

# APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE ▶ DEI CARBOSSISOMI

*Tesi di laurea di: Giorgio Iuliatti*

*Docente referente: Caterina Gerotto*

# RIASSUNTO ESTESO

L'enzima ribulosio-1,5-bisfosfato carbossilasi/ossigenasi (RuBisCO, enzima chiave per la fissazione fotosintetica del carbonio) presenta substrati competitivi,  $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ , e quindi può introdurre quest'ultimo nella struttura del RuBP-enediolato, formando l'intermedio idroperossido che scinde spontaneamente in 3-fosfoglicerato e 2-fosfoglicolato tossico per la cellula (FOTORESPIRAZIONE).

I carbossisomi sono compartimenti tipici di cianobatteri e batteri aerobici obbligati come *Halothiobacillus neapolitanus*, e sono unici tra i compartimenti proteici per la loro capacità di concentrare  $\text{CO}_2$  facilitando l'attività carbossilasica della Rubisco. Sono il sogno di ogni biotecnologo per la loro capacità di autoassemblarsi in diversi organismi con un insieme di parti biologiche standard.

Il ruolo dei carbossisomi è quello di creare dei compartimenti all'interno della cellula e quindi di organizzare spazialmente la compartimentazione proteica e aumentare localmente la concentrazione di enzimi e substrati, prevenire la fuoriuscita di intermedi tossici, creare dei microambienti che si distinguono da quelli del citoplasma esterno poiché si avranno variazioni di pH e stati redox.

- ▶ Le piante C3 non possiedono un meccanismo di concentrazione del carbonio (CCM) per evitare la fotorespirazione, è stato quindi introdotto nel genoma di una pianta di tabacco l'operone *csd* per permettere l'espressione dell' $\alpha$ -carbossisoma nei cloroplasti.
- ▶ Un altro uso nel campo della biotecnologia è quello di introdurre il guscio vuoto del carbossisoma in batteri e usarlo per l'introduzione di enzimi eterologhi.

L'introduzione del carbossisoma in piante C3 è una delle strade che si sta percorrendo nell'ambito delle manipolazioni intraprese per migliorare l'efficienza della fotosintesi.

Gli esempi presi in esame utilizzano l' $\alpha$ -carbossisoma del batterio aerobico obbligato *Halothiobacillus neapolitanus*, che rappresenta uno dei carbossisomi coinvolti nel ciclo globale del carbonio, le ampie informazioni disponibili lo rendono un candidato ideale per la progettazione di moduli di assimilazione del carbonio in organismi non nativi.

# *RuBisCO*

## l'enzima più abbondante del pianeta Terra

### Geni, folding e proteine

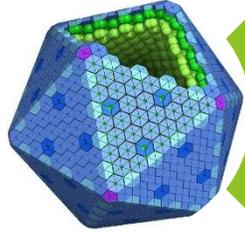
- ▶ rbcS e rbcL
- ▶ RbcL<sub>8</sub>RbcS<sub>8</sub>

### Via metabolica

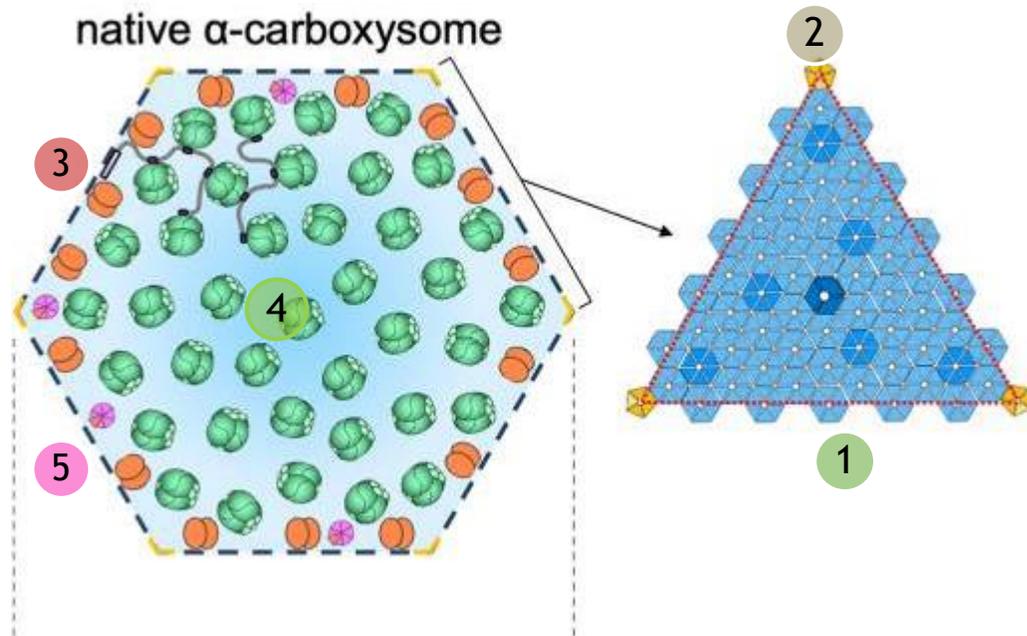
- Ciclo di Calvin-Benson (organizzazione CO<sub>2</sub> e viene divisa in 3 fasi)
- *Fotorespirazione* (introduzione O<sub>2</sub> e formazione di intermedi tossici)

### Attivazione

- RuBisCO attivasi tramite idrolisi provoca un cambiamento conformazionale



# CARBOSSISOMA



1. CsoS1A (blu/azzurro) → STRUTTURA
2. CsoS4A (giallo) → STRUTTURA
3. CsoSCA (arancio) →  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$
4. RuBisCO (verde) →  $3 \text{ D-ribulosio 1,5-disfosfato} + 3\text{CO}_2 + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 6 \text{ Acido-3-fosfoglicerico} + 6 \text{ H}^+$  (carbossilazione)
5. CbbQO (rosa) → ATTIVASI

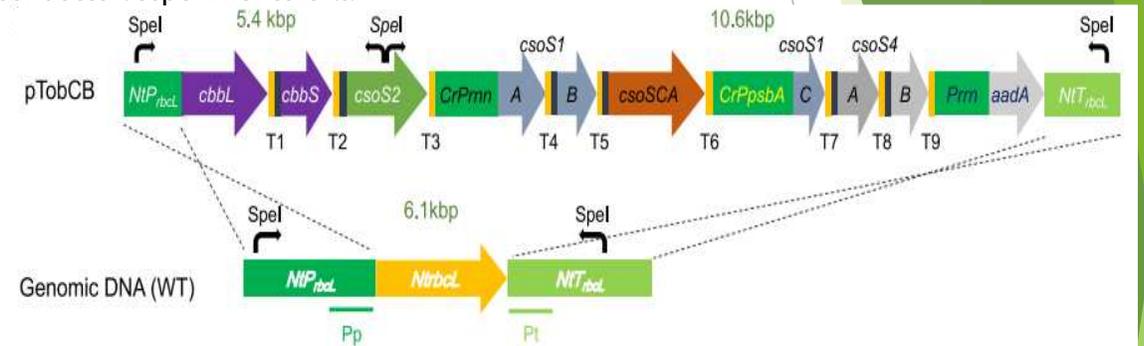
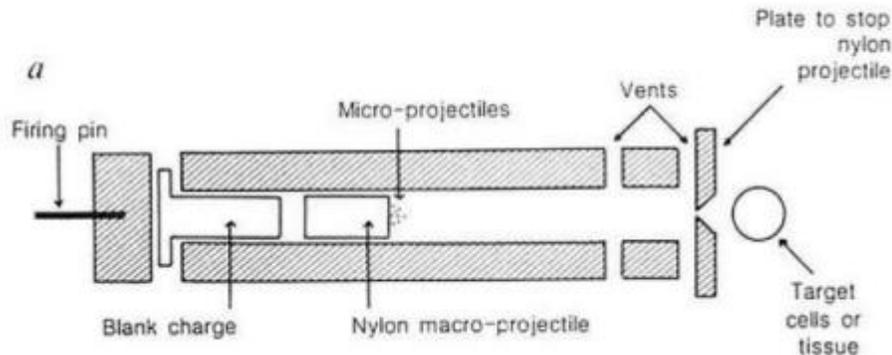
# $\alpha$ -carbossisoma nel cloroplasto

Inserimento in una pianta c3

L'  $\alpha$ -carbossisoma del batterio aerobico obbligato *Halothiobacillus neapolitanus* è un eccellente modello di studio. La pianta su cui è stato condotto l'esperimento è la pianta comune del tabacco.

Le piante C3 non hanno un meccanismo per evitare la fotorespirazione come le C4 e CAM

Trasformazione diretta con DNA: Biobalistica



## Vettore pTobCB

- ▶ Hn RuBisCO
- ▶ *csoS2* (gene che traduce per la proteina linker che ancora RuBisCO al guscio)
- ▶ *csoS4A*
- ▶ *csoS1A*
- ▶ *csoSCA*
- ▶ elementi per la trascrizione genica

5

# Discussione dei risultati

La presenza del carbossisoma e il suo funzionamento sono stati confermati da:

- ▶ SDS-page e immunoblot (espressione del gene)
- ▶ Tamponi  $\Delta$ pH (corretto funzionamento)

Le linee transgeniche ottenute sono in grado di crescere solamente in un terreno suolo-aria 1% di  $\text{CO}_2$  (v/v) e i carbossisomi presenti hanno riscontrato una riduzione della capacità di organizzazione del 30%.

Sono state proposte delle soluzioni per ovviare al problema.

## APPROCCI DI ULTERIORE INGEGNERIA GENETICA

- *trasportatori  $\text{HCO}_3$*
- *iRNA (RNA interferente)*
- *anidrasi carbonica vettoriale (vCA)*

# $\alpha$ -carbossisoma in *E.coli*

Introduzione guscio minimo (Cso-shell)

## Inserimento del vettore per il Cso-shell

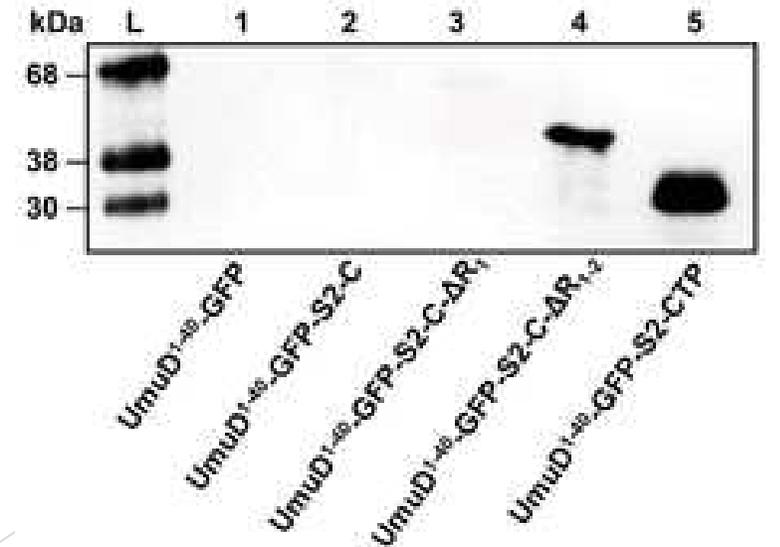
Per la realizzazione del guscio minimo non serve l'espressione di tutto il gene *cso*, qui troviamo evidenziati i geni necessari.



### CsoS2

- regione N-terminale (S2-N)
- regione centrale (S2-M)
- **regione C-terminale (S2-C)**

regione deputata all'inizio dell'assemblaggio del guscio e che sarà marcata con UmuD-GFP



# Introduzione degli enzimi eterologhi nel Cso-shell

Le attività degli enzimi liberi e incapsulati sono stati testati in ambienti perturbati dai seguenti agenti **chimico-fisici**.

- **Temperatura**
- **Metanolo (20% v/v)**
- **Cicli termici**
- **$\Delta$ pH**

Tutti gli enzimi incapsulati hanno diminuito di poco le loro attività enzimatiche mentre gli enzimi liberi si sono dimostrati sostanzialmente inattivi. (Tasso di turn over ottenuto tramite adattamento dei dati alla legge di Michaelis-Menten)

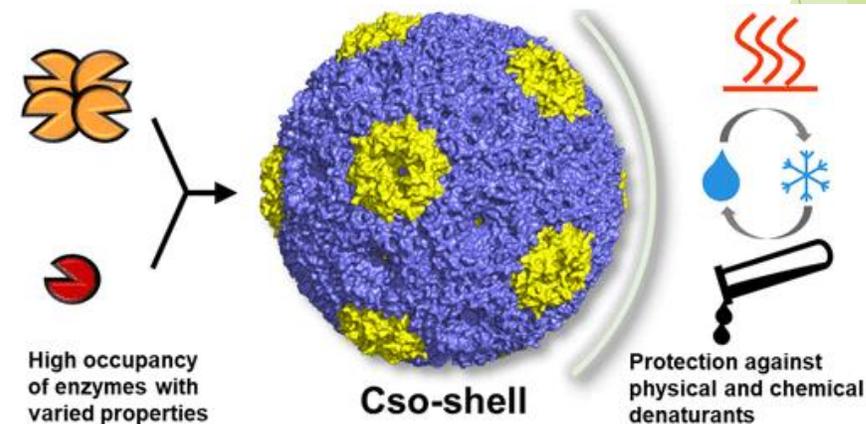
## Enzimi introdotti:

- ▶ **Ascorbato Perossidasi di pisello (APEX2)**



- ▶  **$\beta$ -galattosidasi di E.coli (LacZ)**

catalizza l'idrolisi dei residui terminali di  $\beta$ -D-galattosio nei polisaccaridi noti come  $\beta$ -galattosidi



# CONCLUSIONI

## ► Inserimento in pianta c3

L'urgente bisogno di aumentare la produttività globale, che secondo stime raggiungerà i 50 miliardi entro il 2050, ha suscitato un particolare interesse nel campo della bio-ingegnerizzazione nel migliorare il processo della fotosintesi, dato il suo ruolo fondamentale nella crescita delle piante. Un suo "perfezionamento" garantirebbe il rendimento di produzione della biomassa in correlazione all'aumento della popolazione, in un contesto di un forte cambiamento climatico.

## ► Cso-shell

La stabilità degli enzimi spesso limita la loro utilità, questo esperimento può espandere l'utilità dello shell dalle trasformazioni alimentare al trattamento delle acque reflue dove enzimi come laccasi, perossidasi e nitrilasi spesso risentono di attività ridotte in ambienti a pH elevato.

## Bibliografia

- ▶ Yeates T.O., etc 2011 The protein shells of bacterial microcompartment organelles, Current Opinion in Structural Biology,21:223-23
- ▶ Price G.D., etc 2013 The cyanobacterial CCM as a source of genes for improving photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation in crop species, Journal of Experimental Botany 64:753-68
- ▶ Quan Tan Y., etc 2021 Structure of a Minimal  $\alpha$ -Carboxysome-Derived Shell and Its Utility in Enzyme Stabilization, Biomacromolecules 22:4095-4109
- ▶ Quan Tan Y., etc 2021 Incorporation of Functional Rubisco Activases into Engineered Carboxysomes to Enhance Carbon Fixation, Biomacromolecules 11: 154-161
- ▶ Chen T., etc 2023 Engineering  $\alpha$ -carboxysomes into plant chloroplasts to support autotrophic photosynthesis, Nature Communications 14: 2118

## Sitografia

- ▶ <https://www.microbiologiaitalia.it/>
- ▶ <https://alphafold.ebi.ac.uk/>