

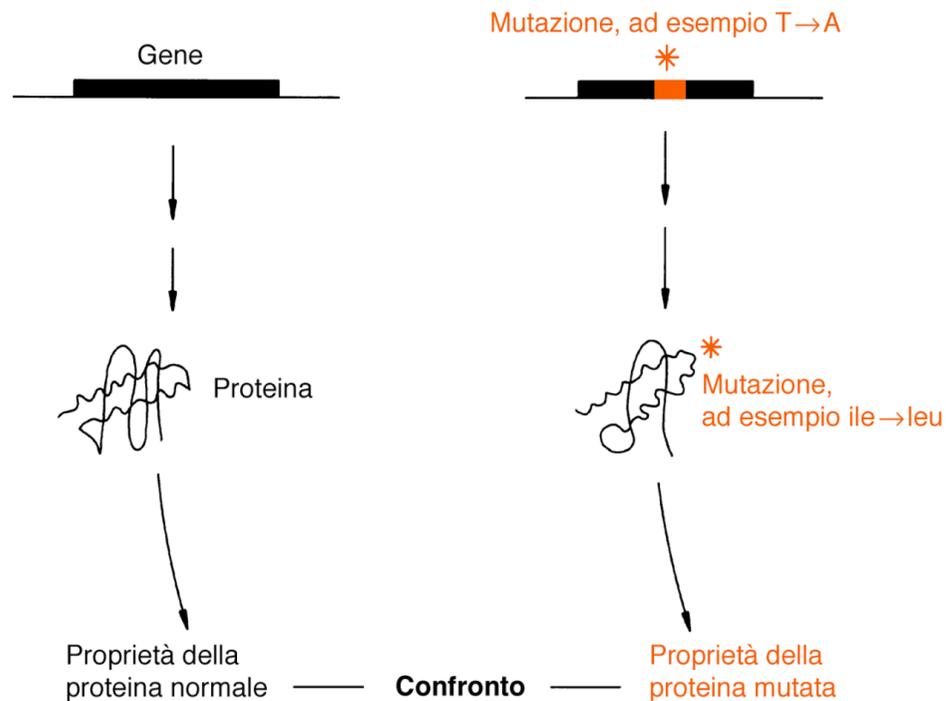
Mutagenesi

- La mutagenesi comprende un insieme di tecniche con l'obiettivo specifico di modificare una sequenza di DNA
- Le mutagenesi possono essere
 - Specifiche o generali;
 - Random o targeted.
- Numerosi metodi per numerose esigenze
 - mutagenesi **in vitro**

Mutagenesi

1. Cambiare o **migliorare** la funzione di un prodotto genico
2. La generazione e la caratterizzazione di mutanti è una componente essenziale nello **studio fra la relazione tra funzione e struttura**, sia che si tratti della struttura 3D di una proteina, di una regione regolativa del DNA o della funzione di un gene.

Confronto delle proprietà del prodotto proteico a seguito del cambiamento indotto dalla mutazione.



Mutagenesi prima del 1980

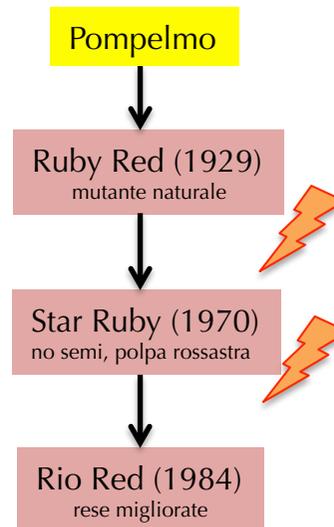
- Trattamento di cellule o organismi interi con agenti mutageni chimici (Iprite) o fisici (raggi-X, raggi- γ)



Campo Gamma



Star Ruby



Il grano Creso contiene una più elevata quantità di glutine rispetto al grano Cappelli del quale è appunto una mutazione genetica. (1974)

- più bassa
- più resistente
- rese maggiori del Cappelli.

Limiti:

1. Ogni gene nell'organismo può essere mutato e la frequenza dei cambiamenti nel gene d'interesse può essere bassa → importante buona strategia di selezione
2. Anche quando il fenotipo d'interesse viene osservato, non è detto che la mutazione sia sul gene d'interesse
3. Mancanza di tecniche (es. sequenziamento) per verificare dove nel gene sia avvenuta la mutazione e quale sia la sua natura (missenso, nonsense, ecc)

International Atomic Energy Agency | Atoms for Peace and Development

Binamoog-9

Pages: 219 | Records: 3,283

2018-11-19

Variety Name	Latin Name	Common Name	Country	Registration ↓
Binadhan-19	Oryza sativa L.	Rice	Bangladesh	2017
NIAB Kinnow	Citrus reticulata Blanco	Mandarin	Pakistan	2017
Binamasur-11	Lens culinaris Medik.	Lentil	Bangladesh	2017
Binamoog-9	Vigna radiata (L.) Wil.	Mungbean	Bangladesh	2017

Pages: 218 | Records: 3,264

Variety Name	Latin Name	Common Name	Country	Registration ↑
Binasola-10	Cicer arietinum L.	Chickpea	Bangladesh	2016
Binagom-1	Triticum aestivum L.	Wheat	Bangladesh	2016
NAHITA	Solanum tuberosum L.	Potato	Turkey	2016
Binadhan-19	Oryza sativa L.	Rice	Bangladesh	2017
NIAB Kinnow	Citrus reticulata Blanco	Mandarin	Pakistan	2017
Binamasur-11	Lens culinaris Medik.	Lentil	Bangladesh	2017
Binamoog-9	Vigna radiata (L.) Wil.	Mungbean	Bangladesh	2017

- Bananas and plantains
- Berries
- Cereals
- Citrus fruit
- Decorative trees
- Edible oil plants
- Fibre crop
- Flowers
- Fodder
- Food vegetables
- Forage
- Fruits vegetables
- Grapevine
- Grasses
- Legume and Pulses
- Medicinal plants
- Melons
- Nuts
- Ornamental bushes
- Ornamental plant
- Root and tuber crops
- Sugar crop
- Tobacco
- Tree fruit

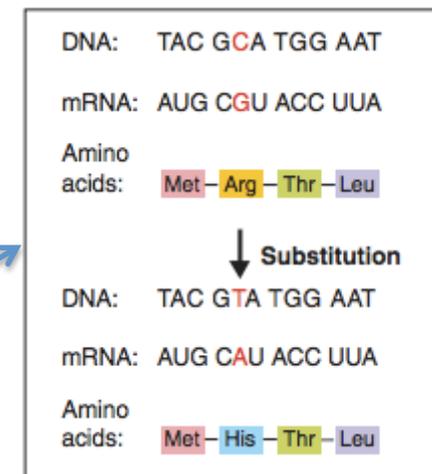
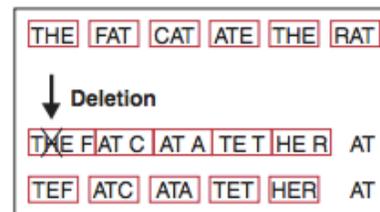
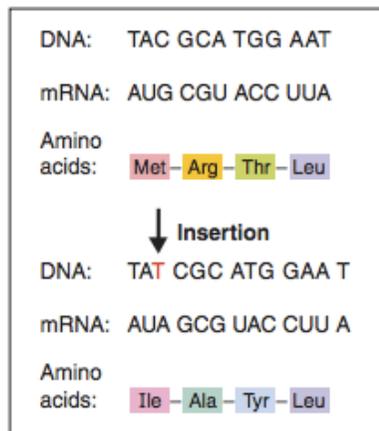
Mutagenesi in vitro

Alcune delle domande fondamentali cui la biologia molecolare moderna vuole dare risposta sono incentrate sulle **relazioni** tra la **struttura** e la **funzione** di una proteina. Il modo più efficace di affrontare questa problematica è introdurre una mutazione nel gene che codifica per la proteina e individuarne l'effetto conseguente sulle proprietà del prodotto genico.

- **SITO-SPECIFICA:** Alterazione specifica di una singola base o di una corta sequenza di basi all'interno della sequenza di DNA
- **RANDOM:** Introduzione di alterazioni non note in siti non noti di una sequenza di DNA → librerie di varianti per “evolvere geni in vitro”

Mutagenesi in vitro

- **Inserzione o delezione di una o più basi** → se non è multipla di 3 determina uno scivolamento del modulo di lettura (frame-shift).

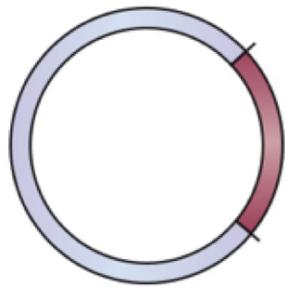


- **Sostituzioni di singole basi:**
 - **Silente:** la sostituzione non modifica l'aa codificato (TCG → TCC, codificano per Serina);
 - **Missenso:** la sostituzione modifica l'aa codificato (TCG → ACC, Serina → treonina);
 - **Nonsense:** la sostituzione modifica un codone per un aa in codone di stop (TCG → TAG, Serina → stop)

MUTAGENESI SITO-SPECIFICA

1) Metodi basati su ER

Inserzioni o delezioni possono essere prodotte sfruttando la presenza di siti di restrizione

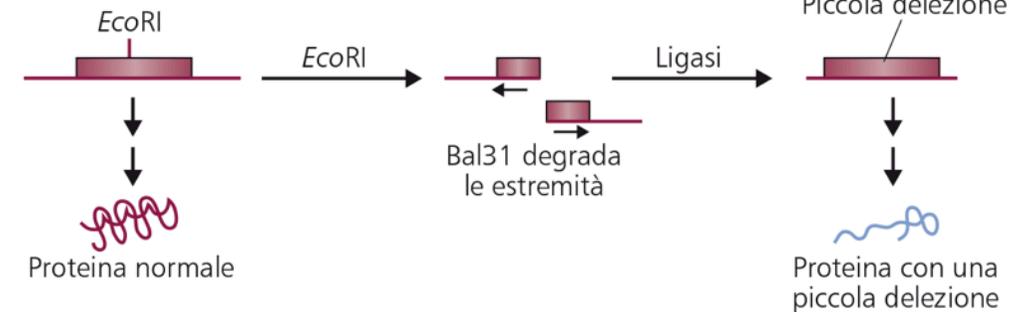


Molecola di DNA ricombinante

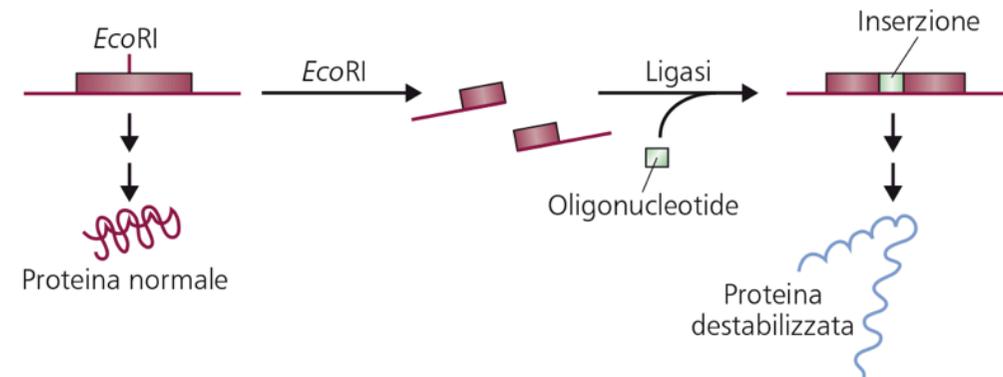
(a) Delezione di un frammento di restrizione



(b) Rimozione di nucleotidi a un sito di restrizione

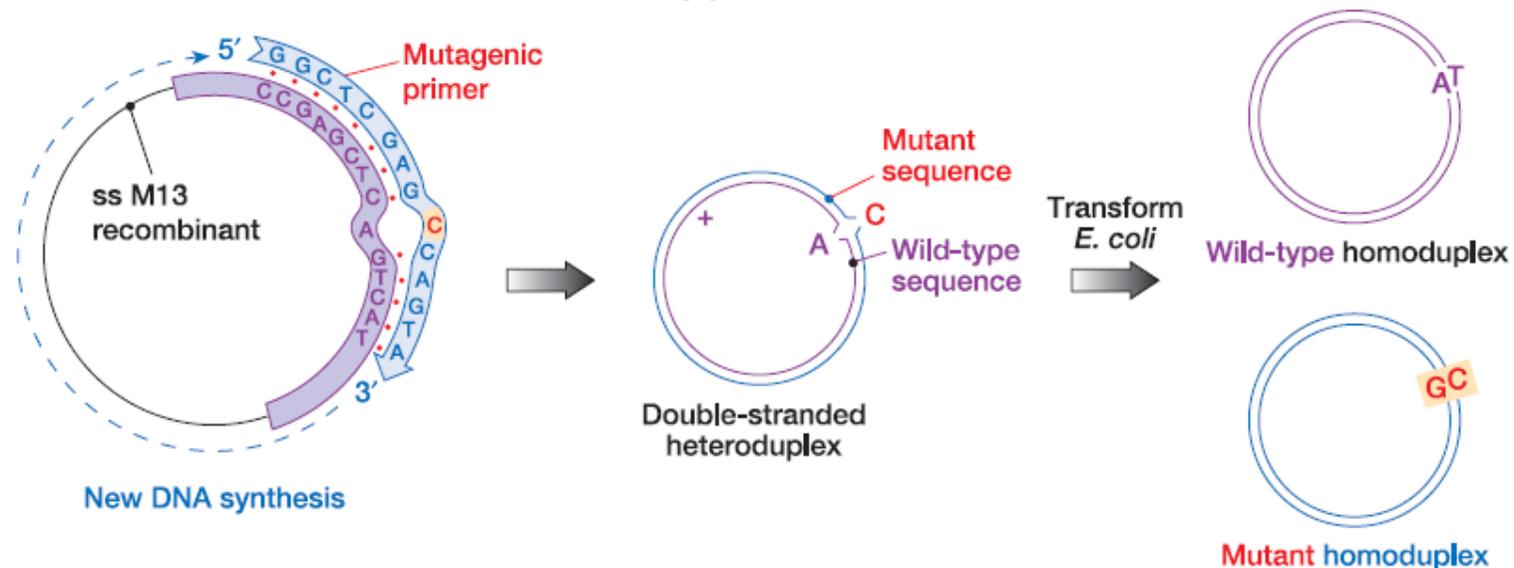


(c) Inserzione di un oligonucleotide



2a) Mutagenesi sito-specifica diretta da un oligonucleotide

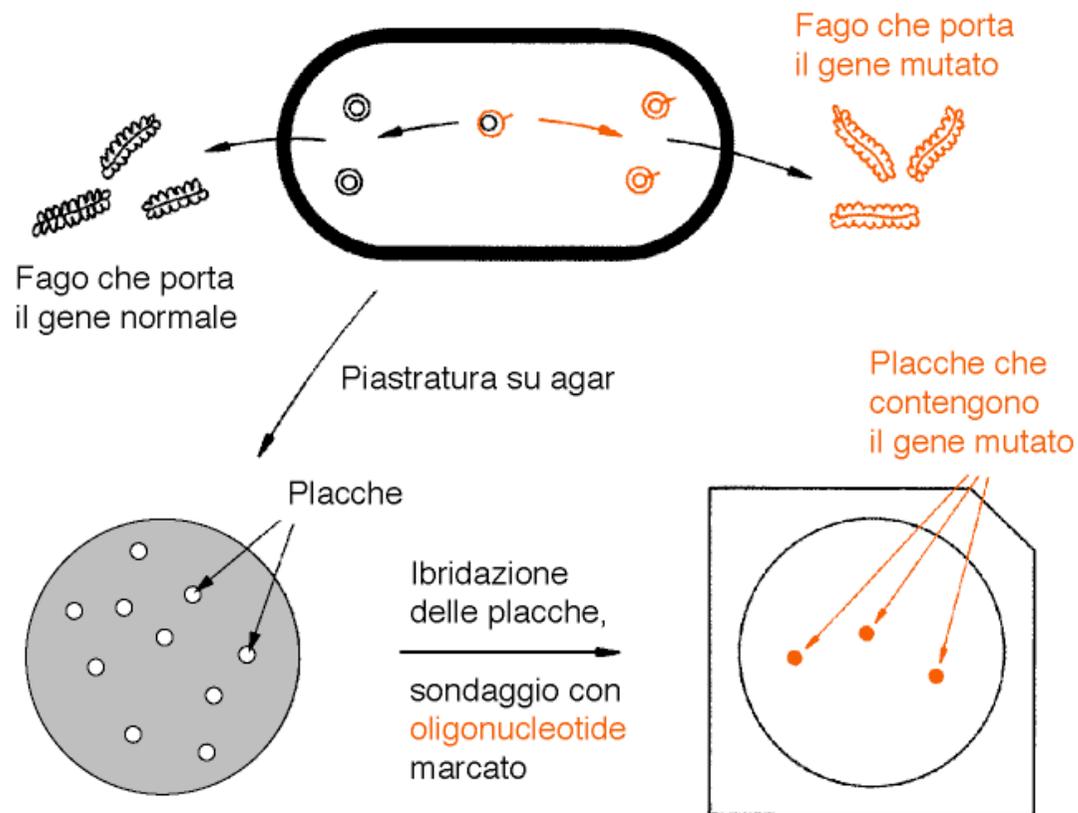
- ✧ Clonaggio della sequenza da mutagenizzare nel **vettore M13**
- ✧ Utilizzo di un **oligonucleotide** che è complementare al DNA stampo tranne per la posizione da mutagenizzare.
- ✧ Dopo appaiamento stampo-primer, si aggiunge la DNA polimerasi che sintetizzerà un filamento di DNA di M13 complementare allo stampo, tranne che nella posizione mutata.
- ✧ La molecola heteroduplex è trasformata in *E. coli* e le successive repliche produrranno molecole circolari a doppio filamento *wt* e mutate.



2a) Mutagenesi sito-specifica diretta da un oligonucleotide

Identificazione dei batteriofagi mutanti

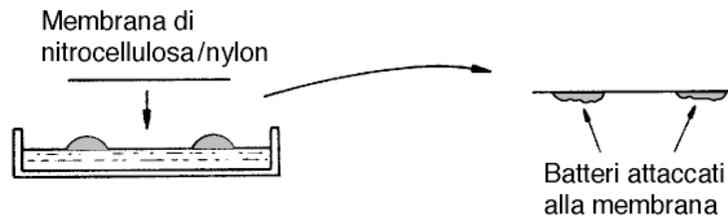
(c) Isolamento del fago che porta la mutazione



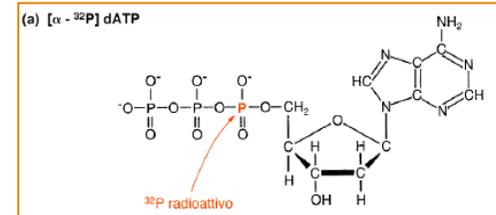
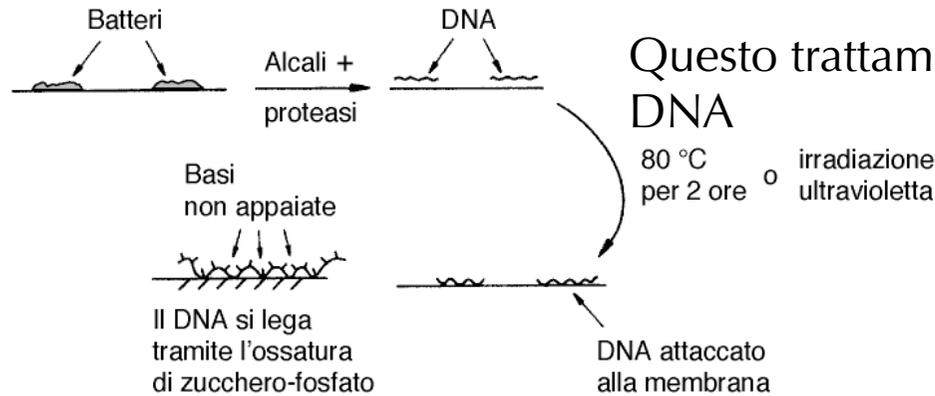
I batteriofagi contenenti la versione mutata sono riconosciuti mediante esperimenti **d'ibridazione** utilizzando come sonda **l'oligonucleotide portante la mutazione** inserita.

Sondaggio mediante ibridazione di colonie e placche con una sonda marcata radioattivamente

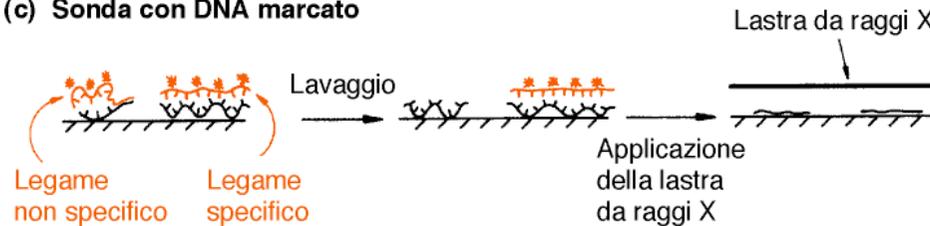
(a) Trasferimento delle colonie su nitrocellulosa o nylon



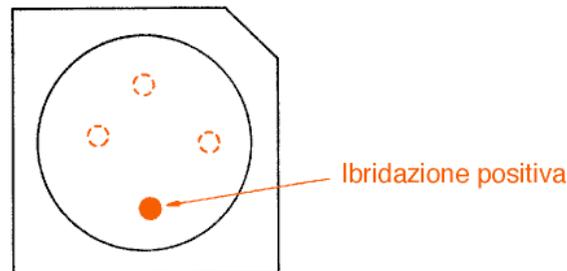
(b) Degradazione delle cellule, purificazione del DNA



(c) Sonda con DNA marcato



(d) L'autoradiografia che ne risulta



Si deve denaturare la sonda mediante riscaldamento e applicarla alla membrana in una soluzione di sostanze chimiche che favorisce l'ibridazione degli acidi nucleici.

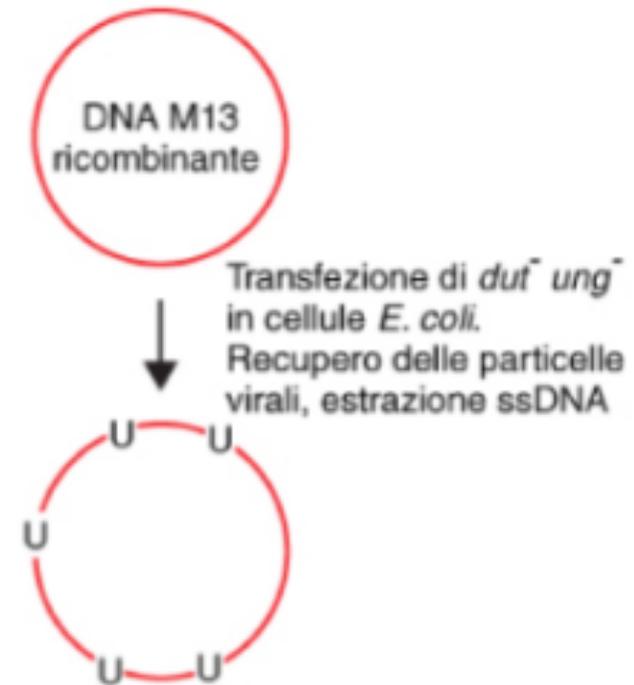
2a) Mutagenesi sito-specifica diretta da oligonucleotide

Limitazioni:

- Il DNA da mutagenizzare **va clonato** nel vettore **M13**.
- **L'efficienza** di mutazione è piuttosto **bassa**. Teorica 50%, ma solitamente non più del 5% dei cloni contiene la mutazione
- I **saggi** per l'individuazione di fagi mutanti (screening mediante ibridazione con una sonda di DNA in condizioni molto stringenti) sono **lenti e laboriosi**

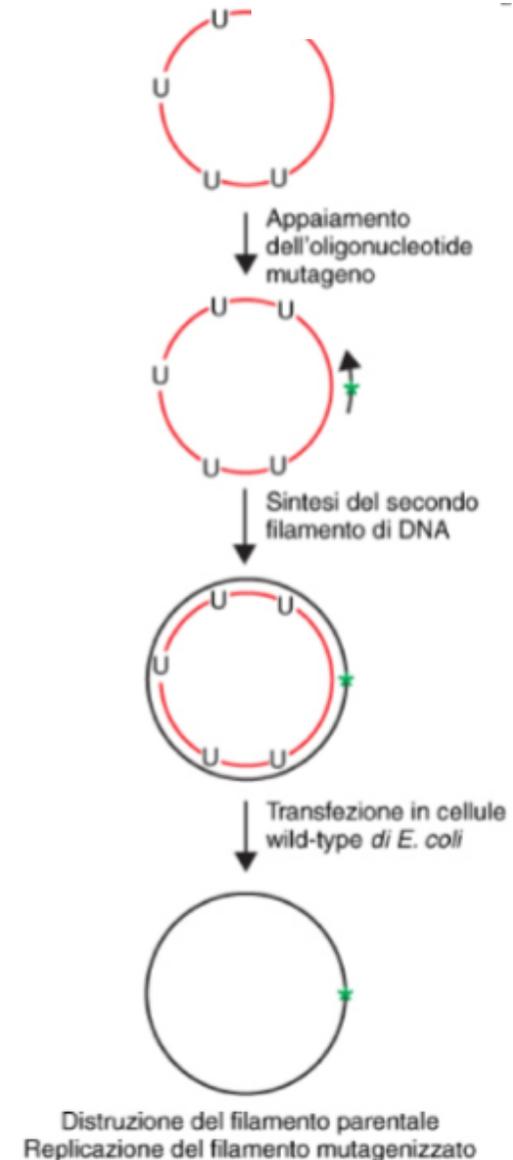
2b) Mutagenesi sito-specifica con il metodo *dut/ung*⁻

- Sistema per aumentare l'efficienza di mutagenesi
- Il fago M13 viene fatto crescere in un ceppo di *E.coli dut/ung*⁻
- Il gene *dut* codifica per una UTPasi → degrada dUTP nella cellula. *dut*⁻ ha di conseguenza un'elevata [dUTP] che si accumula nella cellula e che tende a sostituirsi al dTTP durante la replicazione del DNA
- Il gene *ung* codifica per una uracil-N-glicosilasi → rimuove l'uracile dal DNA

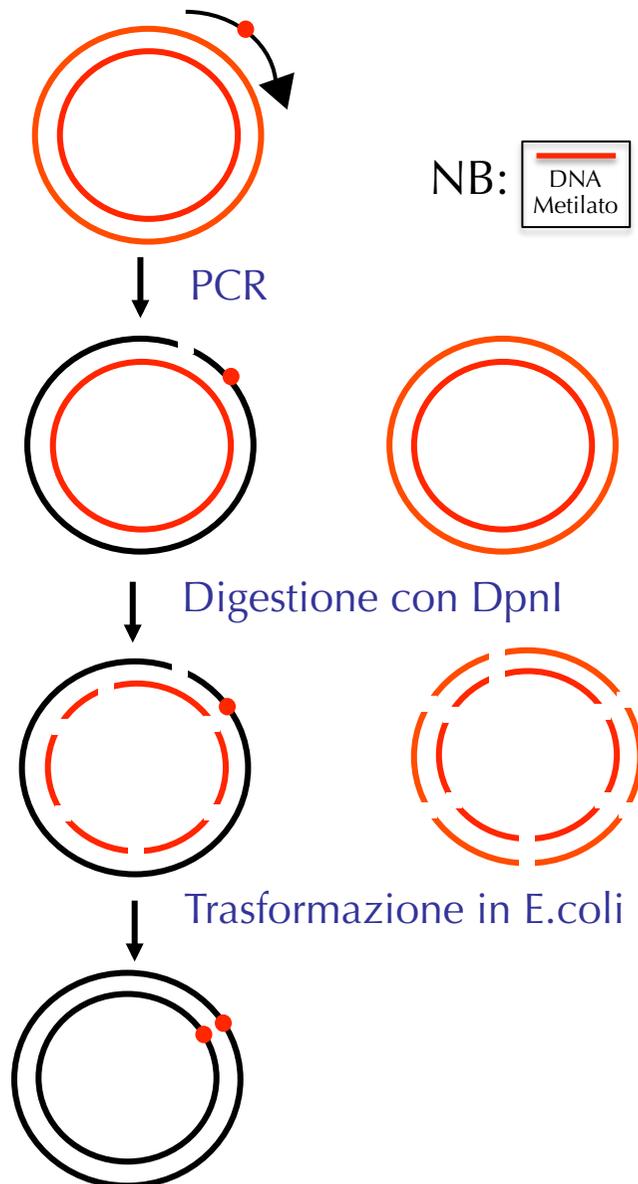


2b) Mutagenesi sito-specifica con il metodo *dut/ung*⁻

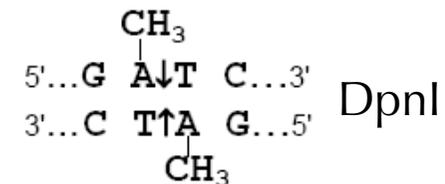
- Dopo aver purificato il costrutto DNAss cresciuto nel ceppo di *E. coli dut/ung*⁻ si procede alla mutagenesi in vitro utilizzando l'oligonucleotide con sequenza mutata.
- Si otterrà un DNAds in cui il filamento parentale sarà ricco in UTP mentre quello mutato avrà un normale contenuto di TTP.
- Trasformando in un ceppo di *E. coli ung*^{wt} i residui di uracile saranno degradati distruggendo selettivamente il filamento parentale.
- La maggioranza dei trasformanti ottenuti sarà di tipo mutante.



2c) Mutagenesi circolare a un primer su plasmide



- Il DNA plasmidico deve essere ottenuto da un ceppo di E.coli **dam⁺**.
- Il plasmide da mutare viene miscelato con un primer sovrapposto e complementare contenente la mutazione desiderata
- Si effettua la mutagenesi in vitro con una Taq polimerasi high fidelity
- Si effettua una digestione con **DpnI** specifico solo per il DNA metilato ed emimetilato (quest'ultimo con efficienza 60 volte inferiore) di origine batterica che sarà degradato (il DNA di nuova sintesi non è metilato).



- Si effettua la trasformazione in E.coli del plasmide mutagenizzato

2d) Mutagenesi circolare → altro tipo di selezione

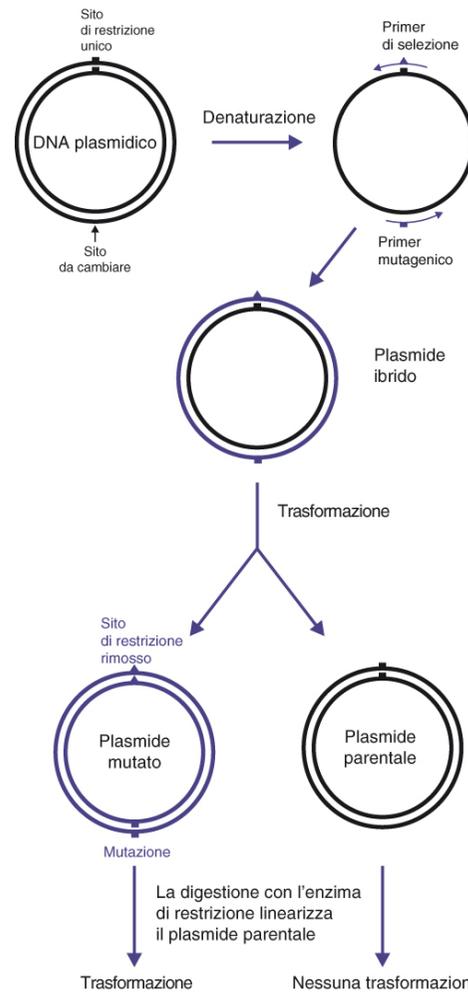


Figura 7.20 Mutagenesi *in vitro*: selezione di un plasmide mutato usando la rimozione di un sito di restrizione.

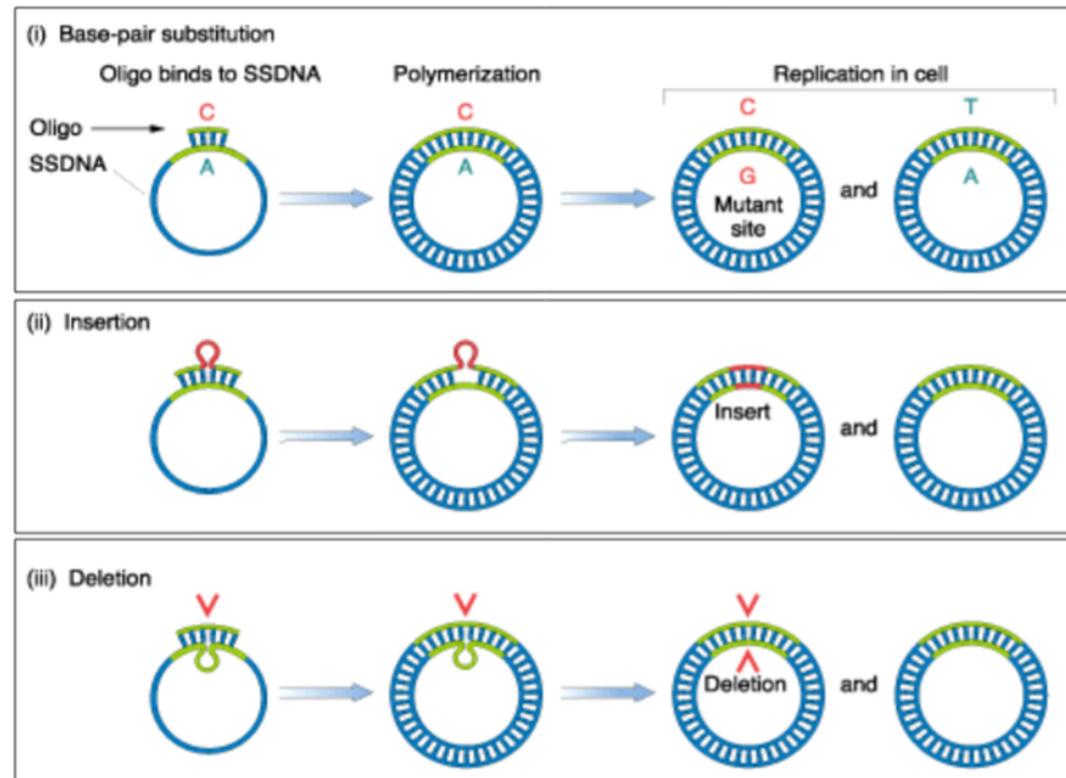
Sugli oligo di mutagenesi

- I/i mismatch/es devono trovarsi vicino al centro del primer per permettere un buon appaiamento alle estremità 5' e 3':
- Possono essere inseriti più mismatches, aumentando la lunghezza dell'oligo (es 1 mism. = >18-20 nucleotidi; 2 mism. = >25 nucleotidi)

- Alto grado di specificità e purificazione;

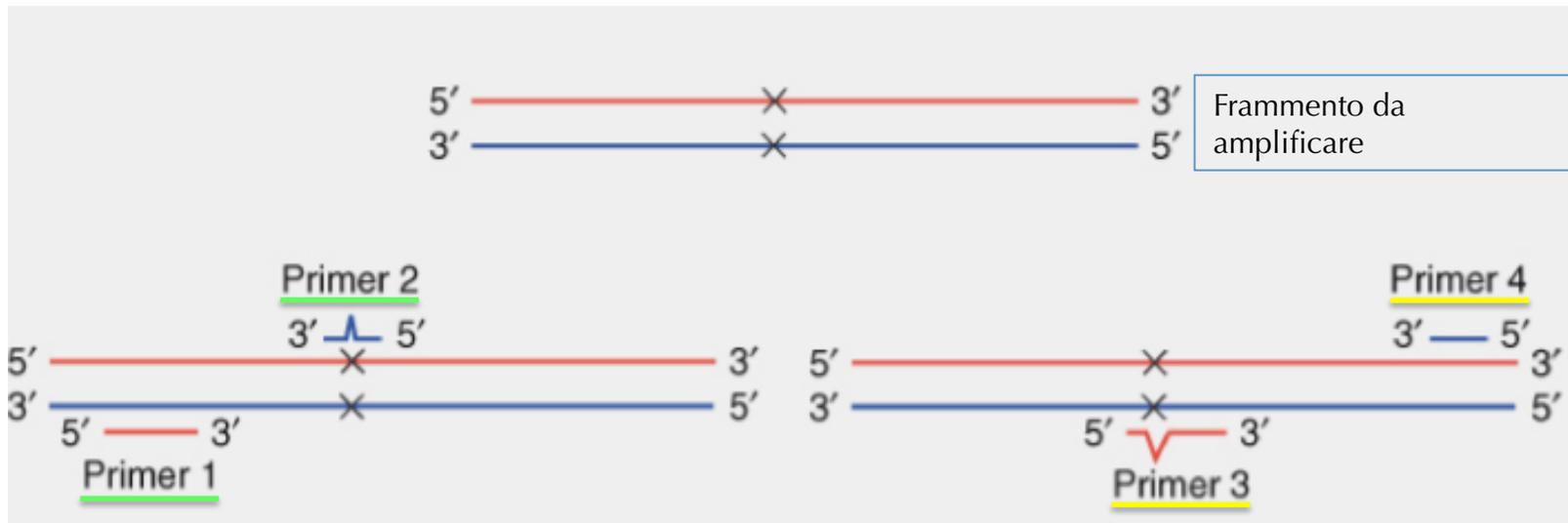
- Utilizzare oligonucleotidi fosforilati all'estremità 5';

- Possibilità di inserire
Diversi tipi di mutazioni



3a) Mutagenesi mediante PCR: Overlap extension

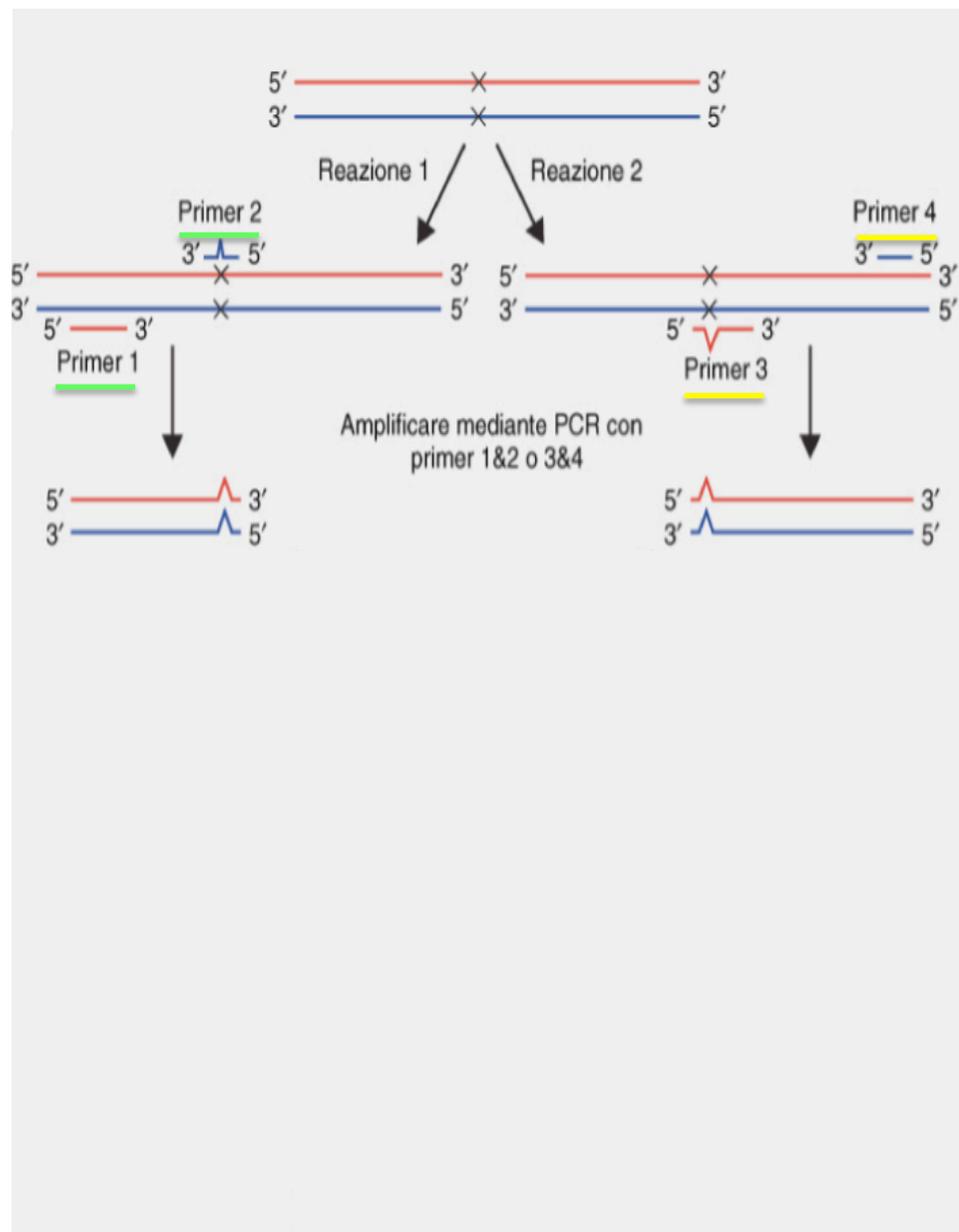
La reazione di mutagenesi con PCR avviene in due fasi e richiede 4 diversi primer e tre diverse reazioni di PCR.



Primer 2 e **primer 3** sono disegnati in modo da essere sovrapposti e introdurre la mutazione nei due filamenti di nuova sintesi.

Primer 1 e **primer 4** ciascuno complementare ad una delle estremità della regione da mutagenizzare.

3a) Mutagenesi mediante PCR: Overlap extension



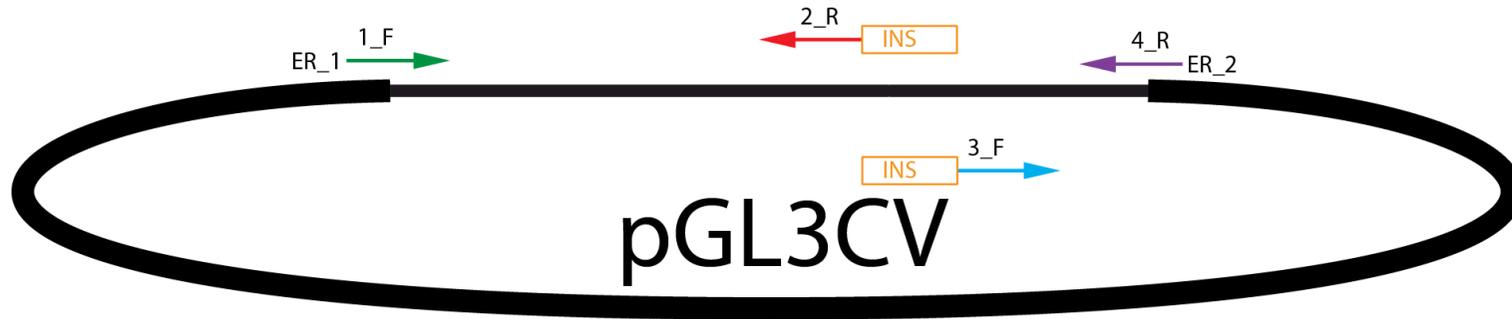
Allestire **2 reazioni di PCR distinte:**

- 1) **PCR con primer 1 e 2**, per amplificare l'estremità 5' del frammento: il prodotto risultante porta la mutazione all'estremità 3';
- 2) **PCR con primer 3 e 4**, per amplificare l'estremità 3' del frammento: il prodotto risultante porta la mutazione all'estremità 5'.

I **due prodotti di PCR sono mescolati**, si effettua una denaturazione seguita da una rinaturazione in modo che i filamenti delle due reazioni di PCR possono ibridare tra loro. Si aggiunge una DNA polimerasi che procede alla sintesi della regione complementare

Solo dalle molecole ibride date dall'appaiamento delle estremità 3', la DNA polimerasi può produrre la versione mutata del frammento originario che potrà essere successivamente amplificato con la coppia di primer 1 e 4.

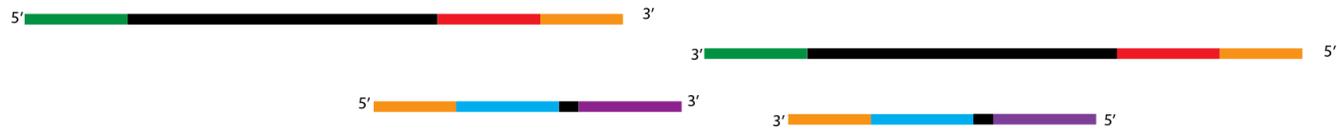
Inserzione mediante overlap extension



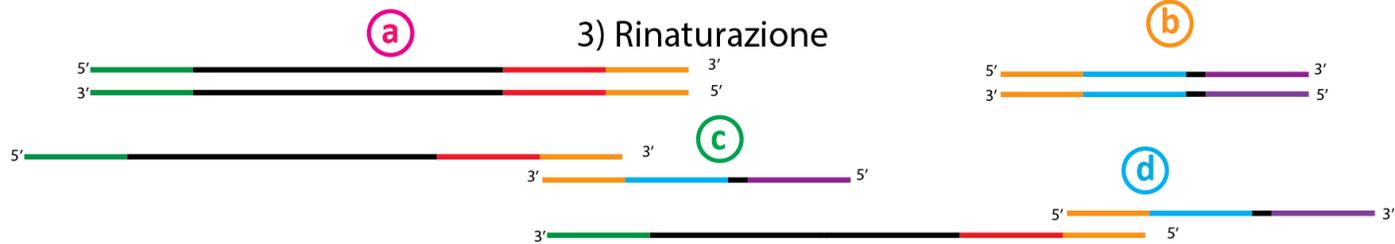
1) PCR con enzima DNA Polimerasi HF



2) Mescolamento e Denaturazione



3) Rinaturazione



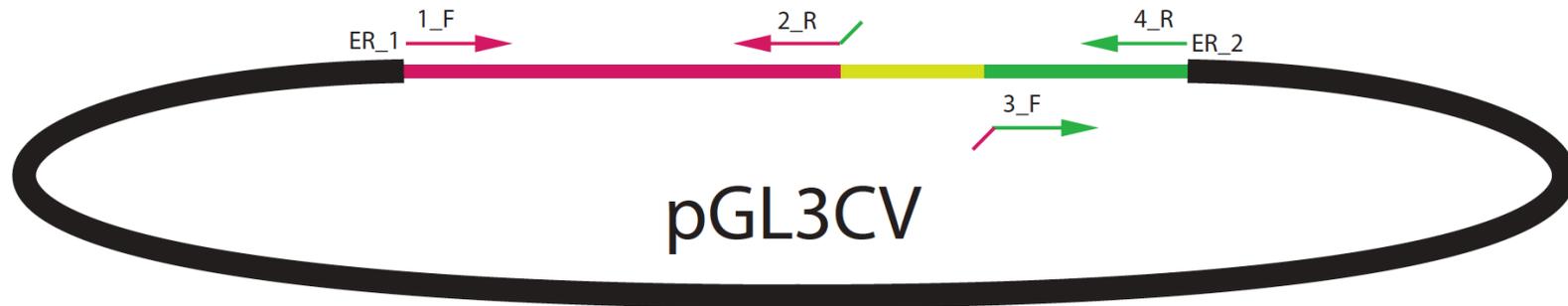
4) Extension (Taq + dNTPs)



5) PCR con 1_F e 4_R

6) restrizione prodotto di PCR e Vettore pGL3CV con ER_1 e ER_2

Delezione mediante overlap extension



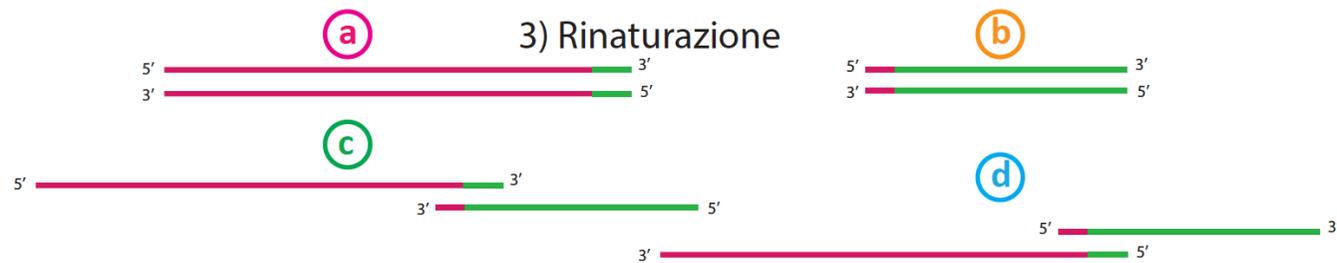
1) PCR con enzima DNA Polimerasi HF



2) Mescolamento e Denaturazione



3) Rinaturazione



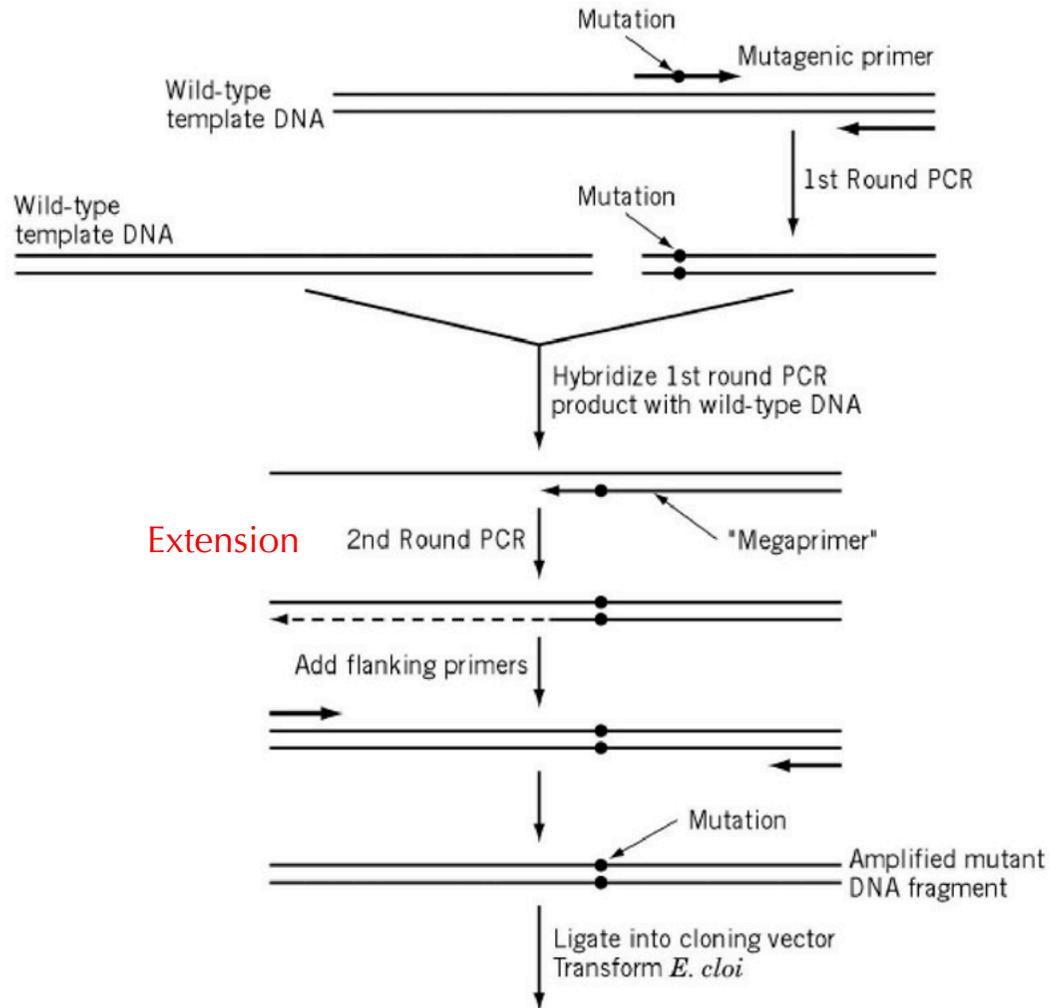
4) Extension (Taq + dNTPs)



5) PCR con 1_F e 4_R

6) restrizione prodotto di PCR e Vettore pGL3CV con ER_1 e ER_2

3b) Mutagenesi mediante PCR: Megaprimer



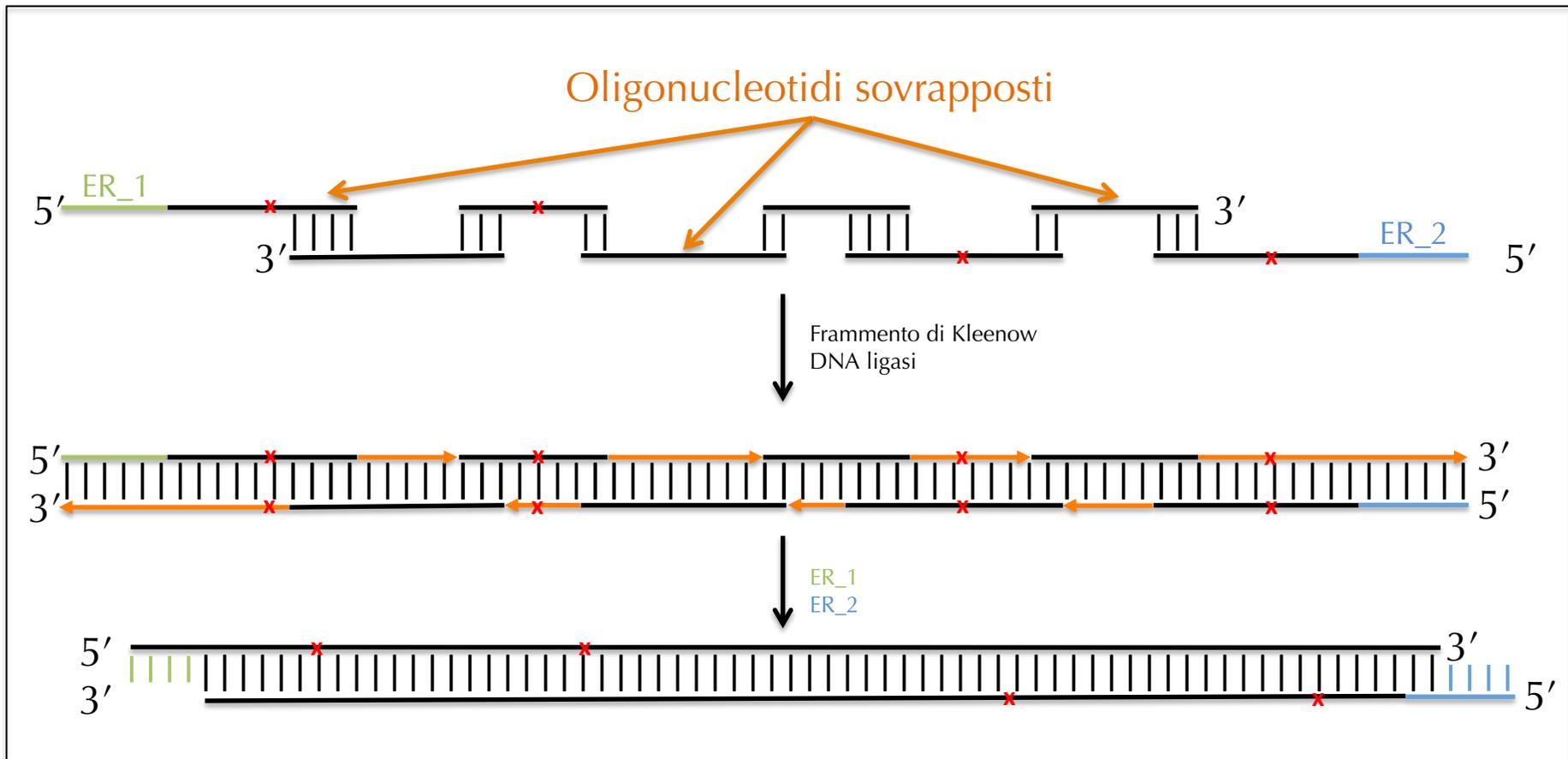
- SNV, ins, del

- Rispetto al metodo dell' Overlap extension:

- 3 primer
- 2 round di PCR

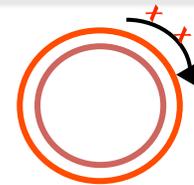
Mutazioni multiple: a) sintesi di un gene artificiale

Gene a sequenza nota da mutagenizzare



Mutazioni multiple: b) Metodi basati sulla PCR

1. Primer con più mutazioni contigue

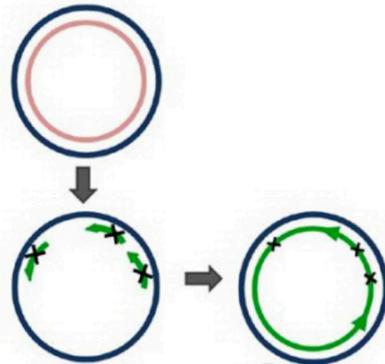


2. Kit Enzymomics: combinazione PCR, Ligazione, DpnI

I. Mutant strand synthesis

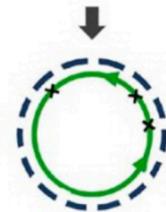
Amplify the plasmid in a mutagenesis reaction with mutagenic primers

1. Denature template
2. Anneal mutagenic primers
3. Extend primer with enzyme
4. Ligase seals the DNA strands creating a replicated plasmid possessing the desired mutation



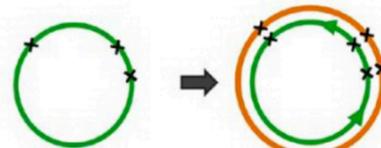
II. Digest template with Dpn I

Dpn I digestion of methylated DNA

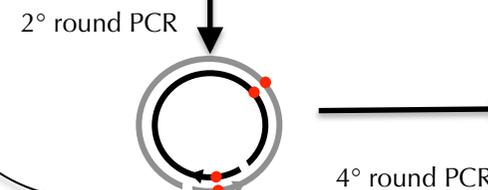
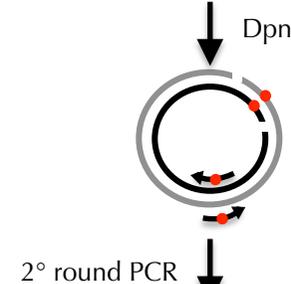
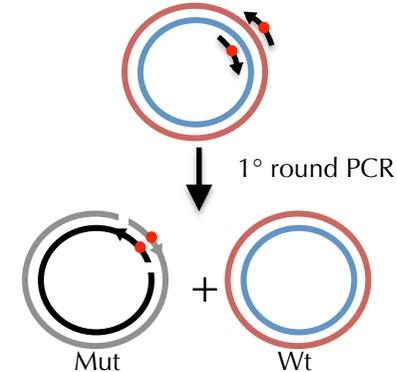


III. Transformation

Transform mutated ssDNA into competent cells, which synthesize the complementary strand



3. Multisite-Directed mutagenesis: Combinazione PCR, DpnI e overlap extension



Trasformazione di E coli competenti che riparano le discontinuità

MUTAGENESI RANDOM

Mutagenesi Random

Non è necessario conoscere in dettaglio la sequenza e il ruolo di particolari aa nella proteina

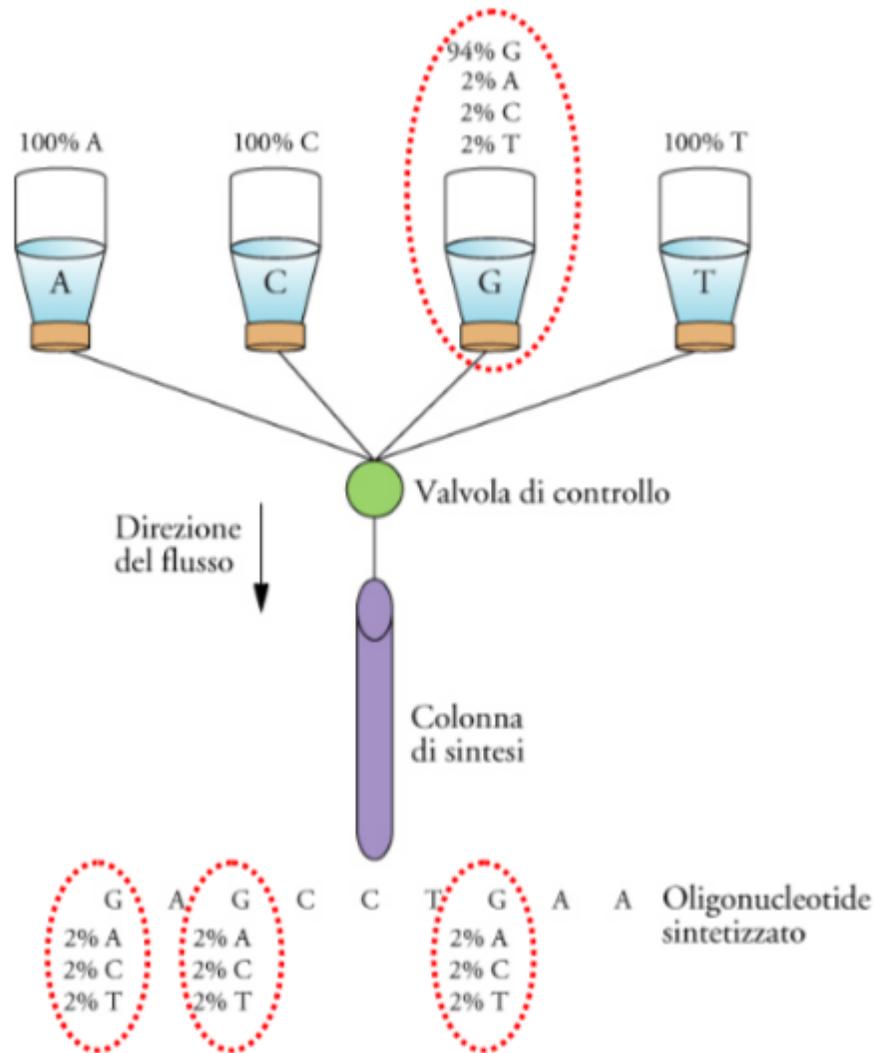
Possono essere creati mutanti inattesi, con proprietà nuove e interessanti

Creazione di Librerie di mutanti

Sistemi:

- 1) Utilizzo di oligonucleotidi degenerati
- 2) Utilizzo di PCR in condizioni particolari

1) Sintesi di oligonucleotidi degenerati



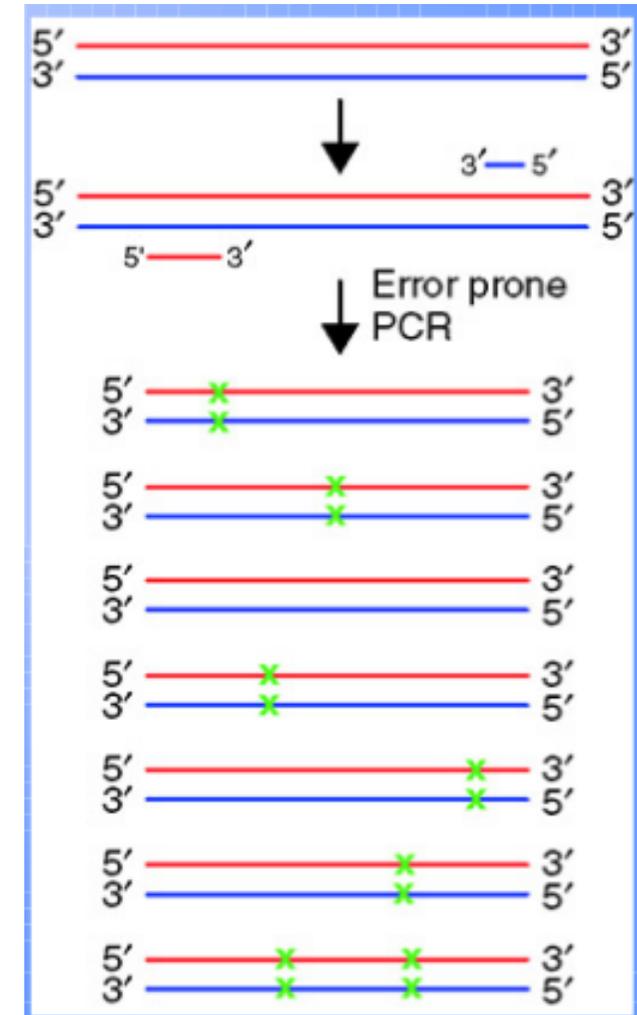
2) Utilizzo di PCR per generare cloni mutatanti

Aumentare la probabilità di errore della Taq polimerasi:

- Utilizzo di piccole quantità di Mn^{2+} , in sostituzione di $MgCl_2$
- Includere un eccesso di dGTP e dTTP rispetto agli altri nucleotidi trifosfato

Fino a 1 errore per Kb

- Utilizzo di dNTP sbilanciati
- Aumento del # di cicli
- Aumento della concentrazione della polimerasi



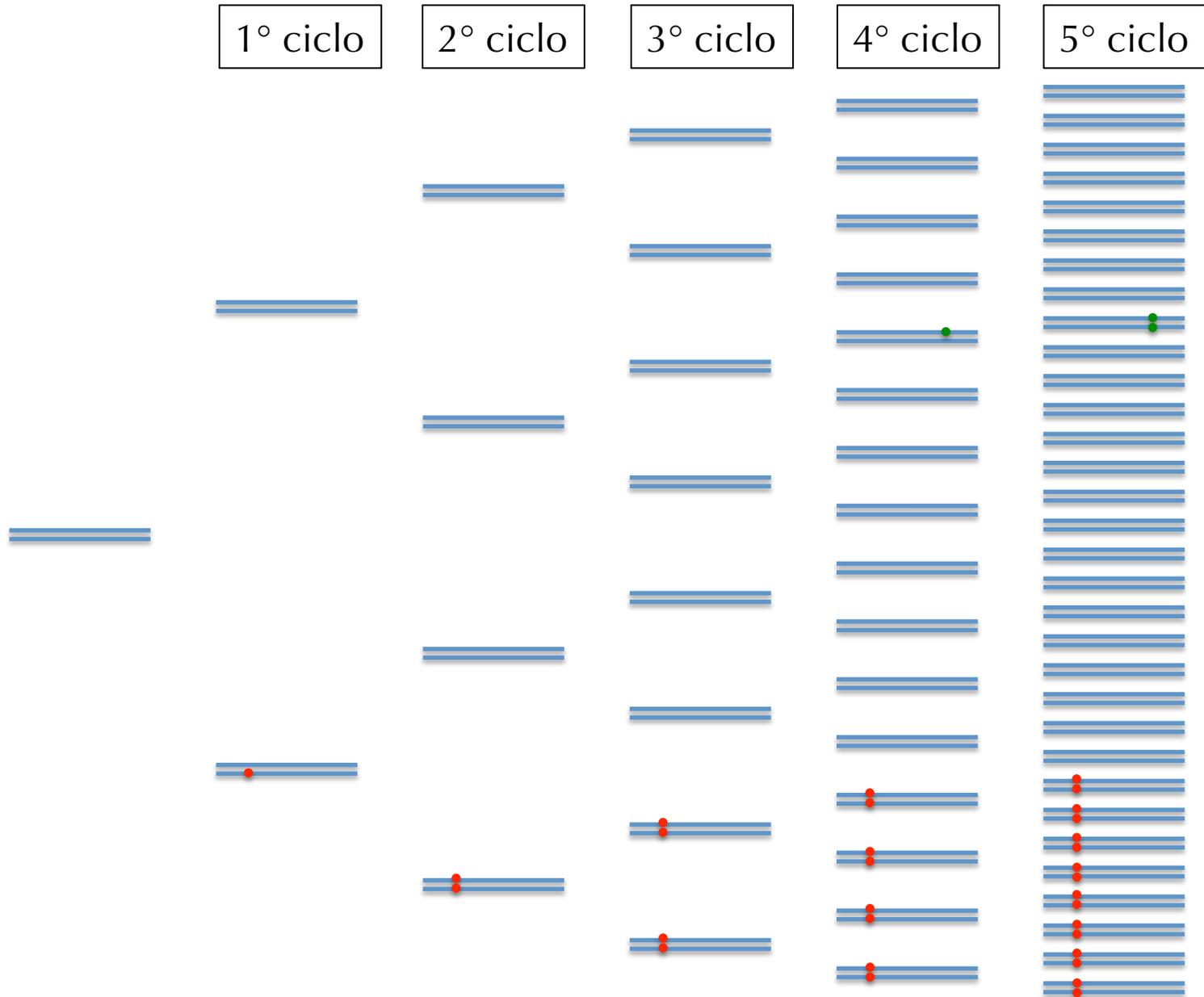
Limiti della PCR-mediated random mutagenesis nella produzione di librerie di mutanti

		Second nucleotide					
		U	C	A	G		
U	UUU	Phe	UCU	UAU	Tyr	UGU	Cys
	UUC		UCC	UAC		UGC	
	UUA	Leu	UCA	UAA	STOP	UGA	STOP
	UUG		UCG	UAG	STOP	UGG	Trp
C	CUU		CCU	CAU	His	CGU	
	CUC	Leu	CCC	CAC		CGC	Arg
	CUA		CCA	CAA	Gln	CGA	
	CUG		CCG	CAG		CGG	
A	AUU	Ile	ACU	AAU	Asn	AGU	Ser
	AUC		ACC	AAC		AGC	
	AUA		ACA	AAA	Lys	AGA	Arg
	AUG	Met	ACG	AAG		AGG	
G	GUU		GCU	GAU	Asp	GGU	
	GUC	Val	GCC	GAC		GGC	Gly
	GUA		GCA	GAA	Glu	GGA	
	GUG		GCG	GAG		GGG	

Alcuni errori
sono più
comuni di
altri

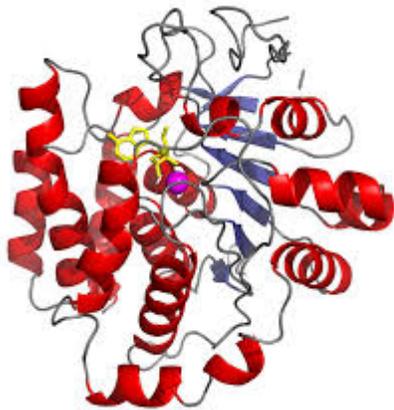
Le
mutazioni
non sono
distribuite
casualmente

Le mutazioni precoci sono più comuni



A cosa serve la mutagenesi del DNA?

1. Ingegnerizzazione di proteine in modo da renderle più adatte alle applicazioni industriali o terapeutiche.



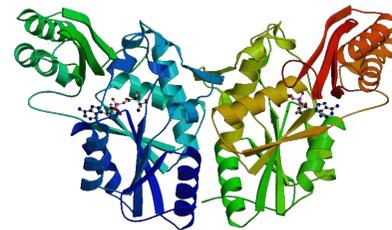
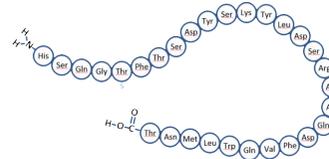
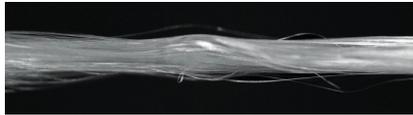
<i>Enzima</i>	<i>Impiego(hi) industriale(i)</i>
α -Amilasi	Fabbricazione della birra, produzione di alcol
Amminoacilasi	Preparazione di L-amminoacidi
Bromelaina	Intenerimento delle carni, chiarificazione di succhi
Catalasi	Antiossidante nei cibi pronti
Cellulasi	Produzione di alcol e glucosio
Ficina	Intenerimento delle carni, chiarificazione di succhi
Glucoamilasi	Fabbricazione della birra, produzione di alcol
Glucosio isomerasi	Fabbricazione di sciroppi ad alto tenore di fruttosio
Glucosio ossidasi	Antiossidante nei cibi pronti
Invertasi	Inversione del saccarosio
Lattasi	Impiego di siero del latte, idrolisi del lattosio
Lipasi	Fabbricazione di formaggi, preparazione di aromi
Papaina	Intenerimento delle carni, chiarificazione di succhi
Pectinasi	Chiarificazione di succhi di frutta, produzione di alcol
Proteasi	Detergente, produzione di alcol
Caglio	Fabbricazione di formaggi

2. Studio delle sequenze nucleotidiche, delle funzioni dei geni e di particolari aminoacidi nelle proteine.

Le proteine come prodotto

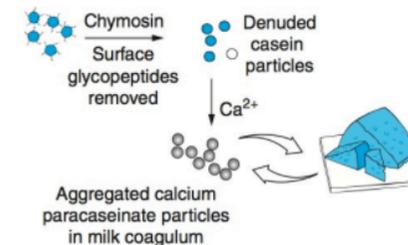
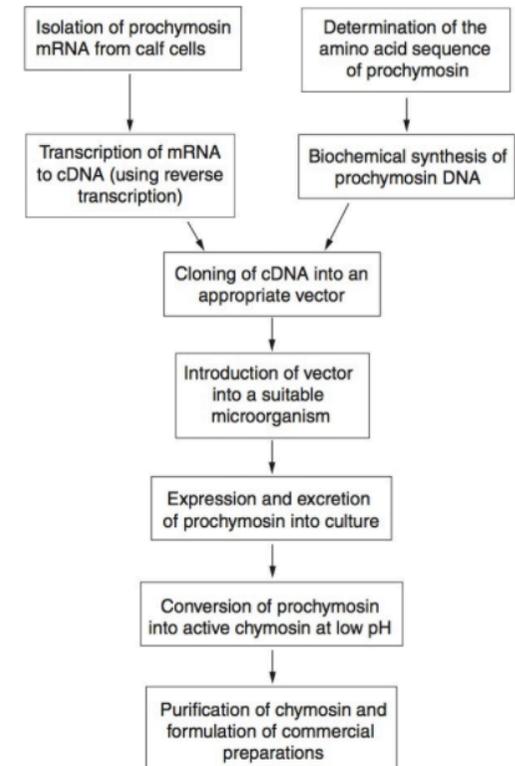
- Le proteine “in-vivo”:

- strutturali
- enzimi
- ormoni (insulina, ACTH)
-



- Le proteine in “biotecnologia”:

- ER ed enzimi di modificazione
- Taq Polimerasi
-



Protein Engineering

- **Protein engineering** implica l'uso di tecniche di manipolazione genetica per alterare la sequenza codificante di un gene (clonato) e quindi della proteina da esso codificata
- L'ingegnerizzazione di una proteina può essere usata per:
 1. Aumentarne la **stabilità**
 2. Aumentarne la **purezza** durante l'estrazione
 3. Aumentarne **l'espressione**
 4. Modificare l'interazione con **cofattori**
 5. Aumentare **l'attività** di un enzima
 6. Modificarne la **specificità**
 7. Studiarne la **funzione**

1 - Aumento della stabilità

TABLE 1 SOME ENZYMES AND THEIR INDUSTRIAL APPLICATIONS

Enzyme	Application
Amylases	Digest starch in fermentation and processing
Proteases	Digest proteins for detergents, meat/leather, cheese, brewing/baking, animal/human digestive aids
Lipases	Digest lipids (fats) in dairy and vegetable oil products
Pectinases	Digest enzymes in fruit juice/pulp
Lactases	Digest milk sugar
Glucose isomerase	Produce high-fructose syrups
Cellulases/ hemicellulases	Produce animal feeds, fruit juices, brewing converters
Penicillin acylase	Produces penicillin

- Molti enzimi di quelli utilizzati nei processi industriali derivano da **organismi mesofili**

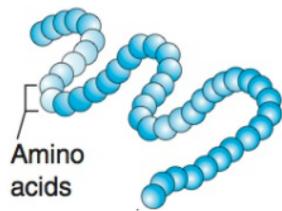


- il loro uso può essere limitato → sono **denaturati** alle condizioni comuni ai processi industriali
 - alte temperature
 - alti pH
 - solventi organici
 - solventi chimici

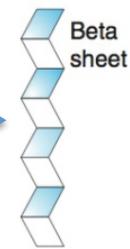
1 - Aumento della stabilità

- La stabilità delle proteine può essere aumentata creando molecole che **non si denaturano** in condizioni sfavorevoli
- La stabilità proteica può essere incrementata
 - Aggiungendo ponti disolfuro
 - Sostituendo aminoacidi labili
 - Aumentando le interazioni idrofobiche o aromatiche
 -

Dimensioni di una proteina



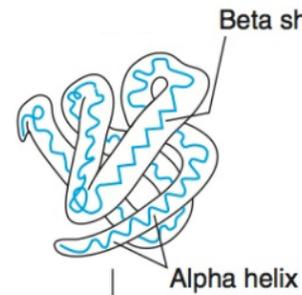
Primary protein structure is the sequence of a chain of amino acids



Secondary protein structure occurs when the sequence of amino acids is linked by weak hydrogen bonds into one or two structural forms



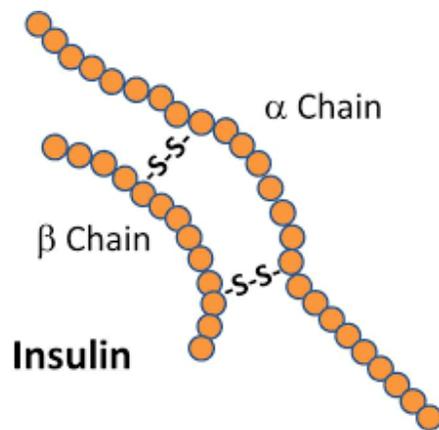
Quaternary protein structure is a protein consisting of more than one amino acid chain, each participating in the final 3D shape



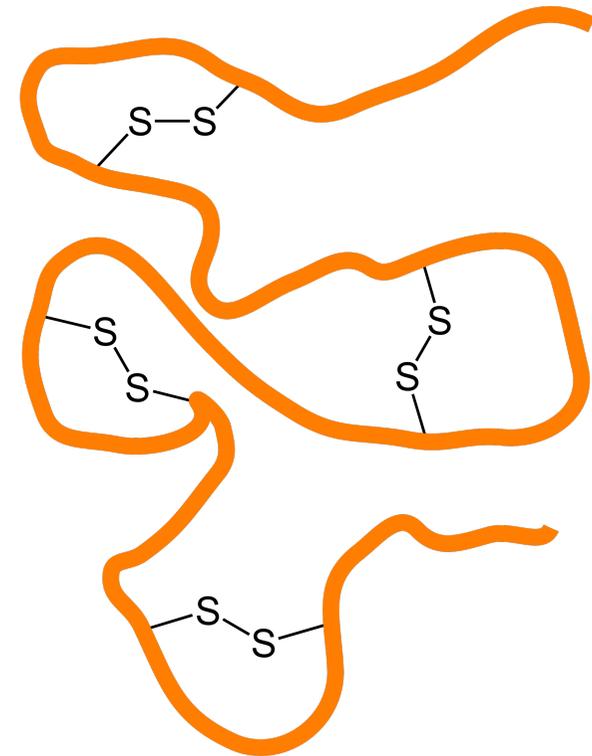
Tertiary protein structure occurs when certain attractions are present between alpha helices and beta sheets producing a unique 3D structure

1a) Aumento della stabilità: aggiunta di ponti disolfuro

- I ponti disolfuro possono stabilizzare significativamente la struttura nativa di una proteina, riducendo l'entropia della proteina svolta

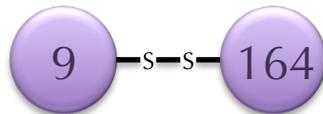
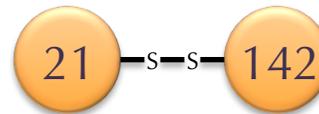
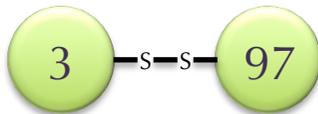
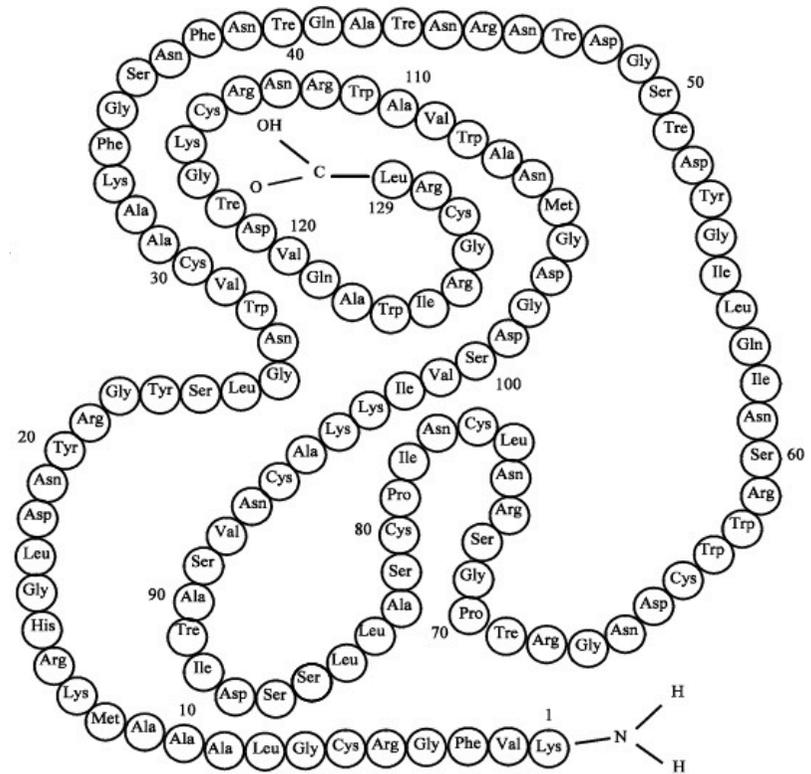


- Possono favorire anche l'interazione di 2 subunità proteiche



Esempio 1: il Lisozima

- Il lisozima è un enzima con attività battericida utile nel controllare fermentazioni batteriche nel settore alimentare.
- Nella forma wt il lisozima ha residui di cisteina ma nessun ponte disolfuro
- Attraverso la mutagenesi sito specifica sono stati introdotti nuovi residui di cisteina e nuovi S-S interni fra gli aa



Mutagenesi del Lisozima: attività e termostabilità

Table 8.2 Properties of T4 lysozyme and six engineered variants

Enzyme	Amino acid at position:							No. of -S-S-	% Activity	T_m (°C)
	3	9	21	54	97	142	164			
wt	Ile	Ile	Thr	Cys	Cys	Thr	Leu	0	100	41.9
pwt	Ile	Ile	Thr	Thr	Ala	Thr	Leu	0	100	41.9
A	Cys	Ile	Thr	Thr	Cys	Thr	Leu	1	96	46.7
B	Ile	Cys	Thr	Thr	Ala	Thr	Cys	1	106	48.3
C	Ile	Ile	Cys	Thr	Ala	Cys	Leu	1	0	52.9
D	Cys	Cys	Thr	Thr	Cys	Thr	Cys	2	95	57.6
E	Ile	Cys	Cys	Thr	Ala	Cys	Cys	2	0	58.9
F	Cys	Cys	Cys	Thr	Cys	Cys	Cys	3	0	65.5

- La stabilità termica aumentava con la presenza dei ponti disolfuro, e la struttura più stabile era quella con 3 legami S-S
- Quei mutanti con legami S-S bonds fra l'aminoacido 21 e il 142 perdevano il 100% della loro attività

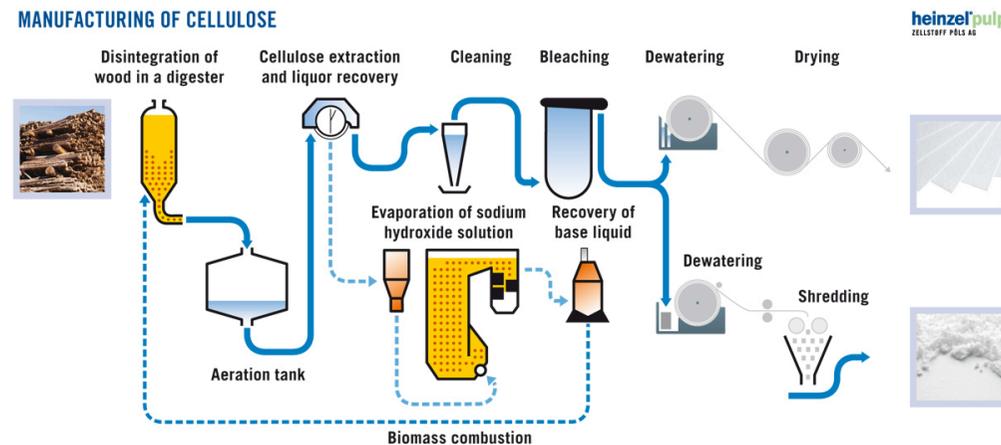
Esempio 2: la Xilanasi

- Le attuali strategie per la produzione della carta prevedono uno step di sbiancamento chimico (cloro e diossido di cloro), è essenziale per migliorarne colore e qualità
- Gli agenti sbiancanti sono potenzialmente molto tossici e quindi devono essere ridotti
- Il processo di sbiancamento può essere migliorato con l'uso dell'enzima **xilanasi** (*bioleaching*) che riduce la quantità di sbiancanti chimici e la quantità di sottoprodotti inquinanti di circa il 10-20% rispetto ad un processo privo di pretrattamento enzimatico



Le Xilanasì nella produzione della carta

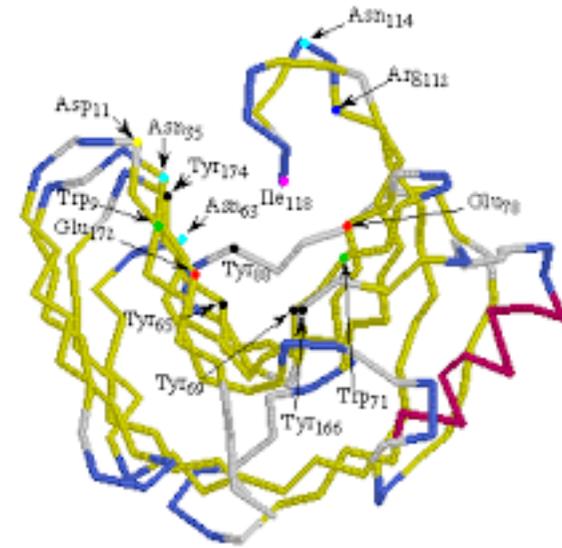
- La fase del processo quando viene aggiunto l'enzima è immediatamente successiva al trattamento alcalino caldo.
- Il pH della polpa viene aggiustato ai valori di funzionamento dell'enzima mediante aggiunta di acido



- La tendenza attuale nelle cartiere è di ridurre l'utilizzo dell'acqua. Ne consegue che la temperatura della polpa rimane elevata → questo richiederebbe una xilanasì termostabile
- Un tentativo per risolvere questo problema è stato quello di produrre una xilanasì modificata (*circulans Bacillus*) con una maggiore stabilità termica.

Xilanasi, generazione di mutanti termostabili

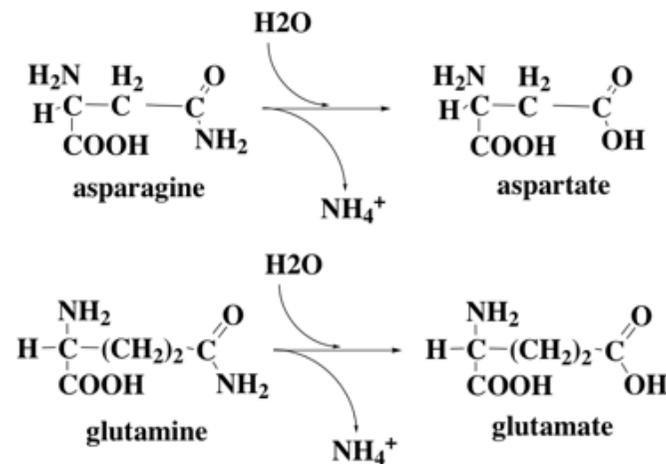
- Realizzazione di un modello della struttura 3D al computer
- Individuazione dei siti potenziali nei quali introdurre residui di cisteina e S-



- Via **Site-directed mutagenesis** generati 8 mutanti con aumentato numero di legami **S-S** e **stabilità**.
- Un mutante con un S-S tra le estremità N e C terminali ha attività doppia rispetto al wild type a 60°C e rimane attivo per 2 ore contro i 30 minuti del wild-type

2 - Aumento della stabilità: Cambiamento di aminoacidi labili

- Quando le proteine sono esposte alle alte temperature può avvenire deaminazione → rilascio di gruppi NH₃

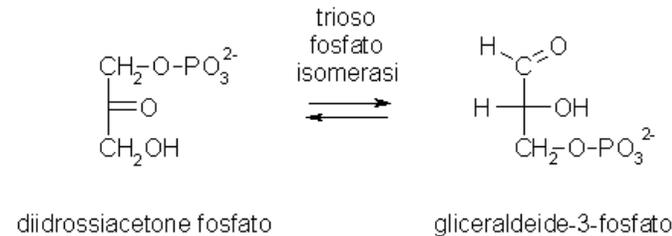


E. Jaspard (2001)

- La perdita di gruppi amminici può portare alla perdita di attività da parte dell'enzima colpito

Trioso Fosfato Isomerasi

- La **Trioso fosfato isomerasi** funziona durante la glicolisi catalizzando:



- In *Saccharomyces cerevisiae* consiste di 2 subunità identiche ciascuna con due residui di **Asn** che contribuiscono alla sua sensibilità termica
- Quando entrambe le Asn → Asp per deaminazione la proteina risultante è instabile perfino a temperatura ambiente
- Attraverso oligonucleotide directed mutagenesis:

- ▶ Asn 14 → Ile
- ▶ Asn 78 → Thr



Aumento della stabilità della Trioso Fosfato Isomerasi

Table 8.3 Stability at 100°C of the yeast enzyme triosephosphate isomerase and its engineered derivatives

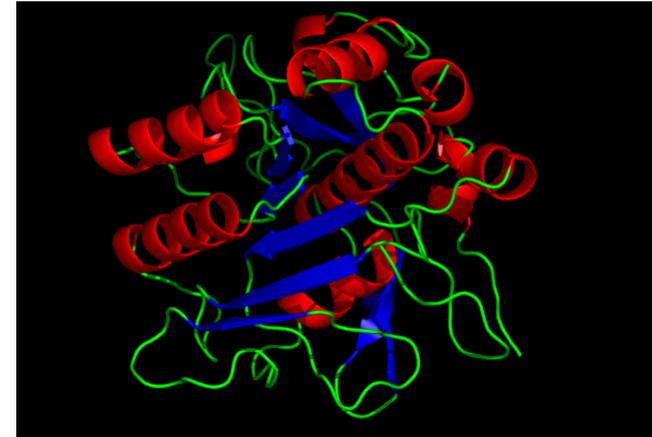
Enzyme	Amino acid at position:		Half-life (min)
	14	78	
Wild type	Asn	Asn	13 
Variant A	Asn	Thr	17
Variant B	Asn	Ile	16
Variant C	Thr	Ile	25 
Variant D	Asp	Asn	11

Adapted from Ahern et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:675–679, 1987.

Enzyme stability is expressed as the half-life, or rate of enzyme inactivation, at 100°C. A longer half-life indicates a more stable enzyme.

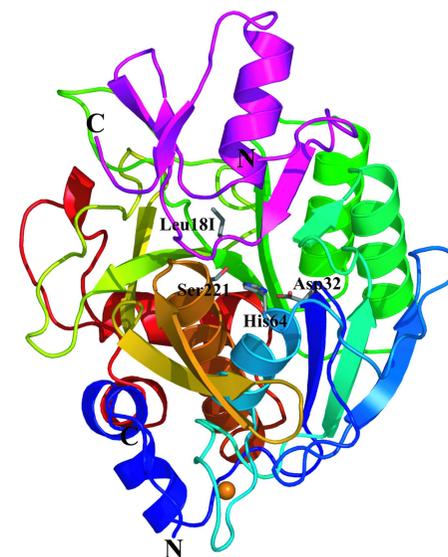
3 - Modifica della richiesta di cofattori

- La **subtilisina** è una serin proteasi (*Bacillus subtilis*) largamente utilizzate come **agente pulente biodegradabili** nei detersivi per lavatrice
- La subtilisina lega una o più ioni **Ca²⁺** che ne garantiscono la stabilità
- Le subtilinise sono usate in ambienti industriali dove si usano agenti chelanti che legano il Ca²⁺ e che inibiscono quindi la funzione.
- Per superare questo problema la mutagenesi diretta è stata utilizzata per abolire la capacità della subtilisina di legare Ca²⁺ e modificarne la stabilità



Mutagenesi della subtilisina

- Essendo nota la struttura cristallografica della subtilisina e del **sito legante il Ca^{2+}** , attraverso una mutagenesi sito-specifica diretta da oligonucleotide sono stati deleti gli **aa 75-83** responsabili proprio di questo legame
- Lo step successivo era quello di stabilizzare la proteina modificata
- Gli aa scelti per la mutagenesi venivano da 4 regioni:
 - **l'N-terminale** (aa 2-5)
 - **il loop omega** (aa 36-44)
 - **La regione ad α -elica** (aa 63-85)
 - **Regione a foglietto- β** (aa 202-222)
- I mutanti sono stati testati per l'attività enzimatica e la stabilità



Mutagenesi della subtilisina

- Mutazioni stabilizzanti sono state identificate in 7 dei 10 siti utilizzati ed introdotte tutte in un unico gene
- Il mutante ottenuto non richiede il Ca^{2+} come cofattore ed è 10 volte più stabile rispetto alla forma nativa in assenza di calcio



Altri esempi

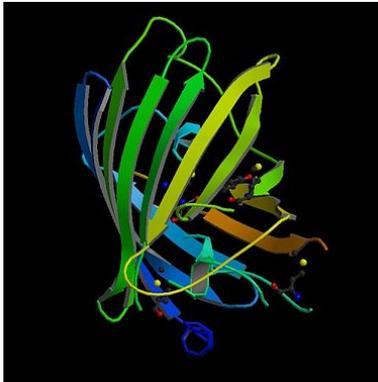
Target protein	Mutagenesis method ^b	Overall result
Cellobiohydrolase II (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>)	Inverse PCR method	A variant with all advantageous mutations combined could retain activity at 50 °C for > 72 h
<u>Pectate lyase</u> (<i>Xanthomonas campestris</i>)	Site-directed mutagenesis	A mutant with a 23-fold improvement of its half-life of inactivation at 45 °C was obtained
Glucose dehydrogenase (<i>Bacillus subtilis</i>)	Overlap extension PCR	A triple-mutant with a half-life of ~ 20 min at 25 °C extended to ~ 3.5 days at 65 °C
Penicillin G acylase (<i>Escherichia coli</i>)	Site-directed mutagenesis	Two single-mutants were isolated with a three-fold longer half-life at 50 °C than wild-type
B-lactamase (<i>Enterobacter coacae</i>)	DNA shuffling with mutant oligonucleotides	A variant with eight mutations had a T_m 9.1 °C higher than wild-type
<u>B-amylase</u> (<i>Bacillus circulans</i>)	Site-directed mutagenesis	One variant with five mutations had a T_m 4.1 °C above wild-type
Glycyl-tRNA synthetase (<i>Thermus thermophilus</i>)	Site-directed mutagenesis	Five single-mutants and one double-mutant with T_m values 1.4–4.7 °C higher than the wild-type
3-Isopropylmalate dehydrogenase (<i>Thermus thermophilus</i>)	Site-directed mutagenesis	A single-mutant with a half-denaturation time at 86 °C approximately three-fold longer than wild-type
Isocitrate dehydrogenase (<i>Caldococcus noboribetus</i>)	Site-directed mutagenesis	A variant with five mutations had a 10 min half inactivation temperature 2.5 °C above the wild-type
Tobacco etch virus protein – protease	Site-directed mutagenesis	A double-mutant was obtained that had a T_m 2.6 °C above wild-type and its solubility improved from 1.5 mg·mL ⁻¹ to > 40 mg·mL ⁻¹
<u>Lipase Lip2</u> (<i>Yarrowia lipolytica</i>)	Saturation mutagenesis	Two single-mutants, one with a two-fold improvement and one with five-fold improvement in half-life at 50 °C over wild-type, were obtained
Lip A (<i>Bacillus subtilis</i>)	Saturation mutagenesis	After several more rounds of iterative saturation mutagenesis, two variants were obtained with half-lives at 55 °C of 905 and 980 min, compared to wild-type which was < 2 min

Digerisce le pectine → maggiore estrazione di succo

Digerisce l'amido durante i processi fermentativi (Birrificazione)

Caseificazione, produzione di aromi

Mutanti per la identificazione di nuove forme di GFP



La Green Fluorescent Protein (GFP) è una proteina fluorescente di 238 aa espressa nella medusa *Aequorea victoria*.

