

Enzimi psicrofili

Il nostro pianeta è per lo più freddo. L'85% della biosfera nel nostro pianeta si trova a temperature uguali o ~~superiori~~ inferiori ai 5°C. ~~Il 75% non va oltre i 5°C~~ (riportato come da slide e lezione, sembra contraddittorio ma non ho cercato oltre) (leggendo un articolo da lei consigliato: *Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures*. Georges Feller, in effetti non sembra così. Cito:

While hydrothermal locations are sparsely distributed on our planet surface, it is frequently overlooked that most biotopes on Earth are cold and permanently exposed to temperatures below 5 ° C. Such low mean temperatures mainly arise from the fact that ~ 70% of the Earth's surface is covered by oceans that have a constant temperature of 4 ° C below 1000 m depth, irrespective of the latitude. The polar regions account for another 15%, to which the glacial and alpine regions must be added, as well as permafrost representing more than 20% of terrestrial soils. There is no formal lower temperature limit for life under natural conditions, as most microbial species can be maintained for extended periods of time in low temperature freezers at – 80 ° C, then revived under appropriate conditions.

Al freddo succedono vari fenomeni:

- Diminuisce la solubilità della maggior parte delle molecole

Ad esempio, le molecole che i microorganismi usano come nutrienti.

- Aumenta la salinità dell'ambiente
- Il ghiaccio diminuisce la penetrazione della radiazione solare

Si osservano vari effetti nelle cellule:

- Diminuisce la fluidità delle membrane cellulari
- La velocità delle reazioni chimiche diminuisce
- Gli acidi nucleici formano strutture secondarie anomale
- C'è un effetto sul folding delle proteine

Gli ambienti freddi sono comunque popolati da vari organismi, piante, animali, microorganismi. Questi organismi si sono evoluti per adattarsi a queste condizioni ambientali e contrastare gli effetti del freddo. Gli organismi di nostro interesse sono i microorganismi, definiti psicrofili.

Gli psicrofili includono microrganismi nei regni *Bacteria*, *Archaea* (i più estremi) ed *Eucaria*. Data l'abbondanza di zone fredde sulla terra, gli organismi psicrofili sono i più abbondanti estremofili in termini di biomassa, diversità e distribuzione.

Tra gli psicrofili distinguiamo:

- Psicrotolleranti

(crescono a temperature che si avvicinano agli 0°C, l'optimum è a circa 20°C)

- Psicrofili

Hanno temperatura ottimale di crescita al di sotto dei 15°C, e non sopravvivono oltre i 20°C.

Molti microorganismi psicrofili producono le Cold Acclimation Proteins (CAPs), anche dette Cold Shock Proteins (CSPs). Il freddo è una condizione di stress che induce la sintesi di particolari proteine. Le CSPs sono chaperoni degli acidi nucleici ed impediscono la formazione di strutture secondarie nell'RNA.

Vengono prodotte anche proteine antifreeze. Queste proteine impediscono la formazione di cristalli di ghiaccio nelle cellule.

Alle basse temperature diminuisce la fluidità delle membrane cellulari. Nelle membrane degli organismi psicrofili troviamo un alto contenuto di acidi grassi insaturi o altamente ramificati.

Conseguenza di questa composizione è una minor compattezza della membrana cellulare.

Gli organismi psicrofili producono enzimi che hanno un'alta attività specifica a bassa temperatura.

Cold active enzymes

Il problema della catalisi al freddo è descritto dall'*equazione di Arrhenius*:

$$k = Ae^{-\Delta G^\ddagger/RT}$$

Dall'equazione si vede che la costante specifica di velocità cresce esponenzialmente con la temperatura. All'abbassamento della temperatura la velocità di reazione diminuisce anche sensibilmente.

La temperatura ottimale di tanti enzimi psicrofili considerati è intorno ai 30 – 35 °C (Santiago et al, 2016). Alcuni psicrofili producono enzimi con optimum anche più alti.

Studiando enzimi psicrofili, l'importante è controllare quanta attività rimane alla riduzione della temperatura.

La **cold-activity** non si definisce in base all'optimum di temperatura, ma in base alla capacità di essere attivi anche a bassa temperatura.

Catalisi

C'è una netta differenza nell'optimum di temperatura e c'è una grande differenza nell'attività a bassa temperatura.

Termostabilità

Dalle curve di stabilità si evince che la stabilità dello psicrofilo diminuisce rapidamente all'aumentare della temperatura.

Questo ha portato ad una definizione generale.

Gli enzimi psicrofili sono attivi a bassa temperatura, ma sono poco stabili a temperature medie e alte.

Non è detto comunque che gli enzimi degli psicrofili si denaturino facilmente con il caldo.

Caratteristica comune delle proteine psicrofile è essere strutture *particolarmente flessibili*.

Si è studiato da cosa possa dipendere la bassa stabilità. Gli psicrofili, al contrario dei termofili hanno particolari caratteristiche:

- Gli enzimi psicrofili hanno più loop
- Cavità più grandi
- Hanno particolari caratteristiche nella composizione amminoacidica.

Sappiamo che ci sono microorganismi che producono enzimi attivi al freddo. Il mantenimento della capacità catalitica al freddo deriva da una struttura proteica particolarmente flessibile. La flessibilità è dipendente dalla composizione amminoacidica e ad alcune soluzioni strutturali.

Le proteine degli psicrofili sono quindi più flessibili e tendono ad essere meno stabili all'aumento della temperatura.

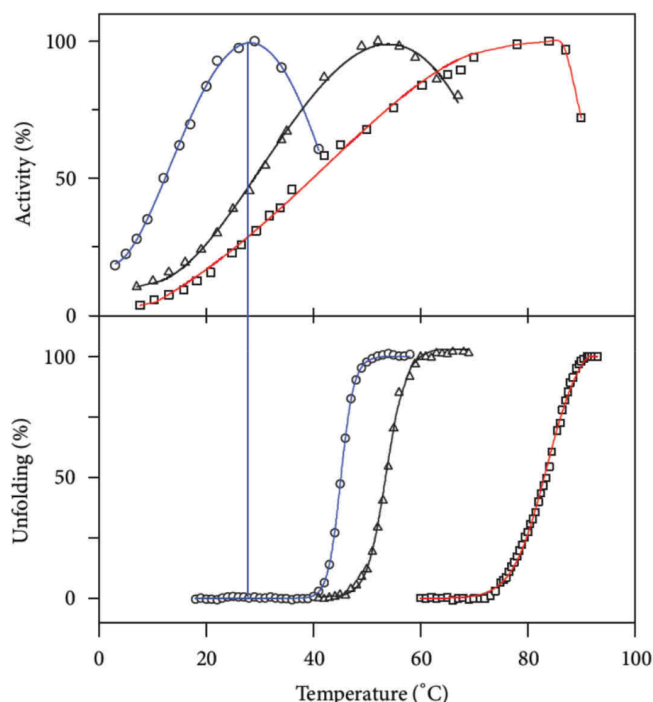
Nell'immagine a destra, se seguiamo la linea rossa (enzima termofilo), vediamo che l'attività cresce all'aumentare della temperatura fino a raggiungere un optimum, dopo il quale l'attività diminuisce bruscamente. Guardando il grafico in basso ci accorgiamo che l'attività diminuisce perché la proteina denatura.

Anche nella proteina mesofila (in nero) c'è una discreta corrispondenza tra temperatura di diminuzione dell'attività e temperatura di denaturazione.

Nella proteina psicrofila invece vediamo che l'optimum di attività è intorno ai 28°C, mentre l'enzima non denatura se non oltre i 40°C.

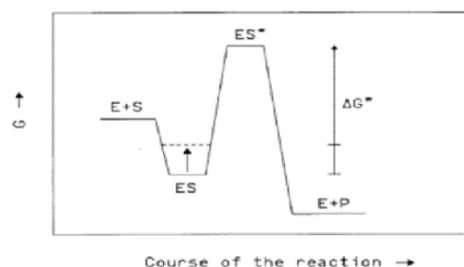
Vuol dire che attività e struttura sono in qualche modo disaccoppiate.

Le proteine psicrofile sono spesso più flessibili nei pressi del sito attivo, per cui la perdita di attività si può avere anche a temperature in cui la proteina è foldata.



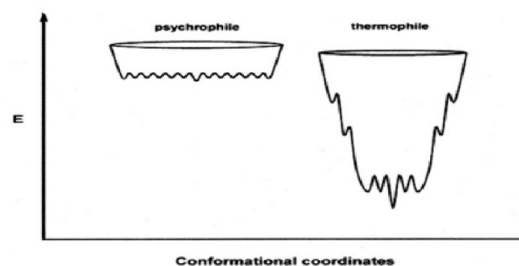
Ci sono diverse tecniche che ci permettono di seguire il processo di folding (da forma denaturata a forma nativa) e l'unfolding (da forma nativa a forma denaturata).

Avere un sito attivo più flessibile comporta che il complesso enzima-substrato ha una energia libera più alta (linea tratteggiata), per cui la barriera dell'energia di attivazione per questo enzima è minore rispetto all'omologo mesofilo, perché si parte da una energia maggiore.



Nell'imbuto di folding (folding funnel) ciò che si osserva è che all'inizio del folding l'entropia e l'energia libera sono alte. Man mano che la proteina si folda diminuisce sia l'entropia che l'energia libera. La proteina nello stato nativo è in uno stato a più bassa energia libera, un minimo energetico.

Nel caso degli psicrofili la teoria proposta è quella che non ci sia un minimo globale accentuato nella ipersuperficie dell'energia potenziale, ma ci siano tanti minimi possibili, specialmente nella regione del sito attivo.



Un sito attivo flessibile comporta il fatto che l'enzima cambia la sua K_m , che è la specificità per il substrato. Se l'enzima è più flessibile formerà meno legami col substrato ed avrà una K_m più alta.

Si stanno studiando proprio gli enzimi psicrofili per valutarne la promiscuità.

Si è visto che la α -amilasi psicrofila rispetto allo stesso enzima mesofilo ha sempre una K_m più alta. Anche la K_{cat} è più alta. L'enzima psicrofilo quindi compensa una diminuzione nella specificità di substrato con una efficienza catalitica più alta. Il rapporto K_{cat}/K_m seppur un po' più bassa di quella dell'enzima mesofilo, riesce ad avvicinarsi a buoni livelli di efficienza.

Santiago ha analizzato una analisi su circa 100 enzimi estremofili andando a confrontare alcune caratteristiche, tra cui temperature ottimali di attività e stabilità.

È stata isolata una superossido dismutasi da *Deschampsia antarctica* che, nonostante sia stata ricavata da un organismo psicrofilo, è stabile ad 80°C. Questo contraddice la prima ipotesi fatta, cioè che la stabilità al freddo causi sempre instabilità all'aumento di temperatura. Questo comunque può essere vero in certi enzimi, ma non in altri.

Si sa che anche alcuni organismi mesofili e termofili possono produrre enzimi attivi a basse temperature. *Pyrococcus furiosus* produce una beta galattosidasi che ha un optimum ad 80°C ma resta attiva anche a 0°C.

Gli enzimi attivi al freddo sono di grande interesse per le biotecnologie, per vari motivi:

- Attività catalitica a basse temperature

Ci può tornare utile per realizzare processi a basse temperature ed abbassare il consumo di energia.

Possiamo usare substrati che si degradano ad alte temperature.

- Sono termoinstabili

Possiamo semplicemente alzare la temperatura per inattivare l'enzima psicrofilo.

Applicazioni utili:

- Additivi nei detergenti

Permette di lavare a bassa temperatura

- Industria tessile
- Industria alimentare
- Biorisanamento
- Chimica fine

Dove il substrato si degrada facilmente all'aumento della temperatura.

Sono stati messi appunto sistemi di espressione ricombinanti, dove la sequenza di interesse si inserisce nell'organismo modello desiderato. La crescita dell'organismo viene poi effettuata a temperature più basse (dipende dall'organismo scelto e dall'enzima da esprimere).

Tra gli enzimi psicrofili caratterizzati ne troviamo molti utilizzati nell'industria alimentare, quali amilasi, galattosidasi e proteasi.

I vantaggi sono che la bassa temperatura preserva il substrato; si riduce in oltre la crescita di microorganismi contaminanti. Inoltre è facile inattivare gli enzimi alla fine del processo aumentando la temperatura.

Un esempio interessante è una beta galattosidasi psicrofila, che lisa il lattosio in glucosio e galattosio per fare latte senza lattosio, inserita prima dell'imbottigliamento del latte, e che quindi agisce sul latte già nel suo packaging.

Nella panificazione vengono usati diversi enzimi psicrofili per trattare il materiale di partenza.

La xylanasi degrada la emicellulosa degradando il polimero beta-1-4-xilano. Può essere aggiunta nell'impasto per panificazione ed agisce nella fase di riposo dell'impasto, che viene conservato a basse temperature.

La biologia molecolare è un campo importante nell'applicazione degli psicrofili.

Ci sono inoltre aziende che si stanno specializzando in enzimi psicrofili, tra cui Novozymes ed altre piccole aziende, ad esempio NunaZymes.

Proteine che legano l'acqua

Si sapeva che sotto i ghiacciai ci fossero dei laghi. Negli anni '90 si è cercato di raggiungere questi bacini di acqua subglaciale, specialmente alcuni in Antartide, come il lago di Vostok.

In questi bacini l'acqua rimane allo stato liquido per via della pressione del ghiaccio sovrastante. Si è cercata la presenza di organismi viventi e si è osservata la presenza non solo di microorganismi, ma di crostacei, pesci ed altri organismi.

Gli organismi che vivono a temperature molto basse devono affrontare un problema comune, cioè il fatto che l'acqua a 0°C cambia di fase, passando dallo stato liquido allo stato solido, con formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari. I cristalli di ghiaccio sono dannosi perché l'acqua quando congela aumenta di volume, con il rischio di danneggiare le membrane cellulari.

Gli organismi in questione producono enzimi anticongelamento (antifreeze).

Composti come il glicole etilenico, il glicerolo o il trealosio sono usati dall'uomo come antigelo, e sono chiamati *composti colligativi*, perché la loro azione dipende dalla loro concentrazione.

Nei sistemi biologici ci sono composti antifreeze che lavorano in maniera non colligativa, la cui azione non dipende dalla concentrazione, e ne bastano concentrazioni basse per svolgere la loro funzione.

I primi antigelo biologici sono stati trovati alla fine degli anni '60 dal prof. De Vries che descrisse una proteina antigelo presente in alcuni pesci antartici. Ha dimostrato che queste proteine funzionano in concentrazioni millimolari.

Questo campo si sta sviluppando molto negli ultimi anni.

All'inizio si chiamavano proteine antifreeze, mentre adesso si usa il termine più generale di *Ice Binding Proteins* (IBPs). Queste proteine si associano fisicamente ai cristalli di ghiaccio. Queste proteine svolgono due funzioni correlate.

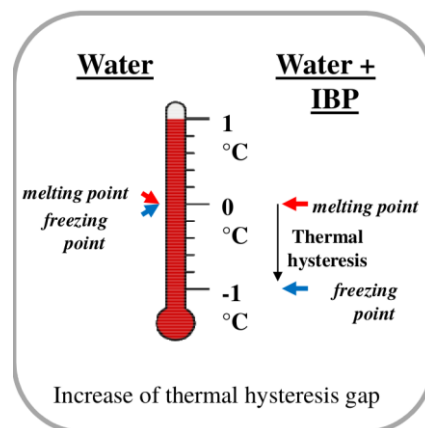
Abbassamento della temperatura di congelamento dell'acqua

Nell'acqua pura la temperatura di congelamento dell'acqua e quella di fusione del ghiaccio coincidono a 0°C. Nella soluzione di acqua ed IBPs il punto di fusione del ghiaccio resta invariato, ma cambia la temperatura di congelamento, che scende sotto lo 0. La IBP abbassa il punto di congelamento dell'acqua; si crea una isteresi termica.

L'effetto varia tra le varie IBP, quelle degli artropodi e dei pesci sono molto attive, riescono a cambiare la temperatura di congelamento anche di 10°C.

Inibizione della formazione dei cristalli di ghiaccio

Un altro effetto è l'inibizione della cristallizzazione del ghiaccio. In alcuni organismi è tollerata la formazione di cristalli di ghiaccio, purché questi siano piccoli.

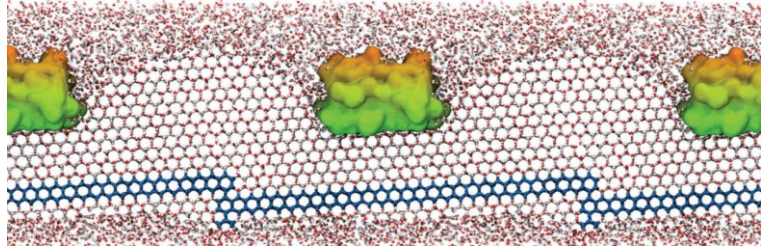


La ricristallizzazione del ghiaccio è quel fenomeno per cui piccoli cristalli di ghiaccio tendono a coalescere e formare cristalli più grandi.

Le IBP possono inibire questo fenomeno e contenere la dimensione dei cristalli.

Le IBP sono molecole che si associano ai cristalli di ghiaccio e interagiscono all'interfaccia tra la fase solida e la fase liquida.

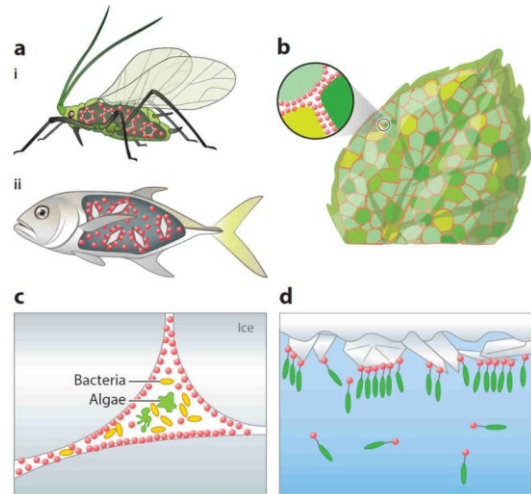
Legandosi al ghiaccio creano delle concavità (dove la proteina si lega) e convessità (dove la proteina non si lega) nel ghiaccio, che rendono più difficile la formazione di cristalli. Questo effetto si chiama Gibbs-Thomson, e grazie a questo è possibile calcolare in modo quantitativo la funzionalità di queste proteine.



Il cristallo di ghiaccio è una struttura tridimensionale con delle facce. Le proteine che legano il ghiaccio lo legano con preferenza su un piano o su due piani, ed effettivamente il piano di legame al cristallo di ghiaccio della IBP ha effetti diversi sia nella temperatura di isteresi (T_h) sia sulla ricristallizzazione del ghiaccio.

IBPs che provengono da organismi diversi si legano a diversi piani del ghiaccio ed hanno effetti diversi sulla temperatura di fusione del ghiaccio. In base alla faccia del cristallo a cui la IBP si lega si avrà una crescita diversa del cristallo.

Gli insetti producono le IBP con gli effetti più potenti che conosciamo sulle proprietà antifreeze.



Le IBPs hanno effetti diversi, illustrati nell'immagine. Nell'immagine *a* vediamo il classico effetto di antifreeze, che abbassa il punto di congelamento dell'acqua. In *b* vediamo come le IBPs riducono la ricristallizzazione del ghiaccio nelle piante. In *c* vediamo l'effetto di *ristrutturazione del ghiaccio*; in questi casi le IBPs vengono legate alla membrana ed esposte in ambiente extracellulare, oppure direttamente secrete all'esterno della cellula. Nell'ambiente extracellulare le IBPs formano dei piccoli canali in cui l'acqua rimane liquida, e da cui le cellule riescono a ricavare nutrienti.

In *d* vediamo un'altra funzione che è quella di permettere l'adesione, dei batteri che la esprimono sulla membrana, sulla superficie del ghiaccio.

Struttura delle IBPs

Sono state ottenute le strutture tridimensionali di diverse IBPs. Si è visto che IBPs con funzioni diverse hanno strutture anche molto diverse tra loro. Questo è un esempio di evoluzione convergente, dove proteine strutturalmente diverse si sono evolute per adempiere ad un obiettivo unico, come per esempio aderire al ghiaccio.

Queste proteine hanno in comune alcune specifiche zone che ne permettono l'adesione al ghiaccio. Queste zone non hanno in realtà caratteristiche specifiche, ma caratteristiche generali comuni.

La parte delle IBPs che aderisce al ghiaccio (*Ice Binding Site*) è una zona piatta, solitamente estesa e relativamente idrofobica. Oltre a questo si nota spesso un arricchimento nella presenza dell'aminoacido Treonina, che si ritiene sia molto importante nel fenomeno di adesione al ghiaccio.

Applicazioni dell'IBPs

Importanti applicazioni sono quelle in cui si usa l'inibizione della ricristallizzazione.

In ambito alimentare inserire una IBPs serve ad evitare la formazione di cristalli di ghiaccio, ad esempio nei gelati. Unilever lo ha fatto, e commercializza gelati con IBPs di un pesce antartico in alcuni paesi in cui è permesso l'uso di enzimi ricombinanti nei prodotti alimentari (tipo in Giappone).

Un altro campo di interesse è la criopreservazione di cellule, tessuti ed altro materiale biologico.

In agricoltura è interessante la produzione di piante transgeniche che esprimono IBPs allo scopo di limitare la formazione di cristalli di ghiaccio nella pianta all'abbassarsi della temperatura.