



DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea in Scienze Biologiche L-13

Ruolo biologico della proteina carotenoide arancione nei processi di fotoprotezione e sue possibili applicazioni in biologia sintetica

Biological role of the orange carotenoid protein in photoprotection processes and possible applications in synthetic biology

Tesi di Laurea di:
Fastellini Celeste
Anno accademico 21\22

Docente relatore:
Gerotto Caterina

FOTOSINTESI OSSIGENICA

La fotosintesi è quel processo biochimico che trasforma l'energia luminosa in energia chimica e il carbonio inorganico in composti organici.

La luce ha sia proprietà di onda che di *particella*, ossia un fotone che trasporta una quantità di energia inversamente proporzionale alla sua lunghezza d'onda.

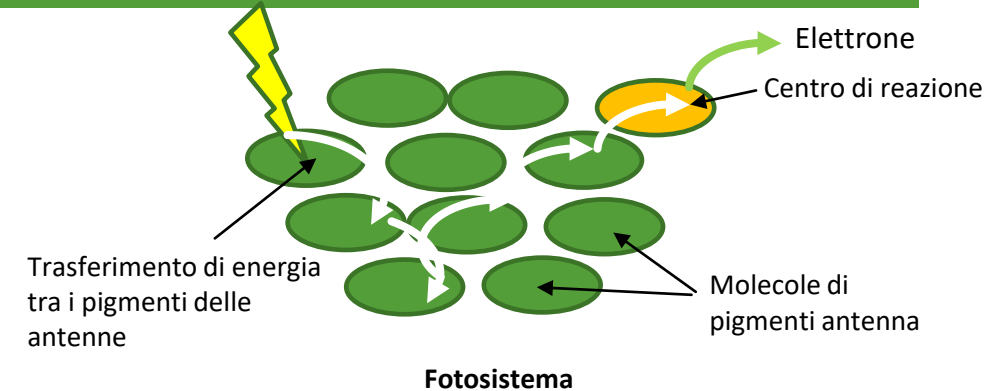
Esso viene assorbito dai pigmenti solo quando l'energia che trasporta è pari alla differenza di energia che vi è tra lo stato fondamentale dell'elettrone e il suo stato eccitato.

La luce a diverse lunghezze d'onda viene assorbita dalle proteine antenna, complessi proteina-pigmento che convogliano l'energia verso i centri di reazione dei fotosistemi dove viene usata per fare separazione di carica.

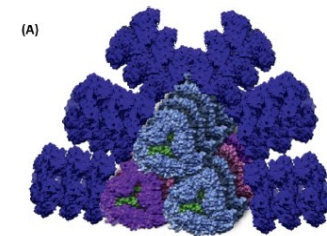
I fotosistemi sono complessi molecolari composti da:

- Core:
 - centro di reazione: separazione di carica;
 - antenne del core;
- Antenne accessorie: complessi proteina-pigmento che catturano la luce.

Un sistema antenna tipico dei cianobatteri (e delle alghe rosse) è il ficobilisoma (PBS), insieme di pigmenti ficobiline, ognuna delle quali ha assorbimento specifico, e polipeptidi (McGraw-Hill, 2007).



Schematizzazione del passaggio di energia da molecole di pigmenti antenna al centro di reazione.

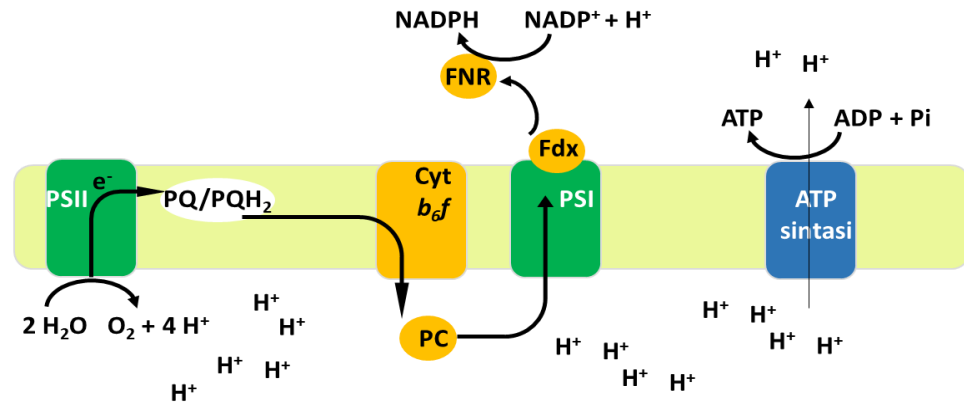


Struttura ficobilisoma.

Da Muzzopappa e Kirilovsky, 2020

REGOLAZIONE DELLA FOTOSINTESI

Gli elettroni generati dalla separazione di carica entrano all'interno della catena di trasporto elettronica:



Schematizzazione della catena di trasporto elettronica lineare.

insieme di complessi proteici posti sulla membrana tilacoidale volti a trasportare gli elettroni eccitati delle molecole di clorofilla del centro di reazione. In questa fase il complesso evolvente ossigeno (OEC) compie fotolisi di molecole d'acqua dalla quale si liberano nel lume protoni usati dal complesso ATP sintasi a valle della catena per generare ATP da ADP.

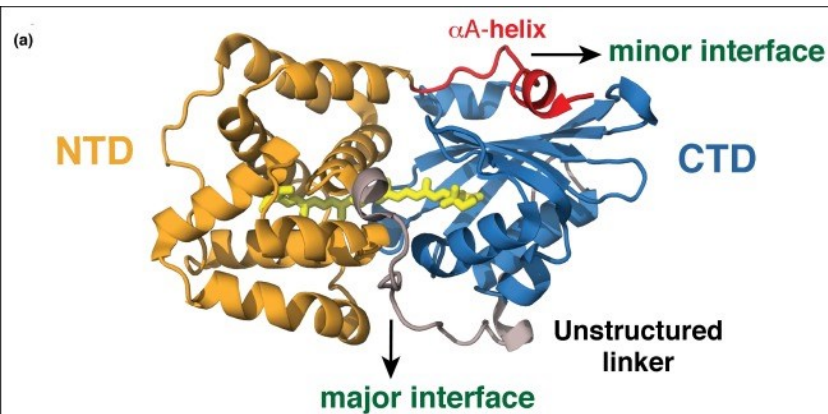
In presenza di troppa luce la catena diviene sovra-ridotta e le molecole di clorofilla che non riescono a estinguere l'eccitazione reagiscono con l'ossigeno per generare delle specie reattive (ROS). Per evitare il danneggiamento dei fotosistemi i vegetali hanno escogitato dei meccanismi di regolazione della fotosintesi, tra cui la dissipazione di energia in eccesso sotto forma di calore.

Questo è un processo conservato nel corso dell'evoluzione ma regolato da proteine diverse nei diversi gruppi vegetali:

- Proteina OCP nei cianobatteri;
- Proteina LHCSR nelle alghe;
- Proteina PSBS nelle piante.

STRUTTURA MOLECOLARE OCP E LEGAME PROTEINA-PIGMENTO

L' OCP è la proteina che regola il processo di fotoprotezione all'interno dei cianobatteri ed è costituita da due diversi domini di dimensioni e funzioni differenti che legano un carotenoide.



Dominguez-Martin & Kerfeld, 2019

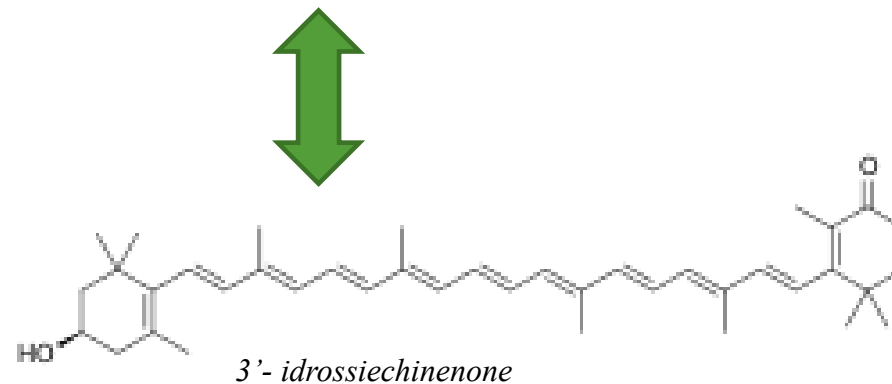
- dominio CTD regolatore
 - dominio NTD attivo
- } collegati da una alpha-elica di 20 amminoacidi

L'interazione tra queste componenti origina due interfacce:

- ❑ Interfaccia maggiore:
 - ponti salini tra gruppi laterali di residui di amminoacidi dei due domini;
- ❑ Interfaccia minore:
 - interazioni idrofobiche tra foglietto β di CTD e braccio N-terminale.

La proteina prende contatto con un pigmento cheto-carotenoide tramite i seguenti legami:

- Legame idrogeno tra aa Y201 e W288 di CTD e gruppo carbonilico di β -1;
 - Legami π tra anello β 2 e aa con Y44 e W110 di NTD.
- (Kerfeld et al., 2003).

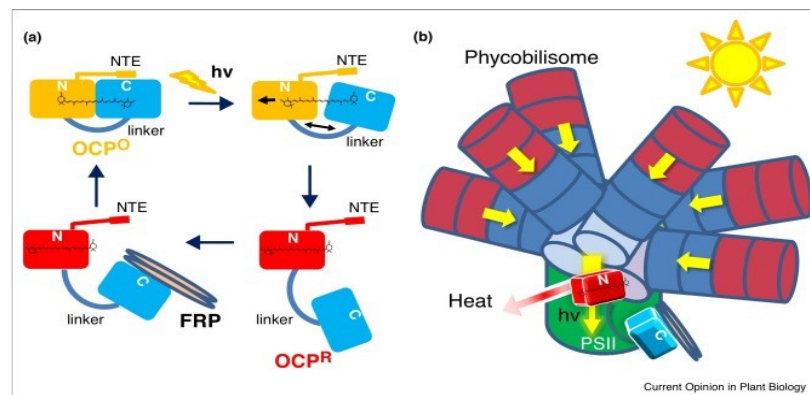


β -carotenoide costituito da una catena idrocarburica e 2 anelli cicloesaenici.

FOTOCICLO OCP

Quando un lampo di luce blu-verde colpisce OCP nella sua forma chiusa e inattiva (OCP^O), essa subisce una serie di cambiamenti reversibili che portano ad avere una forma attiva (OCP^R). Questi sono:

- Rottura legami idrogeno tra il cheto-ossigeno dell'anello β 1 del carotenoide e Trp-288 e Tyr-201 nel CTD;
- Traslocazione del carotenoide di 12 Å nell'NTD;
- Rottura interazioni tra braccio N-terminale e CTD;
- Rottura legami tra i due domini.
- Cambiamento di colore di OCP da arancione a rosso.

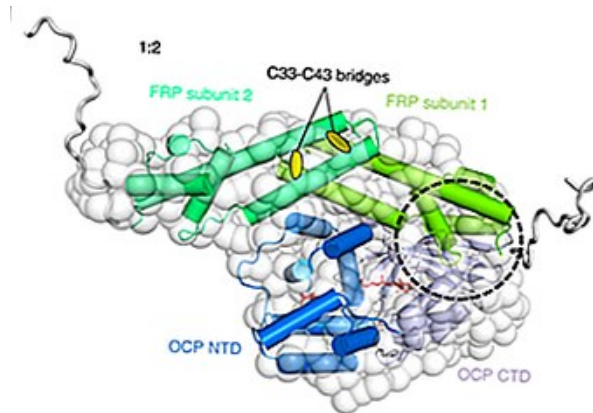


In OCP^R i domini sono completamente separati e il carotenoide è racchiuso nel NTD. L'NTD contenente carotenoidi può quindi stabilire interazioni con il ficobilisoma (PBS), antenna periferica per la raccolta della luce normalmente altamente efficiente, trasformandola in modo reversibile in uno stato fotoprotettivo e quindi indurre l'estinzione di energia. L'amminoacido R155 nell'interfaccia centrale NTD-CTD svolge un ruolo essenziale nella creazione dell'interazione OCP-PBS

RECUPERO DELLO STATO FONDAMENTALE

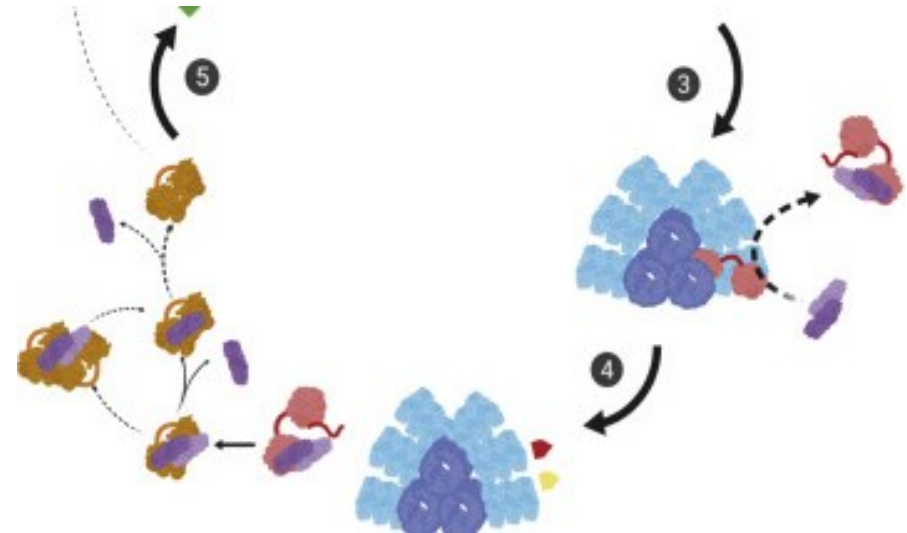
OCP^R e OCP^O sono due forme della stessa proteina reversibili l'una nell'altra dipendentemente dalle condizioni ambientali o dall'interazione con altre proteine.

La reversione relativamente lenta e al buio da OCP^R a OCP^O mostra una grande dipendenza dalla temperatura e deve avvenire al buio e può essere accelerata dalla **proteina di recupero della fluorescenza (FRP)**.



Sluchanko et al., 2018

Essa si lega a una regione del foglietto β del dominio C-terminale che è esposto al solvente in OCP^R ma parzialmente ostruito nell'OCP^O dai primi amminoacidi del braccio N-terminale. Il legame con FRP rompe i legami tra OCP e PBS.



Muzzopappa et al., 2020

CARATTERISTICHE MODULABILI DI OCP

Esistono diverse isoforme di OCP che differiscono tra loro in base a delle caratteristiche utili per applicazioni biotecnologiche come l'affinità tra i due domini, il tempo di fotoconversione e di recupero dello stato fondamentale e il legame con differenti carotenoidi.

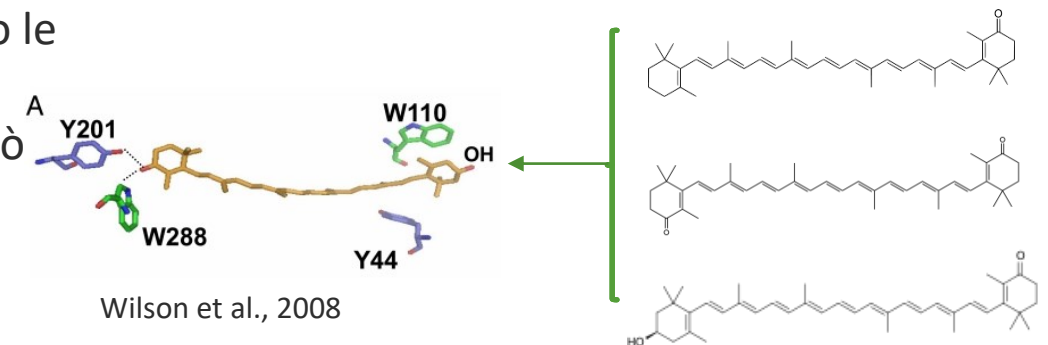
CONFRONTO TRA FAMIGLIE PARALOGHE DI OCP

Eseguendo un'analisi filogenetica sono state caratterizzate nuove famiglie OCP paraloghe distribuite tra genomi di cianobatteri di diverse specie, indicate con OCP2 e OCPx che differiscono tra loro e da OCP1 (Lechno Youssef et al., 2017).

Tipi di OCP	$T_{1/2}$ fotoconversione 23°	$T_{1/2}$ fotoconversione 15°	$T_{1/2}$ recupero al buio 23°
OCP1	0,7 min	0,7 min	Legame con FRP
OCP2		2,9 min	11,1 min

LEGAMI CON DIVERSI CAROTENOIDI

La scelta del carotenoide fornisce un altro mezzo per mettere a punto le proprietà delle coppie NTD-CTD, sia nella risposta alla luce che nelle proprietà di dissociazione/riassociazione. L'assorbimento dell'OCP può essere modificata scegliendo il carotenoide o alterando i residui che compongono le tasche di legame del carotenoide. Il legame specifico del pigmento influenza anche la fotoattivazione: si rilevano diversi risultati in presenza di 3-idrossiechinenone, pigmento nativo di OCP e altri carotenoidi testati, come ad esempio echinenone e cantaxantina (Dominguez-Martin & Kerfeld, 2019).



UTILIZZO DI OCP IN APPLICAZIONI DI BIOLOGIA SINTETICA

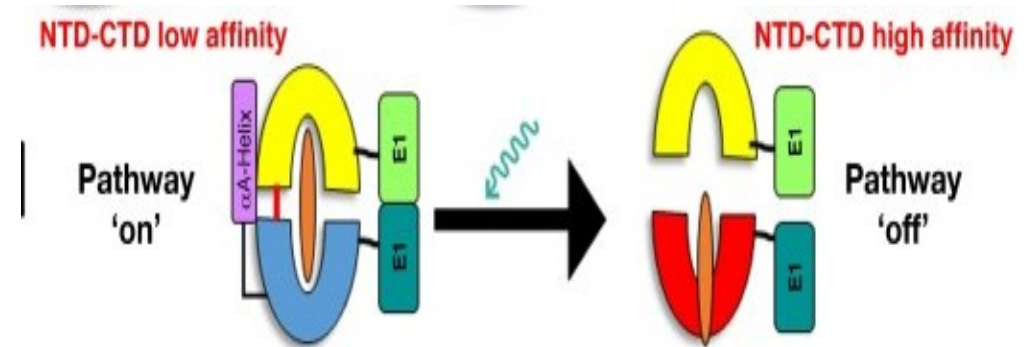
La dissociazione e conseguente riassociazione delle due subunità della proteina OCP in relazione a cambiamenti ambientali fanno sì che essa possa essere oggetto di studi e applicazioni in ingegneria sintetica.

□ REGOLAZIONE PROCESSI BIOLOGICI

La modulazione dei processi biologici dipendentemente dalla luce getta le basi per l'utilizzo di OCP in applicazioni optogenetiche. L'idea di base dell'optogenetica è infatti quella di regolare il funzionamento di processi biologici utilizzando la luce. Un esempio è l'inattivazione di un enzima allosterico in conseguenza all'arrivo di un fotone.

Esempio:

fondendo le due subunità di OCP separatamente con un dominio essenziale di un enzima allosterico esso sarà attivo. Illuminando OCP con un lampo di luce blu\verde le due subunità NTD e CTD per i motivi sopra citati si separeranno e conseguentemente anche le due subunità dell'enzima che risulterà a questo punto inattivo. Si andrà quindi a bloccare la via metabolica in presenza di luce.



Dominguez-Martin & Kerfeld, 2019

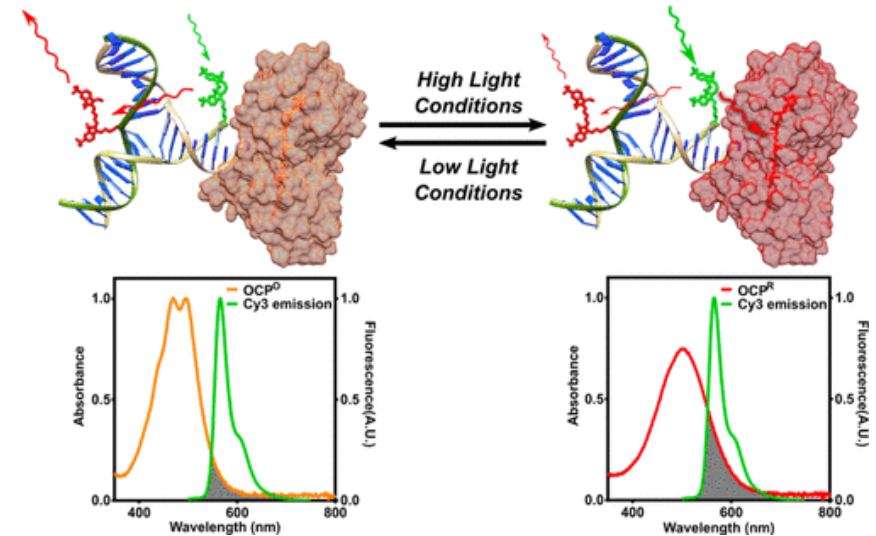
UTILIZZO DI OCP IN APPLICAZIONI DI BIOLOGIA SINTETICA

□ COSTRUZIONE DI SISTEMI ANTENNA SINTETICI

All'interno delle antenne la presenza e l'organizzazione dei carotenoidi attorno alle molecole di clorofilla è fondamentale in quanto essi possono passare da una modalità di raccolta della luce a una modalità di fotoprotezione in base all'intensità luminosa. OCP è stato utilizzato per costruire complessi antenna artificiali e questo lavoro si concentra sull'utilizzo dello spostamento spettrale del cofattore OCP sulla fotoconversione come mezzo per introdurre una modulazione dipendente dalla luce dell'efficienza di trasferimento di energia tra due coloranti target.

Esempio:

utilizzando una molecola a tripla elica di DNA come impalcatura è stato costruito un sistema di antenne composto da coloranti organici (Cy3 e Cy5) e l'OCP è stato assemblato su di esso. Cy3 si comporta da donatore e Cy5 da accettore di energia. Sotto un'illuminazione intensa, l'energia viene parzialmente trasferita a anche OCP^R. Questi risultati dimostrano la fattibilità del controllo del percorso di trasferimento dell'energia utilizzando l'intensità della luce in un sistema di raccolta della luce ingegnerizzato.



RIASSUNTO ESTESO

La fase luminosa della fotosintesi avviene sulla membrana tilacoidale dove si trovano i fotosistemi I e II, complessi costituiti da core e antenne accessorie. Il core comprende il centro di reazione costituito dal dimero speciale (P680 e P700) che fa separazione di carica con l'arrivo di un lampo di luce di una lunghezza d'onda adeguata quindi con una quantità di energia pari alla quantità di energia che passa tra lo stato fondamentale di un elettrone della molecola di pigmento e il suo stato eccitato. Questo elettrone entra nella catena di trasporto elettronico, ossia un insieme di complessi proteici volti a produrre potere riducente e ATP. In presenza di troppa luce la catena di trasporto elettronico diventa eccessivamente ridotta e si possono formare specie reattive a causa dell'instaurazione di un'interazione diretta tra ossigeno e stati eccitati di clorofilla e del trasferimento di elettroni alle molecole di ossigeno e questo causa gravi danni ai fotosistemi. Per ovviare a ciò i vegetali hanno sviluppato dei meccanismi di fotoprotezione tra cui uno dei più importanti e più conservati è la dissipazione dell'eccesso di energia raccolta sotto forma di calore. A non essere conservate durante l'evoluzione sono le proteine che regolano questo processo, infatti nelle piante troviamo la proteina PSBS, nelle alghe LHCSR e nei cianobatteri la proteina carotenoidica arancione (*Orange carotenoid protein, OCP*). Questa è costituita da un carotenoidico e due domini proteici distinti (detti NTD e CTD) e l'interazione tra essi porta ad avere due isoforme, reversibili l'una nell'altra, una arancione e l'altra rossa in seguito all'assorbimento di un lampo di luce blu-verde intenso. L'OCP attivo rosso si lega ai ficobilisomi (PBS), complesso antenna costituito da diversi tipi di pigmenti e in questa forma consente a PBS di dissipare l'energia sotto forma di calore. Alcune delle caratteristiche fondamentali di OCP come l'affinità tra i due domini, il tempo di fotoconversione, la riconversione nella forma inattiva al buio e l'assorbimento della luce variano in base a diverse isoforme esistenti e in base al loro legame con diversi carotenoidi. L'associazione e dissociazione dei due domini NTD e CTD dipendentemente dalla luce ha suscitato l'interesse per questa proteina per diverse applicazioni della biologia sintetica come la costruzione di sistemi antenna artificiali e il controllo dell'attività enzimatica nell'attivazione o disattivazione di vie metaboliche.

BIBLIOGRAFIA

A. Andreoni, S. Lin, H. Liu, R. E. Blanckenship, H. Yan, N. W. Woodbury, «Orange Carotenoid Protein as a Control Element in an Antenna System Based on a DNA Nanostructure» *Nano Lett.* 17, 1174-1180, 2017.

C.A. Kerfeld, M. Sawaya, V. Brahmandam, D. Cascio, K. Ho, C. Trevithick-Sutton, D. Krogmann, T. Yeate, «The crystal structure of a cyanobacterial water-soluble carotenoid binding protein» *Structure* 11(1), 55-65, 2003.

CH. Bao, M. R Melnicki and C.A Kerfeld, «Structure and functions of Orange Carotenoid Protein homologs in cyanobacteria» *Current Opinion in Plant Biology* 37, 1–9. 2017.

F. Muzzopappa, D. Kirilovsky, « Changing Color for Photoprotection: The Orange Carotenoid Protein» *Trends in plant science* 25 (1), 92-104, 2020.

M.A. Dominguez-Martin, C. A. Kerfeld, “Engineering the orange carotenoid protein for applications in synthetic biology” *Current Opinion in Structural biology* 57, 110-117, 2019.

Nikolai N. Sluchanko, Yury B. Slonimskiy, Evgeny A. Shirshin, Marcus Moldenhauer, Thomas Friedrich & Eugene G. Maksimov, «OCP–FRP protein complex topologies suggest a mechanism for controlling high light tolerance in cyanobacteria» *NATURE COMMUNICATIONS*, 9, 3869.

McGraw-Hill, « Photosynthesis» *Encyclopedia of Science and Technology* 13, 469, 2007.

Sigal Lechno-Yossef, Matthew R. Melnicki, Han Bao, B. L. Montgomery, C.A. Kerfeld, «Synthetic OCP heterodimers are photoactive and recapitulate the fusion of two primitive carotenoproteins in the evolution of cyanobacterial photoprotection» *Plant J*, 91(4), 646-656, 2017.

Wilson, C. Punginelli, A. Gall, C. Bonetti, M. Alexandre, J.-M. Routaboul, C.A. Kerfeld, R.V. Grondelle, B. Robert, J.T.M. Kennis, *et al.*, «A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor» *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12075-12080, 2008.