

Relazione scientifica della Missione short-term mobility del Dr. Michele Bellucci svolta al Max-Planck-Institute of Molecular Plant Physiology di Potsdam dal 28 settembre al 19 ottobre 2015.

Durante il periodo di tre settimane (28/09/2015-19/10/2015) trascorso presso il Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie), il fruitore della short-term mobility (STM), Dr. Michele Bellucci, ha condotto attività di ricerca e studio sotto la supervisione del Prof. Ralph Bock. Quest'ultimo è il Direttore del Dipartimento di Biologia degli Organelli, Biotecnologia ed Ecofisiologia Molecolare, dove sono sviluppate metodiche di trasformazione genetica del genoma nucleare e di quelli degli organelli cellulari, combinandole con metodologie biochimiche e fisiologiche, per studiare la fisiologia e l'espressione genica dei plastidi e dei mitocondri, così come le loro interazioni genetiche e metaboliche con il compartimento nucleocitosolico.

Inoltre, essendo presenti all'interno del Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology altri due dipartimenti, uno diretto da Lothar Willmitzer (metabolismo delle piante in senso lato) e l'altro da Mark Stitt (integrazione delle vie biochimiche coinvolte nel metabolismo primario e loro ruolo nello sviluppo della pianta), il fruitore della STM ha potuto approfondire tematiche di ricerca collegate al metabolismo vegetale.

Nel dettaglio, sono stati presi in considerazione diversi aspetti riguardanti sia l'espressione di transgeni nel cloroplasto delle microalghe che in quello delle piante superiori. Nel primo caso, la Dr.ssa Juliane Neupert ha fornito la sequenza del plasmide cg 12, che è stato precedentemente usato nel laboratorio Chloroplast Molecular Genetics di Ginevra del Prof. Michel Goldschmidt-Clermont (dove il fruitore ha soggiornato nel 2013 per un'altra STM), per assemblare una serie di vettori utilizzati per la trasformazione del plastoma di *Chlamydomonas reinhardtii*. Questi vettori serie atpB-int (Michelet et al., 2011) sono utilizzati sia a Potsdam che a Perugia per la trasformazione delle alghe, per cui la sequenza del plasmide cg 12 da cui sono stati originati, non disponibile nel laboratorio di Ginevra ma realizzata recentemente a Potsdam, permette di disegnare oligonucleotidi specifici da utilizzare mediante PCR per amplificare regioni dei vettori serie atpB-int. Oltre a ciò, sono state scambiate informazioni riguardo alle metodiche di coltura in vitro delle alghe, comprendenti terreni e condizioni di luce, nonché il protocollo per la conservazione delle linee trasformate a -80°C.

Per quanto riguarda invece l'espressione di transgeni nel cloroplasto delle piante superiori, sono state svolte attività sperimentali di laboratorio mirate ad ottimizzare l'uso di un vettore per l'espressione inducibile nel plastoma di tabacco. Questo sistema prevede l'uso di un agente inducente, teofillina, che induce l'espressione di una T7 RNA polimerasi che a sua volta attiva la trascrizione del gene di interesse (Emadpour et al., 2015). I due transgeni (quello d'interesse e la T7 RNA

polimerasi) si trovavano inizialmente nello stesso vettore per la trasformazione del plastoma, ma recentemente si è capito che, per ragioni legate all'elevato tasso di mutazione del gene T7 RNA polimerasi in *E. coli* durante l'amplificazione del plasmide, è opportuno separarli in due vettori per la trasformazione distinti. Ne deriva che verrà creata una linea di tabacco transplastomica per il gene della T7 RNA polimerasi. Il gene d'interesse sotto promotore T7 sarà introdotto nel plastoma in un secondo momento super-trasformando la suddetta linea. Attualmente nei laboratori di Potsdam si sta producendo questa linea di tabacco transplastomica. I semi di questa linea saranno successivamente inviati a Perugia, insieme ad un vettore per la trasformazione del plastoma, per inserire poi mediante super-trasformazione un gene d'interesse la cui espressione sia regolata dalla teofillina.

Infine, un'intensa attività di scambio di informazioni ha riguardato la discussione con tutti i membri del laboratorio di Dipartimento di Biologia degli Organelli, Biotecnologia ed Ecofisiologia Molecolare su argomenti concernenti l'espressione di geni ricombinanti nel cloroplasto, nonché la partecipazione a lab meetings, journal club, e seminari tenuti sia da studenti di dottorato, che da ricercatori interni o provenienti dall'esterno. Sono inoltre stati avviati contatti molto proficui per la realizzazione di due iniziative, riguardanti una l'ideazione di una Research Topic della rivista *Frontiers in Plant Science*, e l'altra l'organizzazione di un convegno in Italia da tenersi nel 2016.

Bibliografia

Emadpour M, Karcher D, Bock R (2015) Boosting riboswitch efficiency by RNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 26;43(10):e66. Epub 2015 Mar 30.

Michelet L, Lefebvre-Legendre L, Burr SE, Rochaix JD, Goldschmidt-Clermont M. (2011) Enhanced chloroplast transgene expression in a nuclear mutant of *Chlamydomonas*. *Plant Biotechnol J.* 9:565-574.