

Relazione scientifica dell'attività svolta dal Dr. Luigi Ruggiero CECI nell'ambito del programma di ricerca STM svolto presso la *School of Biological Sciences* della *Bangor University*, Bangor - Galles, Regno Unito, nel periodo 9-27 settembre 2013.

Titolo del programma: Sviluppo di un laboratorio di Metagenomica Funzionale per l'identificazione di attività enzimatiche di origine microbica con applicazioni biotecnologiche.

Obiettivi: Acquisire le competenze necessarie per l'allestimento e conduzione di un laboratorio di Metagenomica Funzionale, in grado di effettuare l'analisi delle comunità microbiche di siti ambientali mediante costruzione di librerie genomiche di espressione e loro screening per l'individuazione mirata di nuove attività enzimatiche con potenziali applicazioni in biotecnologia. Collaborazione con una prestigiosa istituzione straniera in un settore di elevata qualificazione.

Uno dei principali motivi della visita presso la *School of Biological Sciences* della *Bangor University* è stata la possibilità di seguire le fasi principali degli esperimenti necessari ad un'analisi metagenomica funzionale. Il gruppo di lavoro condotto dal Prof. Peter Golyschin è da anni impegnato nella ricerca di nuove attività enzimatiche mediante l'analisi funzionale del pool genomico di microrganismi estremofili prelevati da siti caratterizzati da condizioni estreme di temperatura, salinità, acidità, ecc. Gli esperimenti specificatamente seguiti sono stati:

1. Screening di una libreria di fosmidi costruita utilizzando DNA della popolazione microbica prelevata da regioni costiere ad elevata temperatura. Lo screening è stato effettuato mediante saggi di attività condotti su piastre agar per l'identificazione di specifiche attività enzimatiche. La libreria metagenomica analizzata è costruita in un vettore di tipo fosfidico, ed è contenuta in micropiastre, così da poter essere trasferita su agar in maniera ordinata utilizzando appositi sistemi per il trasferimento. I fosmidi sono vettori di DNA per cellule di *Escherichia coli* che permettono di alloggiare frammenti di DNA estraneo con dimensioni pari a circa 40 kb. Essi sono dotati inoltre delle regioni di regolazione necessarie per l'espressione in *E. coli* dei geni contenuti nei frammenti di DNA estraneo. Inizialmente le librerie sono suddivise in sotto-frazioni alloggiate in micropiastre da 384 pozzetti. In questo modo è possibile uno screening più veloce (il contenuto di ogni singolo pozzetto è trattato come singola colonia). Le sottofrazioni che risultano positive ai saggi di attività enzimatica, sono poi ripiastrate e le singole colonie sistemate in nuove micropiastre per un secondo screening. Ogni "spot", ottenuto trasferendo il contenuto di un pozzetto sulla piastra di agar, può quindi contenere sia un numero multiplo di colonie (nella fase iniziale dello screening) sia singole colonie (nelle fasi successive dello screening). Il saggio di attività è condotto utilizzando specifici substrati, aggiunti durante la preparazione della piastra di agar o successivamente alla crescita dei cloni, in funzione della specifica attività cercata. In particolare sono state cercate attività enzimatiche corrispondenti a cellulasi e lipasi. L'attività corrispondente alle cellulasi è stata cercata aggiungendo il colorante Red-Congo (in grado di legarsi alla cellulosa e colorarla) alle colonie cresciute su piastre contenenti cellulosa. L'attività delle cellulasi si evidenzia mediante la formazione di aloni trasparenti intorno alle colonie che la secernono poiché è impedita la colorazione da parte del colorante Red-Congo. L'attività corrispondente all'enzima lipasi è stata identificata mediante l'individuazione di aloni trasparenti intorno alle colonie cresciute su agar

contente il substrato tributirina 1%. Le colonie identificate come positive all'interno di una frazione dell'intera libreria, vengono successivamente identificate mediante ulteriore screening del pool positivo, condotto su singole colonie.

2. Preparazione del DNA fosmidico. Il fosmide contenuto nelle colonie risultate positive al test di attività è stato successivamente isolato allo scopo di isolare al suo interno il gene corrispondente all'attività enzimatica individuata. Il fosmide è stato inizialmente purificato dalle cellule batteriche mediante appositi kit e sottoposto a sequenziamento delle sue terminazioni mediante la metodica di Sanger. Successivamente, per l'identificazione del gene, il fosmide deve essere sequenziato completamente per l'intera lunghezza (ca. 40 Kb). Questo passaggio viene generalmente eseguito mediante tecnologie di *Next Generation Sequencing* (NGS). In questo caso però è stata necessaria un'ulteriore purificazione del fosmide per l'eliminazione completa delle contaminazioni da DNA genomico batterico, che altrimenti influenzerebbero i dati di sequenziamento. Quest'ultimo passaggio è stato eseguito utilizzando apposite DNasi specifiche per DNA lineari. Le due procedure di sequenziamento (Sanger e NGS) sono affidate a laboratori esterni.

3. Espressione dei singoli enzimi identificati. Una volta che il gene per l'enzima identificato è stato riconosciuto all'interno della sequenza del fosmide, si procede al suo isolamento e sub clonaggio in un vettore di espressione della serie pET per la successiva espressione della proteina corrispondente. Il sub clonaggio è effettuato con tecniche classiche (PCR, digestione con endonucleasi di restrizione e ligazione). La collezione di cloni contenenti differenti enzimi è stata sottoposta alla procedura di espressione, mediante crescita ed induzione con IPTG, ed il contenuto cellulare sottoposto ad elettroforesi mediante SDS-PAGE. Nel caso specifico dell'esperimento seguito circa 80% delle colonie esaminate ha mostrato l'espressione di proteine ricombinanti. Nei casi negativi, si può ipotizzare che la proteina non venga identificata perché presente nei cosiddetti corpi proteici. Una successiva analisi di questi ultimi, mediante risospensione delle proteine con urea, permetterà di verificare l'ipotesi. I cloni positivi identificati, verranno quindi utilizzati per la purificazione delle singole proteine per successive analisi di attività enzimatica e cristallizzazione delle singole proteine.

In parallelo con l'attività sperimentale, la visita presso la *School of Biological Sciences* della Università di Bangor ha permesso di discutere ampiamente con il prof. Peter Golyshin, il suo gruppo di ricerca ed altri ricercatori della istituzione, circa le problematiche relative allo sviluppo di ricerche nell'ambito della metagenomica funzionale. E' importante la considerazione che tale approccio sperimentale risulta di notevole interesse per l'industria, essendo gli enzimi identificabili estremamente utili per svariati settori industriali (carta, detersivi, carburanti, tessile, chimica fine, alimentazione, ecc.). Le stesse industrie difatti risultano spesso interessate a rientrare come partner attivi nelle ricerche svolte in ambito accademico/governativo.

Inoltre essendo la metagenomica funzionale interessata allo screening di popolazioni batteriche generalmente di notevole complessità, è generalmente condivisa l'opinione che una strategia ottimale per la ricerca di nuove attività enzimatiche consista nel rivolgere l'analisi ai batteri che vivono in condizioni "estreme". In tal modo difatti si ottiene una riduzione della complessità della popolazione da analizzare. Inoltre, l'indagine svolta su organismi estremofili può risultare anche più efficace in considerazione della possibilità di identificare enzimi che mantengono ancora attività in

condizioni più interessanti dal punto di vista applicativo, quali per esempio l'elevata temperatura.

Firma del Fruitore

Luigi Meggiaro