

Enzimi speciali come "Easter Eggs" con funzioni meravigliose per le biotecnologie



AUTORI E AUTRICI

Francesca Valetti, Lisa Barbieri, Sabrina Dezzani, Daisy Duranti, Gianfranco Gilardi

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi

francesca.valetti@unito.it

SCUOLA

L'articolo è stato revisionato dagli studenti e dalle studentesse di terza superiore del liceo Scientifico E.

Agnelli di Torino

Immaginiamo che sappiate bene cosa sia un "Easter Egg" in un videogioco: una sorpresa speciale nascosta in un'area segreta o un oggetto bonus.

Abbiamo scoperto [Morra et al, 2016, cercalo nelle referenze, troverai il link all'articolo scientifico originale] un "Easter Egg" simile in una proteina che funziona in un batterio molto utile, e questo ci ha suggerito come proteine ed enzimi possano contribuire a un futuro bio-sostenibile. Ma prima lasciate che vi presentiamo il background scientifico e il contesto.

IL BACKGROUND

Come sapete, le proteine sono responsabili della struttura delle cellule, dai batteri agli animali, alle piante e all'uomo, ma hanno anche il compito di far funzionare gli organismi: speciali proteine chiamate enzimi sono in grado di promuovere le reazioni chimiche nelle cellule, il trasporto di sostanze e sono alla base di meccanismi molto complessi come la contrazione muscolare negli animali o il processo di fotosintesi nelle piante.

Gli enzimi, in quanto tali, sono nano-macchine molto finemente progettate: **nano** perché sono nell'intervallo dimensionale dei nanometri (10^{-9} metri), **macchine** perché sfruttano le loro caratteristiche chimiche e la loro struttura flessibile per svolgere funzioni bio-tecnologiche molto specializzate. La progettazione è ovviamente guidata dall'evoluzione, che seleziona la struttura e le funzioni che rispondono meglio alle esigenze di sopravvivenza degli organismi.

IL CONTESTO

Nel nostro caso l'enzima che abbiamo studiato si chiama **idrogenasi**: in un batterio chiamato *Clostridium beijerinckii*, che vive nei terreni e cresce in assenza di ossigeno, questo enzima permette al batterio di sfruttare il

materiale organico di scarto per ottenere energia e, come prodotto non utilizzato dal batterio, produce idrogeno gassoso. L'idrogeno sta oggi guadagnando interesse in quanto è un combustibile che può essere utilizzato senza produrre CO₂. Sono in arrivo treni, auto, navi e persino aerei alimentati a idrogeno, che avranno un impatto zero sulle emissioni di gas serra.

Negli habitat naturali altri organismi, come gli **Archea (controlla nel glossario)** che producono metano, possono utilizzare l'idrogeno gassoso, ma ora, nella nostra società, possiamo anche utilizzare il nostro batterio *Clostridium beijerinckii* per recuperare l'idrogeno gassoso dall'enorme quantità di rifiuti che produciamo nelle nostre città, dai rifiuti organici o da quelli agricoli e raccogliere questo prezioso carburante. La tecnologia è già disponibile: possiamo costruire **impianti di digestione anaerobica (controlla nel glossario)** in cui i rifiuti vengono trattati in presenza di molti batteri e il flusso di idrogeno gassoso viene recuperato [Arizzi *et al.*, 2016 e 2021, Morra *et al.* 2014], immagazzinato in materiali speciali e poi utilizzato come combustibile. I rifiuti trattati possono essere ulteriormente sfruttati per produrre metano e vengono poi recuperati (a questo punto si chiamano digestato) e possono essere lavorati per produrre bio-fertilizzanti per un'agricoltura più sostenibile [Fuldauer *et al.*, 2018].

LA NOSTRA SCOPERTA

Ma torniamo ai nostri studi: perché l'idrogenasi del *Clostridium beijerinckii* è così speciale? Resiste al danno da ossigeno! Normalmente l'ossigeno è tossico per gli enzimi idrogenasi presenti in questo organismo. L'organismo stesso può proteggersi dall'ossigeno formando una spora (una versione molto piccola e robusta della cellula batterica che può rimanere tranquilla e ricrescere quando le condizioni migliorano), ma l'enzima viene danneggiato in modo irreversibile dall'ossigeno, quindi il batterio deve ricreare l'enzima da

zero al costo di una certa energia. Nel caso dell'enzima che abbiamo scoperto non è così, l'enzima, anche se molto simile ad altri enzimi sensibili, non si danneggia in presenza di ossigeno, semplicemente diventa temporaneamente inattivo e poi riprende a funzionare, operando questo meccanismo protettivo tutte le volte che l'ossigeno si presenta. Come è possibile?

Nei nostri studi abbiamo osservato che un cambiamento nella struttura della proteina, probabilmente dovuto a mutazioni nel DNA e quindi negli aminoacidi che la compongono, ha reso l'enzima un po' diverso: una parte della proteina è più flessibile [Winkler *et al.*, 2021] e può oscillare per bloccare la parte della proteina che viene attaccata dall'ossigeno (Figura 1). La proteina ha quindi un meccanismo di blocco intrinseco che auto-protegge l'idrogenasi dall'ossigeno (in poche parole un vero e proprio "Easter Egg").

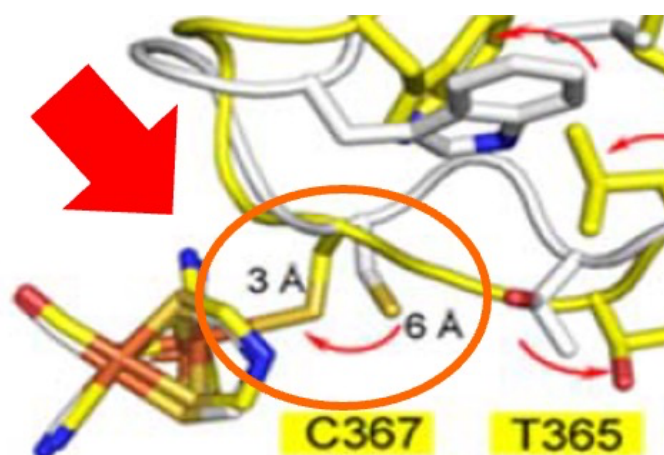
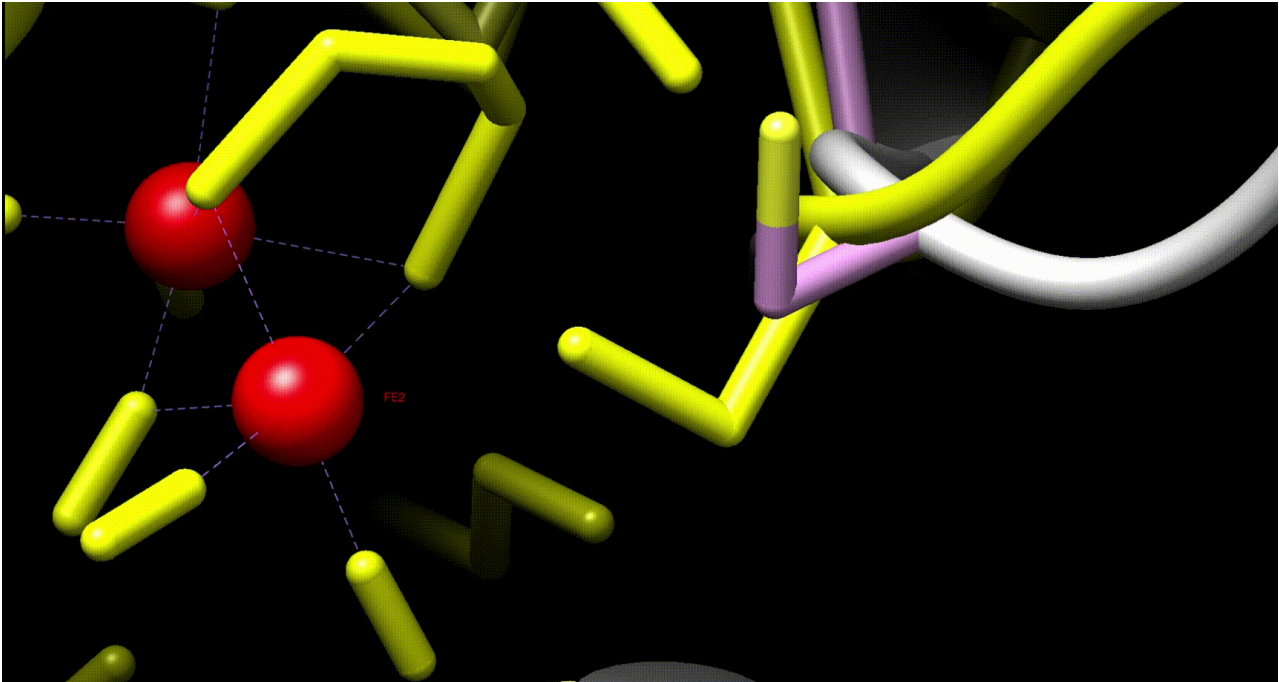


Figura 1 La struttura del meccanismo di blocco: la parte flessibile della proteina può oscillare tra la posizione indicata in bianco e quella in giallo e bloccare il sito che reagisce con l'ossigeno (da Winkler *et al.*, 2021).

Creative Commons Attribution 4.0 License

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Osserva il cambio di conformazione anche nella gif qui di seguito (clicca sull'immagine):



Questo meccanismo funziona come una sorta di scudo reversibile, ferma l'ossigeno che così non raggiunge il sito dell'enzima che contiene il metallo, il quale a sua volta produrrebbe le specie reattive dell'ossigeno (**ROS controlla nel glossario**) che normalmente possono danneggiare l'enzima stesso. Non appena l'ossigeno diminuisce in concentrazione fino ad approssimarsi a zero, l'enzima riprende a funzionare. Il batterio risparmia energia e può riprendere a crescere rapidamente, con un notevole vantaggio rispetto ad altri batteri che non possono utilizzare le loro proteine danneggiate dall'ossigeno. Questo fa del *Clostridium beijerinckii* un batterio a crescita rapida e un produttore di idrogeno altamente efficiente.

ULTERIORI VANTAGGI APPLICATIVI

Ma non è tutto: l'idrogenasi "super-potente" in grado di auto-protegersi dall'ossigeno è molto interessante per gli scienziati, poiché si tratta di un biocatalizzatore con una caratteristica speciale che può essere copiata: la

Natura ci ha mostrato come questa proprietà speciale possa essere ottenuta in un enzima e come si possano progettare altri enzimi che producono idrogeno, protetti dall'ossigeno, che possono essere utilizzati al di fuori della cellula. Gli enzimi isolati prodotti dai batteri [Morra 2022, Morra *et al.*, 2016b] possono essere utilizzati per eseguire una specifica reazione: in questo caso solo per produrre o consumare idrogeno in sistemi tecnologici (**elettrolizzatori o fuel-cells, controlla il glossario**) fondamentali per utilizzarlo come combustibile o come riserva di energia (uno schema generale è riportato in Figura 2). Così gli ingegneri proteici, ricercatori che come noi studiano come la struttura di un enzima permette la sua funzione e le sue caratteristiche speciali, possono imparare dalla Natura e riprogettare enzimi ancora più speciali che possiamo utilizzare.

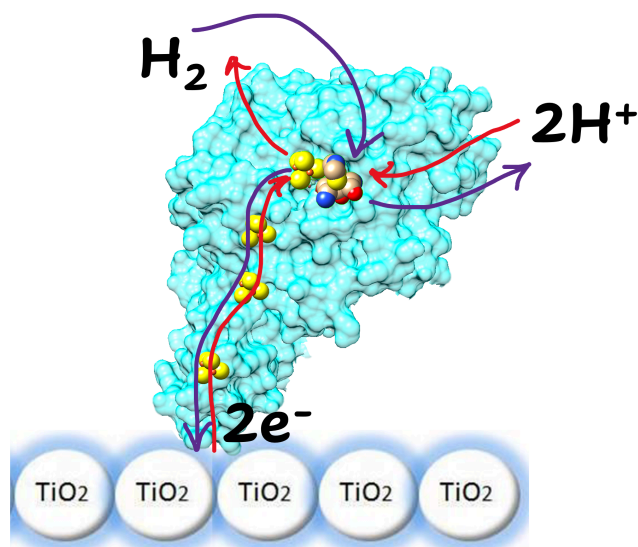


Figura 2 lo schema di una idrogenasi su un elettrodo costruito con un materiale semiconduttore (ossido di titanio o TiO_2), in grado di scambiare 2 elettroni ($2e^-$) in modo reversibile per generare idrogeno da corrente elettrica e dai protoni dell'acqua (traccia rossa) e vice-versa (traccia blu).

Il vantaggio generale degli enzimi rispetto ai normali **catalizzatori (controlla il glossario)** metallici (come il platino utilizzato nei dispositivi che producono o sfruttano l'idrogeno come combustibile) è il basso costo (che comprende

anche l'indipendenza dai metalli rari), le condizioni di utilizzo blande (bassa temperatura, pH neutro), per definizione "biocompatibili", e la sostenibilità della produzione e della degradazione.

Nelle tecnologie dell'idrogeno, in particolare, la produzione e lo sfruttamento dell'idrogeno comportano spesso **l'inter-conversione dell'elettricità in idrogeno (controlla il glossario)** e viceversa. Rispetto ai catalizzatori non biologici, le idrogenasi sono in grado di eseguire queste reazioni con efficienze più elevate (10000 reazioni/secondo) e con quello che si definisce **basso sovra-potenziale (controlla il glossario)** [Armstrong e Hirst, 2011].

E' necessaria ancora una attività di ricerca e sviluppo per rendere possibile la sostituzione dei catalizzatori tradizionali con quelli biologici come le idrogenasi, ma ci stiamo lavorando!

GLOSSARIO

Archea: microrganismi simili ai batteri per dimensioni e semplicità di struttura, ma radicalmente diversi nell'organizzazione molecolare. Oggi si ritiene che costituiscano un regno separato, intermedio tra i batteri e gli eucarioti.

Basso sovra-potenziale: Perché si verifichi una reazione di riduzione o di ossidazione (scambio di elettroni), il potenziale (tensione o voltaggio) deve essere impostato a un certo valore, in base all'energia richiesta. Spesso la reazione si avvia solo se viene fornita un'energia in eccesso: questo si chiama sovra-potenziale. I sistemi biologici funzionano con un sovra-potenziale molto basso (vicino allo zero), riducendo così al minimo lo spreco di energia.

Catalizzatore: una sostanza che aumenta la velocità di una reazione chimica senza subire alcun cambiamento chimico permanente. Gli enzimi sono i catalizzatori biologici che agiscono all'interno delle cellule.

Cella a combustibile: una cella elettrochimica che converte l'energia chimica di un combustibile (spesso idrogeno) e di un agente ossidante (spesso ossigeno) in elettricità

Elettrolizzatore: un sistema o dispositivo che utilizza l'elettricità per scindere le molecole d'acqua in idrogeno e ossigeno, producendo così idrogeno gassoso come fonte sostenibile di energia pulita

Impianti di digestione anaerobica: strutture in cui i rifiuti vengono convertiti in molecole più piccole in assenza di ossigeno. Possiamo recuperare idrogeno gassoso o, spingendo ulteriormente la reazione - ma sempre attraverso l'idrogeno - metano (entrambi i gas sono miscelati con CO₂ ma possono essere purificati).

Interconversione elettricità-idrogeno: L'idrogeno gassoso e l'elettricità sono vettori energetici complementari, interconvertiti da elettrolizzatori e celle a combustibile, che presentano caratteristiche distinte. In generale, l'idrogeno gassoso può essere un modo per immagazzinare fonti di elettricità non continue, come il fotovoltaico, l'eolico, le maree e l'idroelettrico.

ROS: acronimo di specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species), molecole instabili che contengono ossigeno e che reagiscono facilmente con altre molecole in una cellula. Possono causare danni al DNA, all'RNA e alle proteine e possono causare la morte cellulare. Le specie reattive dell'ossigeno si formano solitamente quando l'ossigeno molecolare O₂ reagisce con alcuni metalli come il ferro. Comprendono radicali liberi (con elettroni liberi reattivi) come il superossido e il radicale idrossile e specie non radicaliche come il perossido di idrogeno (H₂O₂).

BIBLIOGRAFIA

Arizzi, M, Morra, S, Pugliese, M., Gullino, ML, Gilardi, G., Valetti, F. 2016. Biohydrogen and biomethane production sustained by untreated matrices and alternative application of compost waste. Waste Manag, vol. 56, p. 151-

157. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956053X16303440>

Arizzi M., Morra S., Gilardi G., Pugliese M., Gullino M. L., Valetti F. 2021. Improving sustainable hydrogen production from green waste: [FeFe]-hydrogenases quantitative gene expression RT-qPCR analysis in presence of autochthonous consortia. BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS, vol. 14, p. 182-199. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02028-3>

Armstrong, F.A., Hirst, J. 2011. Reversibility and efficiency in electrocatalytic energy conversion and lessons from enzymes Proc Natl Acad Sci U S A 108(34):14049-54. <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1103697108>

Fuldauer, L.I., Parker, B.M., Yaman, R., Borrion, A., 2018. Managing anaerobic digestate from food waste in the urban environment: Evaluating the feasibility from an interdisciplinary perspective. J. Cleaner Prod. 185, 929–940. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652618306966>

Morra, S. 2022. Fantastic [FeFe]-Hydrogenases and Where to Find Them Frontiers in Microbiology 13 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.853626>

Morra, S., Arizzi, M., Valetti, F., Gilardi G. 2016a. Oxygen Stability in the New [FeFe]-Hydrogenase from *Clostridium beijerinckii* SM10 (CbA5H). Biochemistry.55(42):5897-5900. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biochem.6b00780>

Morra, S., Valetti, F., Gilardi, G. 2016b. [FeFe]-hydrogenases as biocatalysts in bio-hydrogen production Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali 28(Suppl 1) <https://doi.org/10.1007/s12210-016-0584-9>

Morra, S., Arizzi, M., Allegra, P., La Licata, B., Sagnelli, F., Zitella, P., Gilardi, G., Valetti, F. 2014. Expression of different types of [FeFe]-hydrogenase genes in bacteria isolated from a population of a bio-hydrogen pilot-scale plant. *Int J Hyd Energy*, vol. 39, p. 9018-9027
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319914010003>

Winkler, M., Duan, J., Rutz, A., Felbek, C., Scholtysek, L., Lampret, O., Jaenecke, J., Apfel, U.P., Gilardi, G., Valetti, F., Fourmond, V., Hofmann, E., Léger, C., Happe, T., 2021. A safety cap protects hydrogenase from oxygen attack. *Nat Commun.* 2;12(1):756. <https://www.nature.com/articles/s41467-020-20861-2>