

INGEGNERIA DI PROTEINE: L' AVIDINA E I SUOI MUTANTI

*C. Rosano*¹, *E. Sabini*², *E. Nardone*³, *P. Arosio*³ e *M. Bolognesi*¹

¹Centro Biotecnologie Avanzate – IST e Dip. di Fisica INFN Università di Genova, Largo R. Benzi 10, 16132 Genova ²Department of Chemistry, University of York, Heslington, YO1 5ES, York (UK) ³DIBIT, Istituto Scientifico S. Raffaele, Via Olgettina 58, 20132 Milano

L' Avidina è una proteina carica positivamente che si trova nel bianco d' uovo dei rettili e degli uccelli la cui funzione è quella di trasportare la vitamina H (biotina). L' interazione fra avidina e biotina non è di tipo covalente ma è estremamente forte (la costante di dissociazione K_D è dell' ordine di 10^{-15} M). Inoltre il legame tra proteina e vitamina è estremamente rapido e praticamente irreversibile. Questa caratteristica rende l' avidina estremamente interessante per le sue applicazioni sia *in vitro* che *in vivo*: l' avidina può essere utilizzata nella purificazione delle proteine, in altre tecniche di biologia molecolare o, *in vivo*, per il *targeting* dei tumori solidi.

L' avidina ricombinante ed il mutante K3E, K9E, R26D, R124L, sono stati espressi in *E.coli*. Dopo il necessario processo di rinaturazione, le due proteine hanno mostrato una inalterata attività di legame per la biotina. Cristalli delle due proteine ricombinanti sono stati ottenuti da soluzioni di PEG o di ammonio solfato (rispettivamente) e i dati di diffrazione di raggi X sono stati raccolti a 2.2 Å di risoluzione massima. Le strutture tridimensionali delle due proteine sono state determinate con la tecnica del *molecular replacement* e raffinate fino a valori del fattore R di 0.179 e 0.170 per l' avidina ricombinante e per il mutante rispettivamente.

Sia la proteina ricombinante che il suo mutante formano cristalli isomorfi nonostante i due cristalli siano cresciuti in condizioni differenti; inoltre, la struttura tridimensionale delle due proteine risulta fortemente conservata rispetto all' avidina naturale; in particolare ciÚ si verifica nel sito di legame della biotina. Il lavoro di ingegneria proteica che ha portato alla costruzione del mutante è stato dettato dalla necessità di evitare un eccesso di cariche negative sulla superficie della proteina, per le possibili applicazioni *in vivo* dell' avidina.