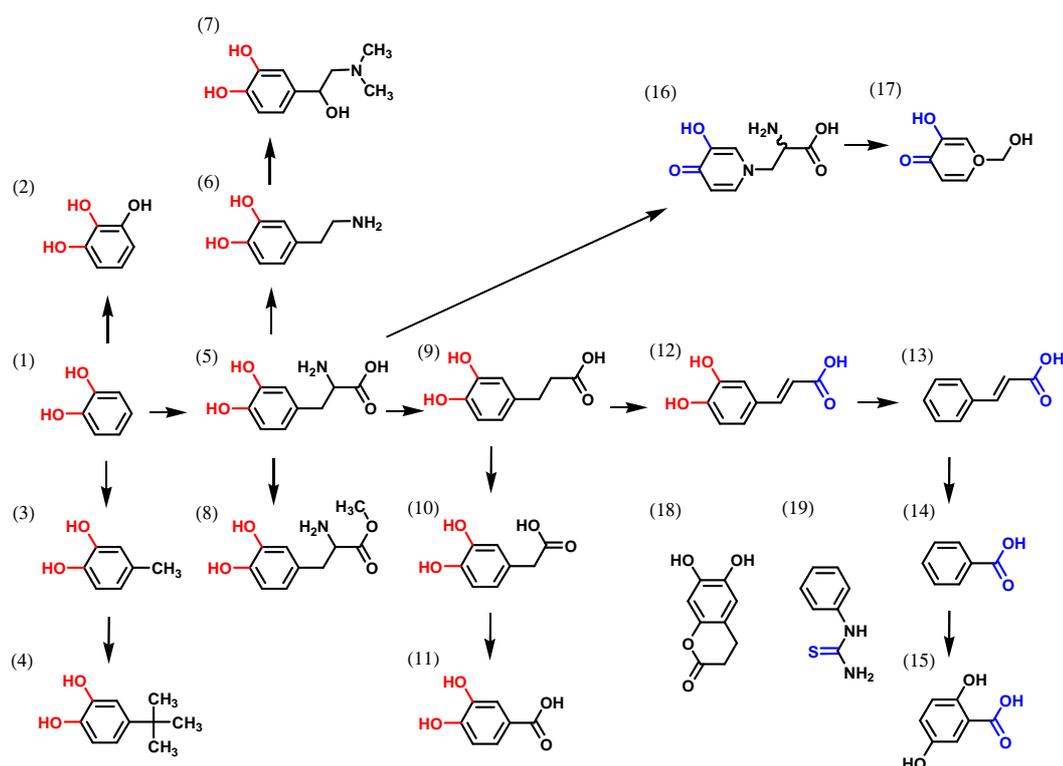


Figura 3.36

Substrati ed inibitori utilizzati. In rosso, è evidenziata la parte della molecola che agisce come substrato; in blu, la porzione della molecola che inibisce l'enzima. Substrati: catecolo (1), pirogallolo (2), 4-metil-catecolo (3), 4-*tert*-butilcatecolo (TBC) (4), L-DOPA (5), dopamina (6), isoproterenolo (7), DOPA metil-estere (8), acido diidrossipropionico (9), acido diidrossifenilacetico (10), acido diidrossibenzoico (11). Inibitori: acido caffeico (12), acido cinnamico (13), acido benzoico (14), acido 2,5-diidrossibenzoico (15), 1-mimosina (16), acido Kojico (17), feniltiourea (19), Esculetina (18).

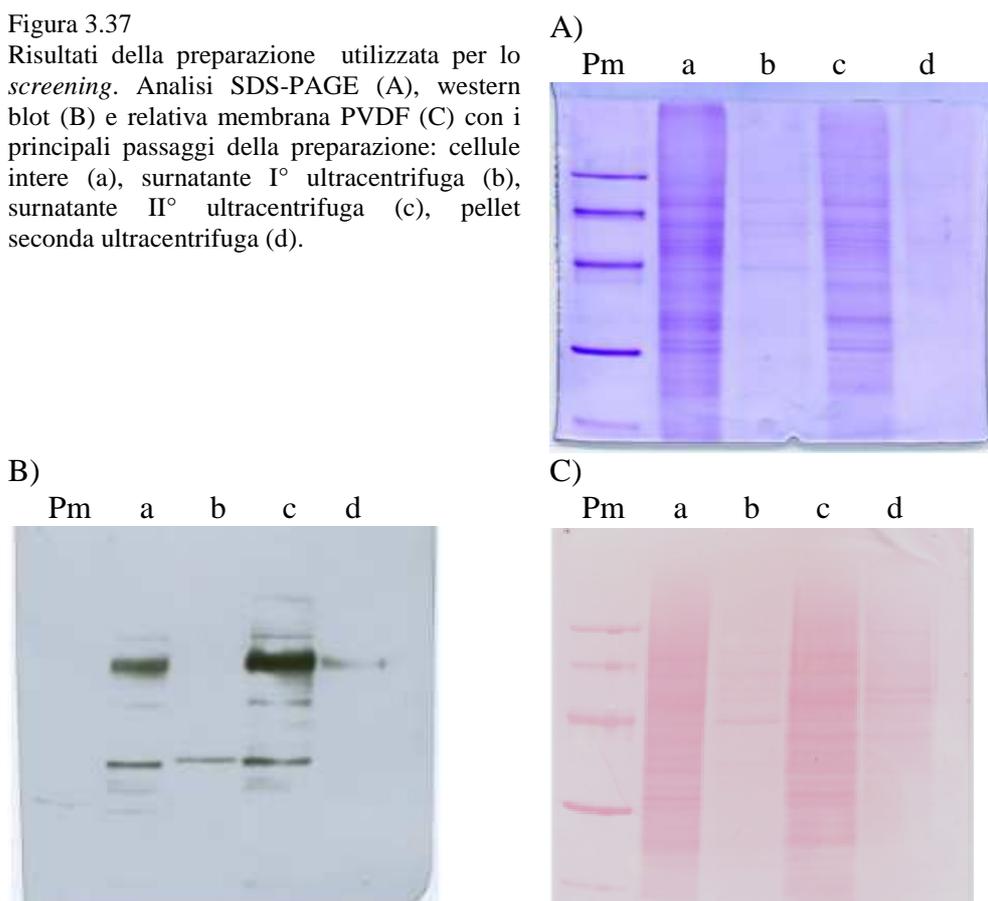
3.5.2 Determinazione delle costanti cinetiche

La determinazione delle costanti cinetiche è stata effettuata mediante saggio parallelo in piastre da 96 pozzetti, come descritto in materiale e metodi, utilizzando la frazione solubilizzata da membrane prodotte come da protocollo, in SDS 1% (campione c in Figura 3.37). Si è preferito, infatti, utilizzare questa frazione, piuttosto che quella trattata con proteinasi K, in quanto non è stato chiarito se il trattamento con la proteasi potesse influenzare l'accessibilità di substrati ed inibitori nel sito catalitico. Si è dunque preferito utilizzare una frazione con basso livello di purezza, ma con l'enzima in forma nativa.

Dalla preparazione sono stati ottenuti 50 ml di soluzione con 0,0398 U/ml che, appositamente frazionati e stoccati, sono stati utilizzati per lo *screening* di tutte le molecole.

Figura 3.37

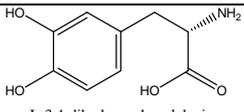
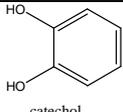
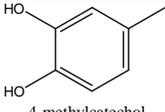
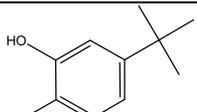
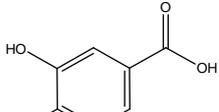
Risultati della preparazione utilizzata per lo *screening*. Analisi SDS-PAGE (A), western blot (B) e relativa membrana PVDF (C) con i principali passaggi della preparazione: cellule intere (a), surnatante I° ultracentrifuga (b), surnatante II° ultracentrifuga (c), pellet seconda ultracentrifuga (d).

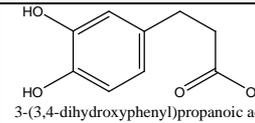
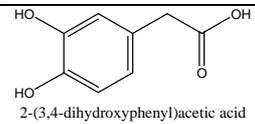
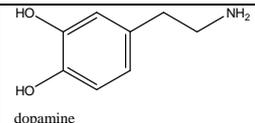
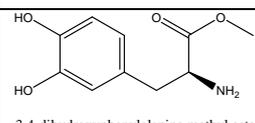
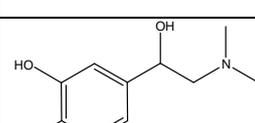
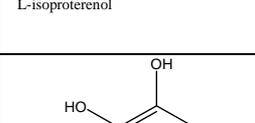


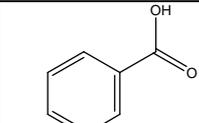
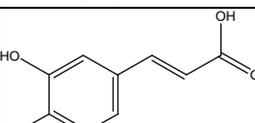
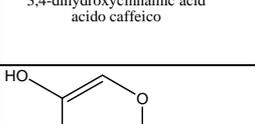
Lo studio è stato condotto in parallelo anche utilizzando una tirosinasi di origine batterica, quella di *Streptomyces antibioticus* (vedi paragrafo 3.1.2.5), ottenuta in forma ricombinante e purificata, come riportato in letteratura¹²⁶.

Questo enzima possiede un'elevata omologia di sequenza con la tirosinasi di *Streptomyces castaneoglobosporus* (identità 82% nella proteina intera, ~100% nel sito attivo), la cui struttura è nota. Lo *screening* parallelo con la seconda tirosinasi è stato condotto per osservare le differenze o le similarità che contraddistinguono i due enzimi, in termini di affinità, e da questo poter trarre informazioni strutturali sulla forma umana, essendo quella della forma batterica nota. L'enzima batterico è stato ottenuto con un'attività finale di 0,06 U/ml alla concentrazione di 0,01µM. I risultati ottenuti con i substrati sono schematizzati nella Tabella 3.6 .

Mentre i valori di K_m sono indipendenti dalla concentrazione di enzima utilizzato, la K_{cat} è proporzionalmente associata a questa: se per la tirosinasi batterica è stato quindi possibile determinare un valore assoluto, per quella umana, la cui concentrazione rimane ignota, è stato riportato il valore di V_{max} ottenuto per ogni substrato la percentuale relativa alla V_{max} ottenuta con il substrato naturale L-DOPA (100%). Questo perchè è stata utilizzata per ogni cinetica, la stessa quantità di frazione ottenuta dalla preparazione, quindi virtualmente la stessa quantità di tirosinasi umana.

A)	Tirosinasi							
Substrati	<i>Streptomyces antibioticus</i>				<i>Homo sapiens</i>			
Struttura e nome	K_m [mM]	K_{cat}	V_{max} [umol/min]	V_{max} relativa	K_m [mM]	V_{max} [umol/min]	V_{max} relativa	Note
 L-3,4-dihydroxyphenylalanine	2.82 ± 0.26	590 ± 18	1.33 ± 0.04	100	0.34 ± 0.03	0.67 ± 0.04	100	
 catechol	1.09 ± 0.25	68 ± 11	0.37 ± 0.05	11.53	16.7 5 ± 1.88	0.84 ± 0.06	133	1
 4-methylcatechol					2.55 ± 0.81	0.5 ± 0.1	74.6	2
 4-tert-butylcatechol	0.57 ± 0.06	3863 ± 272	17 ± 1	653	0.86 ± 0.06	0.35 ± 0.01	50	3
 3,4-dihydroxybenzoic acid								4

 <p>3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoic acid</p>	1.3 ± 0.1	1745 ± 12	1.93 ± 0.06	295	0.95 ± 0.2			5
 <p>2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid</p>	11.64 ± 1.57	1318 ± 90	2.9 ± 0.2	223	31.1 ± 4.1	0.14 ± 0.02	23	
 <p>dopamine</p>	35 ± 3	1590 ± 45	3.5 ± 0.1	269.23	24.4 ± 2.7	1.6 ± 0.1	266.66	
 <p>3,4-dihydroxyphenylalanine methyl ester</p>	1.29 ± 0.06	995 ± 4	2.19 ± 0.01	161.54	1.85 ± 0.17	1.18 ± 0.04	183.33	
 <p>L-isoproterenol</p>	230.7 ± 34.6	350 ± 13	0.77 ± 0.03	53.84	58.5 ± 7.5	0.043 ± 0.001	6.66	
 <p>pyrogallol</p>								6

B)	Tirosinasi						
	Inibitori	<i>Streptomyces antibioticus</i>			<i>Homo sapiens</i>		
Struttura e nome		K _i [mM]	K _{iu} [mM]	tipo inibizione	K _i [mM]	K _{iu} [mM]	tipo inibizione
 <p>benzoic acid</p>	6.6 ± 0.2		C	0.52 ± 0.02		C	
 <p>3,4-dihydroxycinnamic acid acido caffeico</p>				0.39 ± 0.01		C	7
 <p>kojic acid</p>	0.109 ± 0.005	0.121 ± 0.006	NC	0.34 ± 0.01	0.331 ± 0.007	NC	

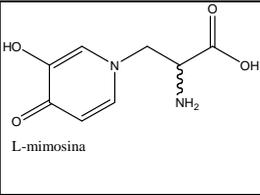
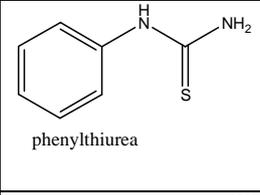
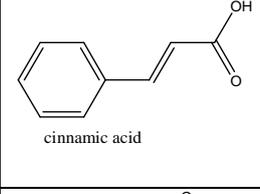
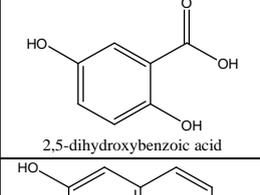
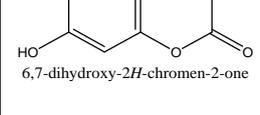
 <p>L-mimosina</p>	0.054 ± 0.002			C	0.0103 ± 0.004		C	
 <p>phenylthiourea</p>	0.09 ± 0.01	0.15 ± 0.01		M	0.0017 ± 0.0001	0.15 ± 0.015	IC	
 <p>cinnamic acid</p>	2.45 ± 0.12			C	0.081 ± 0.007		C	
 <p>2,5-dihydroxybenzoic acid</p>								8
 <p>6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one</p>	0.00039 ± 0.00002	0.0012 ± 0.0002		M				9

Tabella 3.6

Schema riassuntivo dello studio cinetico con i substrati (A) ed inibitori (B) selezionati. Vengono indicati i valori di K_m , V_{max} , V_{max} relativa e la anche la K_{cat} per la tirosinasi batterica, nel caso di substrati. Viene invece indicata la tipologia di inibizione osservata e le relative costanti di inibizione K_i e K_{iu} nel caso delle analisi sugli inibitori. Abbreviazioni: competitiva (C), non competitiva (NC), in-competitiva (IC), mista (M). Note: (1) si osserva *suicide inhibition* nel caso della tirosinasi batterica; (2) si osserva *suicide inhibition* nel caso della tirosinasi batterica tale da non permettere una stima delle costanti; (3) si osserva *suicide inhibition* nel caso della tirosinasi batterica; (4) nessuna attività rilevata per entrambi gli enzimi; (5) non stimata la V_{max} e la V_{max} relativa per la tirosinasi umana, a causa dell'utilizzo di uno stock di enzima di una differente preparazione; (6) nessuna attività rilevata per entrambi gli enzimi; (7) l'attività mista substrato-inibitore della molecola, nel caso della tirosinasi batterica, non consente di stimare le costanti di inibizione; (8) nessuna attività inibitoria rilevata per entrambi gli enzimi; (9) nessuna attività inibitoria rilevata per la tirosinasi umana.

3.6 Conclusioni seconda parte

I risultati dello *screening* sono comparabili ai dati presenti in letteratura^{95, 96, 119, 126-128} e consentono di trarre informazioni utili sulla struttura del sito catalitico dei due enzimi analizzati che è stata riassunta in Figura 3.38 e discussa di seguito.

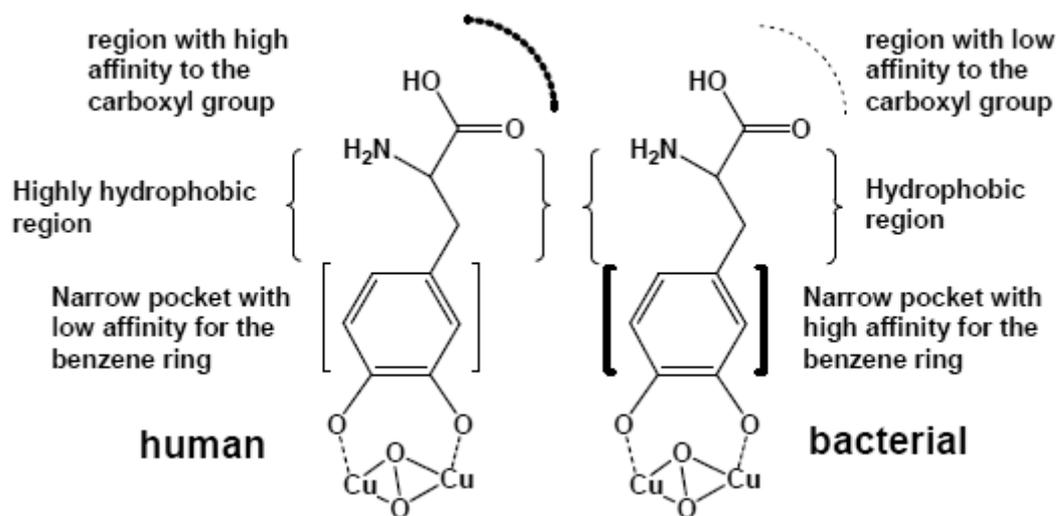


Figura 3.38

Struttura schematica dei siti catalitici delle due tirosinasi analizzate, ottenuta dal confronto tra i dati di reattività ottenuti.

Analizzando il primo luogo i dati ottenuti per la tirosinasi batterica, il fatto che il catecolo rappresenti il substrato più affine (K_m 0.57 mM) presuppone che la regione adiacente al sito catalitico sia deputata ad ospitare l'anello aromatico con elevata affinità, tale che qualsiasi altra sostituzione ne determina la diminuzione. In più, il fatto che il pirogallolo non agisca da substrato e che il l'acido-2,5-diidrossibenzoico non agisca da inibitore come, invece, agisce l'acido benzoico, fa supporre che la regione deputata ad ospitare l'anello benzenico, sia relativamente stretta e l'ingombro sterico determinato dal gruppo idrossile in posizione *meta* nel pirogallolo e *orto* nell'acido-2,5-diidrossibenzoico, non consenta a queste molecole di entrare nel sito. Tuttavia catecolo, metil-catecolo e *tert*-butil catecolo hanno mostrato di agire come *suicide inhibitor* (paragrafo 3.1.2.3), cioè sembrano in grado di approssicare l'enzima come se fossero dei monofenoli, determinando ipoteticamente la loro *o*-idrossilazione. Questo sembra incompatibile con l'inattività nei confronti del pirogallolo, a meno che non consideri differente le

modalità di accesso del substrato nel ciclo catecolasico rispetto a quello cresolasico.

Il secondo substrato più affine è rappresentato dal *tert*-butil catecolo (K_m : 1.09 mM): questo fa supporre che, nelle immediate vicinanze della regione deputata ad accogliere l'anello aromatico, vi sia un ambiente idrofobico che tende a stabilizzare il complesso substrato-enzima. Questo è confermato anche dal fatto che il l'acido-3,4-diidrossibenzoico non agisce da substrato, probabilmente per la localizzazione del gruppo carbossilico nella putativa regione idrofobica.

Tuttavia dal valore di K_m della DOPA (K_m : 2.82 mM), potremmo concludere che l'aggiunta della catena laterale idrofilica non compromette del tutto l'affinità del legame per il substrato. In questo caso però, i residui del sito catalitico che entrano in gioco e stabilizzano la molecola nel complesso enzima substrato, devono essere collocati in una posizione più "distale" rispetto alla regione che stabilizza la struttura catecolica e la regione idrofobia più "prossimali". L'importanza del gruppo carbossilico, nello stabilizzare il substrato naturale, rispetto a quello amminico è evidente se si confrontano i valori di affinità del DHPPA e della dopamina (rispettivamente K_m :1.3 e 35.56 mM): la rimozione dell'ossigeno carbonilico dalla catena, si traduce in una notevole perdita dell'affinità del substrato per l'enzima. Un'ipotesi potrebbe essere che in questa regione, la catena laterale sia stabilizzata da atomi in grado di formare ponti ad idrogeno, ma non dalla carica negativa del gruppo carbossilico dato che la sua neutralizzazione, nel caso della DOPA metil estere (K_m : 1.29 mM), non comporta una diminuzione dell'affinità. Ipotesi confermata anche dal fatto che, riducendo la distanza dal gruppo carbossilico rispetto all'anello catecolico, viene ridotta anche l'affinità (DHPPA K_m :1.3 mM, DHPAA K_m :11.64, DHBA K_m : non rilevata), dal momento che il gruppo carbossilico si sposta da una regione a lui affine ad una regione idrofobica. L'isoproterenolo mostra una scarsa affinità di legame al sito catalitico, sensibilmente più bassa rispetto a quella degli altri substrati, a conferma del modello proposto: un gruppo idrossilico in prossimità dell'anello, viene sfavorito dalla presenza di una regione idrofobia prossimale e il gruppo amminico sostituito in posizione distale, non stabilizza il complesso enzima-substrato.

Per quanto riguarda gli inibitori, bisogna tenere presente che questi agiscono mediante la porzione carbossilica o idrossichetonica, in quanto la distanza tra i due atomi di ossigeno è paragonabile a quella di un difenolo, ma non esiste alcuna forma di reattività nei confronti di questi gruppi, che competono, dunque con i substrati. Dal confronto delle affinità (K_{ic}) degli inibitori acido benzoico e acido cinnamico, sembra che cause steriche favoriscano la presenza dell'anello benzenico in una regione più distale rispetto al carbossile, invece che proximale. L'analisi, poi, dell'effetto inibitore esercitato dall'acido caffeico è complicata dal fatto che tale molecola agisce anche come substrato. Infine, il ruolo "stabilizzante" del gruppo carbossilico all'estremità della catena laterale, sembra essere confermata dal confronto delle costanti di inibizione dell'acido Kojico e L-Mimosina: infatti, mentre l'ossidrile dell'acido Kojico si troverebbe in una regione ipoteticamente idrofobica, la mimosina dovrebbe assumere una conformazione molto simile a quella della DOPA e quindi più affine.

Nell'enzima umano, a differenza di quello batterico, il catecolo non è il substrato che mostra la più alta affinità e la sua K_m ha un valore circa 50 volte superiore quello della L-DOPA, che risulta invece il substrato più affine (K_m : 0.34mM). Questo a suggerire come l'enzima si sia evoluto per avere un'alta specificità per il substrato fisiologico. Seguono metilcatecolo con K_m : 0.43 e *tert*-butilcatecolo con K_m : 0.86, dove la diminuzione dell'affinità, in quest'ultimo caso, potrebbe essere determinata dall'ingombro sterico dovuto alla catena laterale, ma suggerisce che, anche nella tirosinasi umana, vi sia una regione idrofobica proximale al sito attivo, subito dopo la regione che coordina il catecolo.

Tornando alla DOPA, anche nell'enzima umano, la presenza di un carbonile all'estremità della catena laterale sembra stabilizzare il legame del substrato, da momento che la sua eliminazione, nel caso della dopamina, determina una drastica riduzione dell'affinità (K_m dopamina: 24.4 mM). La carica negativa, che potrebbe localizzarsi sull'ossigeno dell'ossidrile della porzione carbossilica, sembra essere importante al fine di stabilizzare ulteriormente il gruppo carbossilico: si osserva infatti la riduzione di affinità nel caso della DOPA metilestere (K_m pari a 1.85 mM); tuttavia non si esclude che questo effetto potrebbe però essere determinato solo da un aumento dell'ingombro sterico della

molecola. L'effetto dello spostamento del carbonile, si traduce in una diminuzione dell'affinità di legame, come per l'enzima batterico (K_m DHPPA: 0.95 mM, K_m DHPAA: 31.18 mM, K_m DHBA: non rilevato). Anche per l'enzima umano, l'Isoproterenolo si conferma essere il substrato che dimostra la minore affinità per il sito attivo, a conferma del modello ipotizzato. Il fatto che l'acido 2,5-diidrossibenzoico, non agisca da inibitore con la tirosinasi umana come invece fa l'acido benzoico, e il fatto che il pirogallolo non rappresenti un substrato, a differenza del catecolo, dimostra che anche in questo enzima, la tasca deputata ad accogliere l'anello catecolico sia relativamente stretta, seppure poco affine, e non consenta l'ingresso di substrati catecolici *meta*-sostituiti. Sa a questo si aggiunge il fatto che non siano stati osservati substrati con attività *suicide inhibition*, si può ritenere che la tasca enzimatica della tirosinasi umana sia molto più ristretta e selettiva.

Le stesse conclusioni tratte dal confronto tra le costanti di inibizione di acido benzoico e acido cinnamico per l'enzima batterico, possono essere applicate alla tirosinasi umana ricombinante, con l'aggiunta che in questo caso, la differenza tra le costanti è molto maggiore (circa un ordine di grandezza). Anche la K_m dell'acido caffeico (seppure non molto inferiore di quella trovata per l'acido benzoico) sembrerebbe avvalorare questa ipotesi. Per quanto riguarda Mimosina e Kojico, anche in questo caso sembra che la catena laterale, abbia un effetto notevolmente stabilizzante sul complesso enzima-ligando.

I risultati ottenuti con feniltiourea ed Esculetina, sono invece di più difficile interpretazione, visto che i domini responsabili dell'inibizione sono strutturalmente diversi rispetto a quelli che definiscono le altre due classi di inibitori. Tuttavia, le due molecole in questione, si sono rivelate essere gli inibitori più affini al sito attivo dell'enzima, rispettivamente la feniltiourea per l'enzima umano e l'Esculetina per l'enzima batterico. Il diverso comportamento che manifesta l'Esculetina nei due tipi di enzima (inibitore dell'enzima batterico e substrato putativo dell'enzima umano), potrebbe essere compreso studiando il comportamento di altre molecole appartenenti alla classe delle Cumarine (a cui appartiene l'Esculetina).

Possiamo dunque concludere che le due tirosinasi utilizzate hanno probabilmente un intorno del sito attivo relativamente simile, ma con alcune

differenze importanti, che adattano ciascun enzima al ruolo fisiologico che ha nel suo ambiente: se, infatti, la tirosinasi batterica viene secreta da *Streptomyces antibioticus* nell'ambiente extracellulare, al fine di formare una matrice di melanine esterna con una funzione protettiva nei confronti di microrganismi esterni, la tirosinasi umana, rimane localizzata all'interno della cellula in cui viene espressa, anche se compartimentata. Se quindi nel primo caso la selettività nei confronti di substrati diversi dalla L-DOPA, rappresenta una caratteristica desiderata, in quanto viene incrementata la formazione di melanine, anche se strutturalmente diverse, nel secondo caso la forte selettività per il substrato naturale è essenziale per evitare trasformazioni non volute, che potrebbero ripercuotersi a livello metabolico e strutturale sulla cellula stessa.

4 Discussione

Ciò che contraddistingue i sistemi viventi dal resto della materia è rappresentato dal controllo che questi hanno nei confronti degli equilibri chimico-fisico che li caratterizzano. La perdita di questo controllo porta inevitabilmente alla morte.

Gli enzimi rappresentano il sistema utilizzato dagli organismi viventi per regolare le reazioni chimiche. Questi catalizzatori naturali si sono evoluti appositamente, non per massimizzare la velocità di trasformazione di un substrato in un prodotto, ma per determinare la conversione secondo le necessità dell'organismo, nel comparto e nel momento voluto. Si intuisce dunque il motivo per cui, enzimi appartenenti alla stessa categoria, ma provenienti da organismi differenti oppure da comparti diversi dello stesso organismo, possiedono caratteristiche molto diverse tra di loro, non solo in termini di costanti cinetiche, ma anche di selettività.

In questo contesto, studiare gli enzimi consiste non solo nel capire il meccanismo molecolare che determina la catalisi, ma anche il contesto in cui l'enzima esplica la sua attività. Selettività e velocità di catalisi cooperano per consentire al sistema vivente di mantenere le condizioni affinché l'organismo possa perpetuare tutti i processi metabolici e quindi di sopravvivere.

Nel lavoro svolto sulla tirosinasi umana, la differente selettività osservata tra questa e l'omologo enzima batterico evidenzia come, se da un lato utilizzare sistemi modello semplici consente di capire il meccanismo molecolare che caratterizza la categoria enzimatica, dall'altro è errato estendere le proprietà intrinseche di un enzima agli altri della stessa categoria. Se dunque si devono individuare putativi substrati o inibitori di un enzima a scopi terapeutici, l'utilizzo di sistemi modello più semplici od economici è certamente utile, ma deve sempre essere integrato con uno studio approfondito sull'enzima realmente *target* della terapia.

L'espressione in forma ricombinante degli enzimi rappresenta una tecnologia fondamentale per poter studiare un enzima, dal momento che purificare la proteina d'interesse direttamente dal tessuto o dall'organismo indagato risulta

spesso proibitivo, sia eticamente che economicamente, ma soprattutto dal punto di vista pratico, essendo spesso gli enzimi espressi in basse quantità.

L'espressione della tirosinasi umana in forma ricombinante ha permesso di ottenere nuove informazioni riguardo alla sua natura, soprattutto in termini strutturali, che potranno in futuro essere interpretati fisiologicamente o condurre a progettare nuovi inibitori specifici per il trattamento delle iperpigmentazioni o pro-farmaci per il trattamento nei melanomi.

In un diverso contesto, invece, l'enzima studiato con fini pratici per la sintesi chimica, viene dissociato dal contesto fisiologico in cui esercita la sua funzione, e viene considerato come mero catalizzatore. L'enzima perciò acquisisce interesse quando le sue proprietà sono ottimali per la produzione: deve, perciò, essere caratterizzato da alta velocità di catalisi e, se necessario, selettività quasi assoluta. Non di meno l'enzima deve essere in grado di esplicare la propria attività anche in un ambiente molto diverso da quello in cui naturalmente opera.

I due progetti svolti con questo obiettivo sono stati sviluppati rispettivamente con approcci differenti: nel primo progetto, la sintesi dell'intermedio della Moxifloxacina, si adatta il substrato all'enzima, cercando la combinazione ideale per raggiungere lo scopo desiderato, in questo caso, una risoluzione racemica. Non disponendo infatti di ampie librerie enzimatiche, le modifiche strutturali del substrato, qualora possibili, consentono di aumentare il numero di possibili combinazioni enzima-substrato, aumentando la probabilità di ottenere il prodotto desiderato. Nel secondo progetto, per la preparazione del testosterone, si sfruttano invece un'indagine bibliografiche e bioinformatica per individuare gli enzimi opportuni per la trasformazione, ricercando, tra tanti possibili enzimi della stessa categoria, alcuni candidati da utilizzare nella trasformazione di un singolo substrato nell'unico prodotto desiderato. In questo caso l'esperienza acquisita su una categoria enzimatica dalla comunità scientifica, anche in ambito medico, viene trasferita per una applicazione di sintesi industriale.

In entrambi i casi tuttavia, la disponibilità di enzima, anche in forma parzialmente purificata, prodotta in forma ricombinante da noi o fornita da terzi, ha rappresentato uno strumento indispensabile per condurre lo studio. Gli

approcci analitici utilizzati, infine, sono stati tra loro sempre integrati per consentire una completa comprensione delle caratteristiche dell'enzima.

5 Materiali e metodi

5.1 Materiali

I vari substrati sono stati gentilmente forniti da Fabbrica Italiana Sintetici (Alte di Montecchio Maggiore, IT), o acquistati da Sigma-Adrich (Milano, IT).

Gli enzimi sono stati ottenuti da Sigma-Adrich (Milano, IT), BioCatalitycs (Pasadena, CA), o preparati come descritto in letteratura¹²⁶.

5.2 Tecniche di biologia molecolare

I protocolli di clonaggio ed espressione in *E.coli* descritti sono stati effettuati come da manuale⁶⁸, così come in cellule di *Spodoptera fungiperda* Sf9 sono stati effettuati mediante manule di riferimento Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (Invitrogen, www.invitrogen.com).

Clonaggio della 17 β -HSD5 murina in forma nativa

La sequenza di cDNA codificante è stata amplificata mediante PCR utilizzando i seguenti oligonucleotidi: 5'-TCTTCTCAGTTGGTGGGCTG-3' (*a*) che precede l'iniziale atg; 5'-CCTGGGAAGCAATGGAGAAATGC-3' (*b*) per la soppressione silente del sito di restrizione Nco I presente all'interno della sequenza codificante, posto a 452 nucleotidi dall'iniziale atg; il suo inverso 5'-GCATTCTCCATTGCTTCCCAGG-3' (*c*); e il primer T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (*d*). Utilizzando la coppia di *primers a* e *c*, la coppia *b* e *d* e il plasmide pCMVsport6-17 β HSD5 purificato come stampo, sono stati ottenuti due amplificati a loro volta utilizzati come stampo per una successiva amplificazione mediante i *primers a* e *d*. La sequenza intera ottenuta codificante per la 17 β HSD5 contiene un sito di restrizione NcoI in prossimità del codone d'inizio (ccatgg), una mutazione silente (c con a) a 480 nucleotidi dall'atg

iniziale, al fine di eliminare il sito il sito NcoI interno, e un sito NotI che segue la regione codificante, derivato dal *multiple cloning site* del plasmide pCMVsport 6. L'amplificato ottenuto è stato digerito mediante gli enzimi di restrizione NcoI e NotI, così come il plasmide pET28a: quest'ultimo è stato successivamente defosforilato. I prodotti purificati (Figura 2.20) sono stati uniti mediante ligazione che, a reazione avvenuta, è stata utilizzata per trasformare cellule di *E.coli* Inv α *, mediante elettroporazione come da protocollo⁶⁸. Alcune delle cellule piastrate in terreno LB agar kanamicina 50 μ g/ml, e formanti delle colonie visibili, sono state utilizzate per una *full colony* PCR, al fine di identificare quelle contenenti il plasmide contenente la sequenza codificante per la 17 β HSD5, di circa ~1500 pb. Da una colonia positiva è stato estratto il relativo plasmide mediante *mini-prep* e il frammento inserito è stato sequenziato per verificarne la correttezza.

Clonaggio della 17 β -HSD5 murina in forma HT

La sequenza di cDNA è stata amplificata dal plasmide pCMVsport6-17 β HSD5 utilizzando il *primer* mutagenico 5'-GCTGAGAACATATGGATTCTAAG-3' (e), contenente il sito di restrizione NdeI (sottolineato) concomitante all'ATG iniziale, e il *primer* T7-promoter (d), precedentemente descritto. Il frammento ottenuto, digerito con gli enzimi NdeI e NotI è stato ligato al plasmide pET28a digerito con gli stessi enzimi e non defosforilato (Figura 2.21). Il prodotto di ligazione è stato utilizzato per trasformare cellule di *E.coli* Inv α *. Anche in questo caso alcune delle cellule pilastrate in terreno LB agar kanamicina 50 μ g/ml, e formanti delle colonie visibili, sono state utilizzate per una *full colony* PCR, al fine di identificare quelle ricombinanti, contenenti la sequenza codificante per la 17 β HSD5 di circa ~1500 pb (Figura 2.21). Da una colonia positiva è stato estratto il relativo plasmide mediante *mini-prep* e il frammento inserito sequenziato per verificarne la correttezza (BMR Genomics, Padova, Italia).

Clonaggio di YMR226c in forma nativa e HT

Per la forma nativa la sequenza è stata amplificata mediante PCR da estratto genomico di *S. cerevisiae*. Al fine di inserirlo nel plasmide pET28a tra i siti di

restrizione Nde I e Hind III, il frammento è stato amplificato utilizzando degli oligonucleotidi mutagenici, disegnati a partire dalla sequenza genomica di *S. cerevisiae*: 5'-AACGTATTTTGACCATGGCCCAAGG-3' (a) che inserisce il sito NcoI (sottolineato) e 5'-CTTCCGTGGATAAGCTTAGCTAAACTAA-3' (b) che inserisce il sito di restrizione Hind III (sottolineato) abolendo il codone di stop. Così amplificata, la sequenza, è stata sequenziata per verificare l'assenza di mutazioni indesiderate e il corretto inserimento dei siti di restrizione (BMR Genomics, Padova, Italia). Di seguito, digerita con gli enzimi Nco I e Hind III, la sequenza è stata ligata al plasmide pET28a digerito con gli stessi enzimi e defosforilato. Tra le cellule cresciute dopo la trasformazione con la ligazione e formanti delle colonie visibili, alcune sono state utilizzate per una *full colony* PCR, al fine di identificare quelle contenenti il plasmide contenente la sequenza di interesse, di circa ~900 pb (Figura 2.22). Da una colonia positiva è stato estratto il relativo plasmide mediante *mini-prep* e il frammento inserito è stato sequenziato. Una procedura analoga è stata utilizzata per il clonaggio della sequenza al fine dell'espressione della forma HT, utilizzando i *primers* mutagenici a, già descritto, e 5'-CATATCTTCCGTGGAAAGCTTCTAGCTAAACTA-3' (c), che sopprime il nativo codone di stop finale, inserisce una base per portare in frame la sequenza successiva e inserisce un sito di restrizione Hind III.

Clonaggio della tirosinasi umana

La strategia di clonaggio della tirosinasi nella sua forma intera è stata effettuata come di seguito descritta: (i) la sequenza dal vettore pCDNA3 è stata tagliata mediante restrizione con l'enzima EcoRI; (ii) successivamente il frammento d'interesse è stato estratto e purificato mediante gel d'agarosio; (iii) parallelamente il vettore pFastBac® è stato digerito con EcoRI e defosforilazione; (iv) il frammento purificato da gel d'agarosio è stato ligato con il vettore pFastBac aperto; (v) cellule competenti *invA*^F *E.coli* sono state trasformate con il prodotto della ligazione e (vi) piastate in piaste LB con antibiotico ampicillina. (vii) Al fine di identificare quali, tra le colonie ottenute, avessero la sequenza della tirosinasi inserita nel corretto orientamento (a causa del clonaggio mediante siti di restrizioni identici EcoRI) una serie di colonie sono state casualmente scelte e

utilizzate per purificare i relativi plasmidi (mediante mini prep). I plasmidi ottenuti sono stati poi individualmente digeriti con BamHI (che precede EcoRI nel vettore pFastBac®, Figura 3.16) e NcoI: dal momento che la sequenza genetica della tirosinasi umana contiene al suo interno un sito di restrizione unico NcoI, se la sequenza è stata correttamente inserita ci si attende, da questa doppia digestione, un frammento di ~1090 nucleotidi, altrimenti uno di ~900 nucleotidi (Figura 3.17).

Tra le colonie analizzate, una colonia positiva è stata selezionata per essere sequenziata e verificare l'assenza di mutazioni indesiderate. Per sequenziare l'intero frammento codificante per la tirosinasi sono stati scelti ed utilizzati tre oligonucleotidi che hanno consentito di ottenere l'intera sequenza mediante opportune sovrapposizioni tra le regioni ottenute da ciascun primer. Gli oligonucleotidi utilizzati sono di seguito riportati (vedi anche Figura 3.17 e Figura 3.18).

Nome	Sequenza nucleotidica
Tyr01Rev	TCCTCCAATCGGCTACAGAC
Tyr02Fow	ATTGATTTTGCCCATGAAGC
3TyrFow	TCCACTTACTGGGATAGCGG

Per il clonaggio del dominio luminale (22-474 aa) è stata adottata una strategia diversa. Partendo dalla sequenza del dominio inserita nel plasmide pCR2.1, (i) questa è stata tagliata usando gli enzimi di restrizione EcoRI e XbaI; (ii) il frammento è stato separato dal plasmide mediante gel d'agarosio e da questo estratto e purificato; (iii) parallelamente il vettore pFastBac® è stato digerito con gli stessi enzimi EcoRI e XbaI e defosforilato; (iv) il frammento purificato è stato legato con il vettore pFastBac aperto e (v) il prodotto della ligazione utilizzato per trasformare cellule competenti invαF' *E.coli*, successivamente (vi) piastrate su LB con ampicillina.

In questo caso, le colonie ottenute, sono state sottoposte a PCR da colonia utilizzando i primer Tyr02Fow e Tyr02Rew, in modo da identificare quali delle colonie contenessero il plasmide con il frammento di interesse correttamente inserito. Anche in questo caso, tra le colonie risultate positive allo *screening*, una

è stata scelta per essere sequenziata e verificare l'assenza di mutazioni eventualmente introdotte.

5.3 Metodologie biochimiche

SodioDodecilSolfato PoliAcrilammide Gel Elettroforesi (SDS-PAGE)

Le proteine sono state separate elettroforeticamente su gel denaturanti o non di poliacrilamide. Acrilammide e bisacrilammide vengono fatti reagire con ammonio persolfato in presenza di TEMED (tetrametiletilendiammina). L'elettroforesi avviene in presenza di un riducente dei legami disolfuro (DTT) e di un agente denaturante delle proteine (SDS). Il gel di separazione (running gel) ha una composizione finale compresa tra l'8% e il 12% di acrilamide (secondo il caso) - 0,38 M Tris-HCl pH 8.8 - 0,1% SDS - 0,1% APS - 0,008% TEMED. Il gel spaziatore (stacking gel) ha una composizione finale del 5% acrilamide - 0,125 M Tris-HCl pH 6.8 - 0,1% SDS - 0,1% APS - 0,1% TEMED. Il tampone di corsa è composto da 25 mM Tris - 250 mM glicina - 0,1% SDS pH 8.3. Il tampone per il caricamento dei campioni è composto da 50 mM Tris-HCl pH 6.8 - 100 mM DTT - 2% SDS - 0,1% Blu di Bromofenolo - 10% glicerolo. Lo standard di pesi molecolari usato è il Low Molecular Weight-SDS Marker (LMW) fornito dalla Amersham Bioscience. L'elettroforesi viene condotta applicando una differenza di potenziale di 100-150V, in funzione della percentuale di acrilamide. Si utilizza l'apparecchiatura Hoefer fornita dalla ditta Amersham Bioscience per minigel (10 x 10.5 x 0.75). La colorazione dei gel viene effettuata con Coomassie Brilliant Blue. Al termine della corsa elettroforetica il gel viene immerso per 1 ora, in agitazione, in una soluzione colorante (0.25% w/v Coomassie Brilliant Blue R 250 SIGMA - 50% etanolo - 10% acido acetico). Viene quindi decolorato per un'ora, in agitazione, immerso in una soluzione acquosa 10% acido acetico e 45% etanolo. Successivamente viene conservato in una soluzione acquosa al 10% di acido acetico. Modifiche nella preparazione del gel, nel caso di gel nativi o colorazione mediante argento, sono state tratte da manuale⁶⁸.

Western blotting

Il trasferimento delle proteine da gel alla membrana di PVDF (blot) è condotto a 4°C, *overnight*, a 35 Volt in *Transfer buffer* (48 mM Tris, 39 mM glicina, 20% metanolo 0.037 % SDS). Dopo un breve lavaggio in TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20), la membrana è incubata in una soluzione di latte in polvere allo 5% in TBS-T per 40 min circa.

La fase di *binding* con l'anticorpo primario è realizzata incubando la membrana in una soluzione diluita di anticorpo a temperatura ambiente per 1h.

Il blot viene lavato 4-5 volte in TBS-T e quindi immerso in una soluzione diluita di anticorpo secondario opportuno, immunoglobuline di coniglio o di topo coniugate alla perossidasi in diluizione variabile in base al tipo di anticorpo secondario, per 1 ora temperatura ambiente.

La membrana infine è lavata in TBS-T e sviluppata con il sistema di chemiluminescenza al luminolo (*Enhanced Chemiluminescence system, Amersham*). Il luminolo viene ossidato specificatamente dal dominio perossidasi coniugato all'anticorpo secondario, ed emette luce in corrispondenza della banda in cui è localizzato il complesso antigene-anticorpo.

L'impressione della lastra fotografica è realizzata in camera oscura, nella cassetta *Kodak X-Omatic*: il tempo di esposizione varia da pochi secondi a 45 min, in dipendenza della quantità di proteina da rilevare. La lastra viene sviluppata in soluzione *Kodak GBX Developer*, risciacquata in acqua, e quindi fissata nella soluzione *Kodak GBX Fixer*.

Cromatografie

Per le cromatografie utilizzate sono state seguite le procedure standard indicate per le rispettive resine DEAE Sepharose (Pharmacia Biosciences) e IMAC (Sigma).

5.4 Metodologie spettroscopiche

Determinazione delle unità enzimatiche

La velocità dell'enzima viene misurata monitorando costantemente la formazione di un prodotto o la scomparsa di un substrato mediante analisi spettrofotometrica (Agilent 8453 UV-visible spectroscopy system) di reazioni effettuate in cuvette da 0.1-1 ml in quarzo, cammino ottico 1 cm. Per poter monitorare simultaneamente l'andamento delle reazioni multiple sono state analizzate mediante piastre da 96 pozzetti, con l'utilizzo di uno specifico spettrofotometro, lo SpectraMax 190 (Molecula Devices).

L'unità di attività enzimatica si definisce come la quantità di enzima in grado di catalizzare la formazione di 1 μ mole di prodotto al minuto, cosicché la quantità di enzima presente in una soluzione viene calcolata dalla formula:

$$\text{attività (U/ml)} = [(\Delta A / (\epsilon_x b)) / \Delta T] d V$$

Dove

- U indica le unità di attività enzimatica
- d il fattore di diluizione dell'enzima
- V il volume di reazione
- ϵ_x coefficiente di estinzione molare della specie osservata a lunghezza d'onda x
- b cammino ottico
- ΔA variazione di assorbanza rilevato nel tempo ΔT .

I valori di ϵ utilizzati, che variano in base al tipo di reazioni monitorata, sono indicata nel testo o in pubblicazioni riportate¹²⁸.

Determinazione delle costanti cinetiche

Tutti i grafici che compaiono in questo lavoro sono stati realizzati utilizzando software OriginPro 7.0. Per fittare i dati secondo l'equazione di Michaelis Menten, è stata utilizzata la funzione di Hill. La procedura è stata descritta su tesi¹²⁹.

Spettroscopia NMR

Lo strumento utilizzato per le analisi NMR è un *bruker avance DRX 600 Mh*, utilizzando il *software XWIN-NMR*.

Negli esperimenti le concentrazioni dei diversi composti sono indicati nel testo. Ad ogni campione è stato aggiunto acqua deuterata al 10% v/v per un volume finale di 0.6 ml, caricati in tubi da 5 mm di diametro.

Altre strumentazioni utilizzate

Le analisi HPLC sono state condotte mediante lo strumento Agilent 1100 Series, equipaggiato con rilevatore diodi array tra 190 e 950 nm. I campioni sono stati caricati in colonna Zorbax Eclipse XDB-C18 e fluiti ad 1ml/min con fase mobile costituita da acqua:acetonitrile, con diversi gradienti in base alle specie analizzate. Le analisi con colonna cinale e le analisi HPLC-MS sono state condotte con l'apposita strumentazione presso la Fabbrica Italiana Sintetici (Alte di Montecchio Maggiore, Italia).

Bibliografia

- (1) Motterle, R.; Castellin, A.; Galvagni, M.; Arvotti, G.; Bergantino, E.; Fogal, S. Italy Patent MI2009A000332, 2009.
- (2) Hara, A.; Nakayama, T.; Nakagama, M.; Inoue, Y.; Tanabe, H.; Sawada, H. *J. Biochem.* **1987**, *102*, 1585.
- (3) Deyashiki, Y.; Ohshima, K.; Nakanishi, M.; Sato, K.; Matsuura, K.; Hara, A. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 10461.
- (4) Yang, Y.; Zhu, D.; Piegat, T. J.; Hua, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1799-1803.
- (5) Fogal, S.; Bergantino, E.; Motterle, R.; Castellin, A.; Arvotti, G. Italy Patent, MI2009A00168, 2009.
- (6) Matoba, Y.; Kumagai, T.; Yamamoto, A.; Yoshitsu, H.; Sugiyama, M. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8981-8990.
- (7) Nightingale, C. H. *Pharmacotherapy* **2000**, *20*, 245-256.
- (8) Keating, G. M.; Scott, L. J. *Drugs* **2004**, *64*, 2347-2377.
- (9) Raza, S.; Fransson, L.; Hult, K. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* **2001**, *10*, 329.
- (10) Schulze, B.; Wubbolts, M. G. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 609-615.
- (11) Faber, K. In *Biotransformations in organic chemistry*; Springer-Verlag: Berlin, 2004; , pp 454.
- (12) Liese, A.; Villela Filho, M. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 595-603.
- (13) Ng-Youn-Chen, M. C.; Serreqi, A. N.; Huang, Q.; Kazlauskas, R. J. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2075-2081.
- (14) Couty, F. *Amino Acids* **1999**, *16*, 297-320.
- (15) Danieli, B.; Lesma, G.; Passarella, D.; Silvani, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 345-348.
- (16) Toone, E. J.; Werth, M. J.; Jones, J. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4946-4952.
- (17) Toone, E. J.; Jones, J. B. *Canadian Journal of Chemistry* **1987**, *65*, 2722-2726.

- (18) Sabbioni, G.; Jones, J. B. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4565-4570.
- (19) Jones, J. B. *Pure Appl. Chem.* **1990**, *62*, 1445-1448.
- (20) Gais, H. J.; Buelow, G.; Zatorski, A.; Jentsch, M.; Maidonis, P.; Hemmerle, H. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5115-5122.
- (21) Liljeblad, A.; Lindborg, J.; Kanerva, A.; Katajisto, J.; Kanerva, L. T. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2471-2474.
- (22) Iding, H.; Wirz, B.; Rodríguez Sarmiento, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1541-1545.
- (23) Fournand, D.; Arnaud, A. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *91*, 381-393.
- (24) Eichhorn, E.; Roduit, J. P.; Shaw, N.; Heinzmann, K.; Kiener, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2533-2536.
- (25) Komeda, H.; Harada, H.; Washika, S.; Sakamoto, T.; Ueda, M.; Asano, Y. *European Journal of Biochemistry* **2004**, *271*, 1580-1590.
- (26) Komeda, H.; Harada, H.; Washika, S.; Sakamoto, T.; Ueda, M.; Asano, Y. *European Journal of Biochemistry* **2004**, *271*, 1465-1475.
- (27) Miyazawa, T. *Amino Acids* **1999**, *16*, 191-213.
- (28) Sedlaczek, L.; Smith, L. L. *Crit. Rev. Biotechnol.* **1988**, *7*, 187-236.
- (29) Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature* **2001**, *409*, 258.
- (30) Fernandes, P.; Cruz, A.; Angelova, B.; Pinheiro, H. M.; Cabral, J. M. S. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *32*, 688-705.
- (31) Handelsman, D. J. *Med. J. Aust.* **2006**, *185*, 436.
- (32) Andryushina, V. A.; Morozova, L. S.; Grinenko, G. S. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **1987**, *21*, 883-884.
- (33) Lo, C.; Pan, C.; Liu, W. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **2002**, *28*, 280-283.
- (34) Liu, W. H.; Lo, C. K. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **1997**, *19*, 269-272.
- (35) Weber, A.; Kennekke, M.; Klages, U.; Nickisch, K.; Rohde, R. , 1995.
- (36) Weber, A.; Kennekke, M.; Klages, U.; Nickisch, K.; Rohde, R. , 1995.

- (37) Singer, Y.; Shity, H.; Bar, R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, *35*, 731-737.
- (38) Xiong, Z.; Wei, Q.; Chen, H.; Chen, S.; Xu, W.; Qiu, G.; Liang, S.; Hu, X. *Steroids* **2006**, *71*, 979-983.
- (39) Cremonesi, P.; Carrea, G.; Sportoletti, G.; Antonini, E. *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, *159*, 7-10.
- (40) Schoemaker, H. E.; Mink, D.; Wubbolts, M. G. *Science* **2003**, *299*, 1694.
- (41) Tao, J.; Xu, J. H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 43-50.
- (42) Matsuda, T.; Yamanaka, R.; Nakamura, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**.
- (43) Kroutil, W.; Mang, H.; Edegger, K.; Faber, K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 120-126.
- (44) Donova, M. V.; Egorova, O. V.; Nikolayeva, V. M. *Process Biochemistry* **2005**, *40*, 2253-2262.
- (45) Payne, D. W.; Talalay, P. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 13648.
- (46) Kristan, K.; Rižner, T. L.; Stojan, J.; Gerber, J. K.; Kremmer, E.; Adamski, J. *Chem. Biol. Interact.* **2003**, *143*, 493-501.
- (47) Kristan, K.; Stojan, J.; Adamski, J.; Lanišnik Rižner, T. *J. Biotechnol.* **2007**, *129*, 123-130.
- (48) Zorko, M.; Gottlieb, H. E.; Žakelj-Mavrič, M. *Steroids* **2000**, *65*, 46-53.
- (49) Rižner, T. L.; Žakelj-Mavrič, M.; Plemenitaš, A.; Zorko, M. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1996**, *59*, 205-214.
- (50) Rizner, T. L.; Moeller, G.; Thole, H. H.; Zakelj-Mavric, M.; Adamski, J. *Biochem. J.* **1999**, *337*, 425-431.
- (51) Benach, J.; Filling, C.; Oppermann, U. C. T.; Roversi, P.; Bricogne, G.; Berndt, K. D.; Jornvall, H.; Ladenstein, R. *Biochemistry (N. Y.)* **2002**, *41*, 14659-14668.
- (52) Mindnich, R.; Möller, G.; Adamski, J. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2004**, *218*, 7-20.
- (53) Wu, L.; Einstein, M.; Geissler, W. M.; Chan, H. K.; Elliston, K. O.; Andersson, S. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 12964.
- (54) Geissler, W. M.; Davis, D. L.; Wu, L.; Bradshaw, K. D.; Patel, S.; Mendonca, B. B.; Elliston, K. O.; Wilson, J. D.; Russell, D. W.; Andersson, S. *Nat. Genet.* **1994**, *7*, 34-39.

- (55) Qiu, W.; Zhou, M.; Labrie, F.; Lin, S. X. *Molecular Endocrinology* **2004**, *18*, 1798-1807.
- (56) Lin, S. X.; Shi, R.; Qiu, W.; Azzi, A.; Zhu, D. W.; Dabbagh, H. A.; Zhou, M. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2006**, *248*, 38-46.
- (57) Dufort, I.; Rheault, P.; Huang, X. F.; Soucy, P.; Luu-The, V. *Endocrinology* **1999**, *140*, 568-574.
- (58) Rheault, P.; Charbonneau, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1447*, 17-24.
- (59) Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673.
- (60) Rižner, T. L.; Adamski, J.; Žakelj-Mavrič, M. *Steroids* **2001**, *66*, 49-54.
- (61) Han, G.; Gable, K.; Kohlwein, S. D.; Beaudoin, F.; Napier, J. A.; Dunn, T. *M. J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 35440.
- (62) Beaudoin, F.; Gable, K.; Sayanova, O.; Dunn, T.; Napier, J. A. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 11481-11488.
- (63) Katz, M.; Hahn-Hägerdal, B.; Gorwa-Grauslund, M. F. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 163-172.
- (64) Katz, M.; Frejd, T.; Hahn-Hägerdal, B.; Gorwa-Grauslund, M. F. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *84*, 573-582.
- (65) Fujisawa, H.; Nagata, S.; Misono, H. *BBA-Proteins and Proteomics* **2003**, *1645*, 89-94.
- (66) Friberg, A.; Johanson, T.; Franzén, J.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Frejd, T. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *4*, 2304-2312.
- (67) Carlquist, M.; Wallentin, C. J.; Wärnmark, K.; Gorwa-Grauslund, M. F. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2293-2295.
- (68) J. Sambrook, D. W. R. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2001; , pp 2344.
- (69) Spritz, R. A.; Hearing, V. J., Jr *Adv. Hum. Genet.* **1994**, *22*, 1-45.
- (70) Ito, S.; Wakamatsu, K. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84*, 582-592.
- (71) Simon, J. D.; Peles, D.; Wakamatsu, K.; Ito, S. *Pigment Cell. Melanoma Res.* **2009**, *22*, 563-579.
- (72) Korner, A.; Pawelek, J. *Science* **1982**, *217*, 1163-1165.

- (73) Lerner, A. B.; Fitzpatrick, T. B.; Calkins, E.; Summerson, W. H. *J. Biol. Chem.* **1949**, *178*, 185-195.
- (74) Chen, P.; Solomon, E. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 13105-13110.
- (75) Tepper, A. W. J. W. *PhD thesis* **2005**.
- (76) Hazes, B.; Kalk, K. H.; Hol, W. I. M. G. J.; Magnus, K. A.; Bonaventura, C.; Bonaventura, J.; Dauter, Z. *Protein Science* **1993**, *2*.
- (77) Cuff, M. E.; Miller, K. I.; van Holde, K. E.; Hendrickson, W. A. *J. Mol. Biol.* **1998**, *278*, 855-870.
- (78) Ray, K.; Chaki, M.; Sengupta, M. *Prog. Retin. Eye Res.* **2007**, *26*, 323-358.
- (79) Rosenzweig, A. C.; Sazinsky, M. H. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 729-735.
- (80) Sánchez-Ferrer, Á.; Neptuno Rodríguez-López, J.; García-Cánovas, F.; García-Carmona, F. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology* **1995**, *1247*, 1-11.
- (81) Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; Machonkin, T. E. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2563-2606.
- (82) Wilcox, D. E.; Porras, A. G.; Hwang, Y. T.; Lerch, K.; Winkler, M. E.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4015-4027.
- (83) Salvato, B.; Santamaria, M.; Beltramini, M.; Alzuet, G.; Casella, L. *Biochemistry (N. Y.)* **1998**, *37*, 14065-14077.
- (84) Asimov, I.; Dawson, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 820-828.
- (85) Haghbeen, K.; Saboury, A. A.; Karbassi, F. *BBA-General Subjects* **2004**, *1675*, 139-146.
- (86) Garcia-Molina, F.; Hiner, A. N. P.; Fenoll, L. G.; Rodriguez-Lopez, J. N.; Garcia-Ruiz, P. A.; Garcia-Canovas, F.; Tudela, J. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3702-3709.
- (87) Tudela, J.; Garcia-Canovas, F.; Varon, R.; Jimenez, M.; Garcia-Carmona, F.; Lozano, J. A. *J. Enzyme Inhib.* **1987**, *2*, 47-56.
- (88) Land, E. J.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A. *Tohoku J. Exp. Med.* **2007**, *212*, 341-348.
- (89) Land, E. J.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A.; Stratford, M. R. *Tohoku J. Exp. Med.* **2008**, *216*, 231-238.

- (90) Ramsden, C. A.; Stratford, M. R.; Riley, P. A. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3388-3390.
- (91) Greggio, E.; Bergantino, E.; Carter, D.; Ahmad, R.; Costin, G. E.; Hearing, V. J.; Clarimon, J.; Singleton, A.; Eerola, J.; Hellstrom, O.; Tienari, P. J.; Miller, D. W.; Beilina, A.; Bubacco, L.; Cookson, M. R. *J. Neurochem.* **2005**, *93*, 246-256.
- (92) Wang, N.; Hebert, D. N. *Pigment Cell Res.* **2006**, *19*, 3-18.
- (93) Garcia-Borron, J. C.; Solano, F. *Pigment Cell Res.* **2002**, *15*, 162-173.
- (94) Schweikardt, T.; Olivares, C.; Solano, F.; Jaenicke, E.; Garcia-Borron, J. C.; Decker, H. *Pigment Cell Res.* **2007**, *20*, 394-401.
- (95) van Gastel, M.; Bubacco, L.; Groenen, E. J. J.; Vijgenboom, E.; Canters, G. W. *FEBS Lett.* **2000**, *474*, 228-232.
- (96) Bubacco, L.; Van Gastel, M.; Groenen, E. J.; Vijgenboom, E.; Canters, G. W. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 7381-7389.
- (97) Bubacco, L.; Spinazze, R.; della Longa, S.; Benfatto, M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *465*, 320-327.
- (98) Tepper, A. W. J. W.; Bubacco, L.; Canters, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 567-575.
- (99) Popescu, C. I.; Mares, A.; Zdrentu, L.; Zitzmann, N.; Dwek, R. A.; Petrescu, S. M. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 21682-21689.
- (100) Briganti, S.; Camera, E.; Picardo, M. *Pigment Cell Res.* **2003**, *16*, 101-110.
- (101) Chang, T. S. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 2440-2475.
- (102) Solano, F.; Briganti, S.; Picardo, M.; Ghanem, G. *Pigment Cell Res.* **2006**, *19*, 550-571.
- (103) Branza-Nichita, N.; Negroiu, G.; Petrescu, A. J.; Garman, E. F.; Platt, F. M.; Wormald, M. R.; Dwek, R. A.; Petrescu, S. M. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8169-8175.
- (104) Petrescu, S. M.; Branza-Nichita, N.; Negroiu, G.; Petrescu, A. J.; Dwek, R. A. *Biochemistry* **2000**, *39*, 5229-5237.
- (105) Branza-Nichita, N.; Petrescu, A. J.; Dwek, R. A.; Wormald, M. R.; Platt, F. M.; Petrescu, S. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *261*, 720-725.
- (106) Petrescu, S. M.; Petrescu, A. J.; Titu, H. N.; Dwek, R. A.; Platt, F. M. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 15796-15803.

- (107) Kost, T. A.; Condreay, J. P.; Jarvis, D. L. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 567-575.
- (108) Greggio, E. Human tyrosinase, a key enzyme in melanin biosynthesis with a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease. 2004.
- (109) Ortega, C. K. Functional properties of an unusual isoform of the plasma membrane calcium ATPase: PMCA 2, Università degli studi di Padova, 2008.
- (110) Willers, J.; Lucchese, A.; Mittelman, A.; Dummer, R.; Kanduc, D. *Exp. Dermatol.* **2005**, *14*, 543-550.
- (111) Toyofuku, K.; Wada, I.; Spritz, R. A.; Hearing, V. J. *Biochem. J.* **2001**, *355*, 259.
- (112) Nishioka, K. *Eur. J. Biochem.* **1978**, *85*, 137-146.
- (113) Vijayan, E.; Husain, I.; Ramaiah, A.; Madan, N. C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, *217*, 738-747.
- (114) Wittbjer, A.; Dahlback, B.; Odh, G.; Rosengren, A. M.; Rosengren, E.; Rorsman, H. *Acta Derm. Venereol.* **1989**, *69*, 125-131.
- (115) Wittbjer, A.; Odh, G.; Rosengren, A. M.; Rosengren, E.; Rorsman, H. *Acta Derm. Venereol.* **1990**, *70*, 291-294.
- (116) Yurkow, E. J.; Laskin, J. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *275*, 122-129.
- (117) Wood, J. M.; Schallreuter, K. U. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1074*, 378-385.
- (118) Hearing, V. J., Jr *Methods Enzymol.* **1987**, *142*, 154-165.
- (119) Jimenez-Cervantes, C.; García-Borrón, J. C.; Lozano, J. A.; Solano, F. *BBA-General Subjects* **1995**, *1243*, 421-430.
- (120) Olivares, C.; Garcia-Borrón, J. C.; Solano, F. *Biochemistry* **2002**, *41*, 679-686.
- (121) Pomerantz, S. H. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 161-168.
- (122) Wittbjer, A.; Odh, G.; Rosengren, A. M.; Rosengren, E.; Rorsman, H. *Acta Derm. Venereol.* **1990**, *70*, 291-294.
- (123) Chen, Y. M. *Cancer Res.* **1974**, *34*, 3192.
- (124) Provencher, L.; Jones, J. B. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2729-2732.

- (125) Klabunde, T.; Eicken, C.; Sacchettini, J. C.; Krebs, B. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 1084-1090.
- (126) Bubacco, L.; Vijgenboom, E.; Gobin, C.; Tepper, A. W. J. W.; Salgado, J.; Canters, G. W. *Journal of Molecular Catalysis.B, Enzymatic* **2000**, *8*, 27-35.
- (127) Lerch, K.; Ettliger, L. *European Journal of Biochemistry* **1972**, *31*, 427-437.
- (128) Espin, J. C.; Varon, R.; Fenoll, L. G.; Gilabert, M. A.; Garcia-Ruiz, P. A.; Tudela, J.; Garcia-Canovas, F. *European Journal of Biochemistry* **2000**, *267*, 1270-1279.
- (129) Lanciai, F. *Tirosinasi umana ricombinante: caratterizzazione della selettività verso substrati ed inibitori*, Università degli studi di Padova, 2009.

Ringraziamenti

Ringrazio le seguenti persone per il concreto contributo dato alla realizzazione dei progetti discussi:

- * La Dott.ssa Elisabetta Bergantino e i componenti del suo laboratorio, in particolare Federico Lanciai ed in generale tutti i componenti del gruppo del Prof. G.Giacometti.
- * La Fabbrica Italiana Sintetici e in particolare Riccardo Motterle, Andrea Castellin, Giancarlo Arvotti, Chiara Bezze, Marco Galvagni, Siro Serafini, ed Alessando Leganza.
- * Il Prof. Luigi Bubacco e i componenti del suo laboratorio, in particolare Isabella Tessari e Marco Bisaglia.
- * La Dott. Claudia Karina Ortega.

Ringrazio, inoltre, per aver messo a disposizione apposita strumentazione e supporto tecnico:

- * Prof. S. Mammi e I. Menegazzo
- * Prof. P. Zatta
- * Prof. M. Beltramini