

Relazione Scientifica

Programma Short Term Mobility 2010

Fruitore: Antonia Gallo

Proponente: Giancarlo Perrone

Istituzione ospitante: BSEL (Bioproducts, Science and Engineering Laboratory) presso il Pacific Northwest National Laboratory (PNNL), Richland, WA, US

Titolo del programma: Trasformazione genetica di *Aspergillus carbonarius* per lo studio dei meccanismi molecolari che regolano la biosintesi di ocratossina A.

Introduzione

Aspergillus carbonarius è il fungo ritenuto principale responsabile della contaminazione di ocratossina A (OTA) nell' uva e nei suoi derivati (vino, succhi di uva, uva sultanina), soprattutto nelle regioni dell'area mediterranea. L'OTA è un importante micotossina, considerata nefrotossica, immunotossica, genotossica e teratogena e classificata dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) come possibile cancerogena per l'uomo (gruppo 2B). Un recente regolamento CE (n. 123/2005) ne fissa inoltre il limite massimo per vino ed altre bevande a base di uva a 2 ppb. Oltre ad *A. carbonarius*, anche *A. niger* e *A. tubingensis* possono contribuire alla contaminazione da OTA in questi prodotti. Altri funghi appartenenti al genere *Aspergillus*, come *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*, sono responsabili soprattutto della contaminazione da OTA in cioccolato, caffè e altri prodotti tipici della zona tropicale, mentre funghi del genere *Penicillium*, *P. nordicum* e *P. verrucosum*, sono invece responsabili della contaminazione da OTA in carni e formaggi fermentati nelle regioni a regime climatico temperato. Sebbene il pathway biosintetico dell'OTA non sia stato completamente chiarito, partendo dalla struttura polichetidica della micotossina è stato ipotizzato e dimostrato, tramite esperimenti di inattivazione genica, il coinvolgimento nel processo biosintetico di un enzima tipo polichetide sintasi (PKS) in *P. nordicum* (Karolewicz e Geisen, 2005), *A. ochraceus* (O'Callaghan *et al.*, 2003), e *A. westerdijkiae* (Bacha *et al.*, 2008). La struttura molecolare ha permesso di ipotizzare anche l'intervento di altri enzimi oltre alla PKS, come per esempio una ciclasi, una alogenasi o cloroperossidasi, una esterasi e una polipeptide sintetasi. I geni che codificano per queste proteine sono quasi certamente organizzati in un cluster, cioè in una regione genomica delimitata all'interno del cromosoma, come accade per la maggior parte dei geni responsabili della biosintesi di metaboliti secondari nei funghi filamentosi. I maggiori risultati sullo studio molecolare della sintesi di OTA sono stati ottenuti in *P. nordicum*, dove è stata appunto stabilita la presenza di un cluster genico comprendente un gene *pkS*, un gene *nrps*, codificante per una NRPS (non ribosomal peptide synthetase), il cui coinvolgimento è stato dimostrato sperimentalmente con l'inattivazione genica, e altri geni. Tra questi, un gene codificante per una proteina probabilmente coinvolta nel trasporto di OTA e una cloroperossidasi. In seguito al sequenziamento del genoma di *A. niger*, è stata determinata in questo fungo la presenza di un

cluster putativo per la biosintesi di OTA, sulla base della similarità di sequenza di una PKS, presente nel cluster, con la PKS coinvolta nella sintesi di OTA in *A. ochraceus*. Recentemente anche il genoma di *A. carbonarius* è stato completamente sequenziato e automaticamente annotato nell'ambito di un progetto che vedeva coinvolti oltre al JGI-DOE (Joint Genome Institute-Department Of Energy, USA), il PNNL (Pacific National Northwest Laboratory) e l'istituto ISPA (Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari) del CNR.

Dalle prime analisi del genoma di *A. carbonarius*, è stata evidenziata anche in questa specie, come in tutte le specie di funghi filamentosi di cui è stato sequenziato il genoma, la presenza di un numero elevato di geni codificanti per proteine PKS (Chiang et al., 2010). L'alto numero di PKS può trovare spiegazione nell'alto numero di metaboliti secondari a struttura polichetidica, tipicamente sintetizzati da questi microrganismi. In particolare, tra le PKS di *A. carbonarius* ne è stata individuata una che, in seguito ad analisi comparative, presenta un'alta similarità nella sua sequenza aminoacidica (circa il 70%) alla OTA-PKS putativa determinata in *A. niger*, la specie filogeneticamente più vicina all'*A. carbonarius*.

Si può pertanto ipotizzare che si tratti del gene *pks* omologo al gene *OTA pks* trovato in altre specie fungine. Considerando la possibilità che i geni responsabili della biosintesi della tossina siano organizzati in un cluster, sono state analizzate le regioni genomiche fiancheggianti questo gene *pks*. I dati di annotazione hanno permesso di individuare tra gli altri alcuni geni interessanti ai fini del loro probabile coinvolgimento nel pathway biosintetico dell'OTA. Sono stati identificati geni codificanti per una proteina NRPS, per un fattore di trascrizione, per una ossigenasi, per una proteina con funzioni di trasporto e infine anche un gene codificante per una alogenasi. La dimostrazione dell'effettivo coinvolgimento di questi geni nel meccanismo di sintesi di OTA può essere ottenuta da esperimenti di silenziamento genico, che consentirebbero di determinare anche il ruolo specifico che essi svolgono nel pathway biosintetico.

Il programma di ricerca STM della Dr. Gallo è stato svolto nell'ambito della collaborazione avviata con il PNNL e il DOE per il sequenziamento del genoma di *A. carbonarius*. Infatti, l'istituzione ospitante, il PNNL a Richland, nello stato di Washington (USA), è uno dei dieci laboratori nazionali dell'U.S. DOE (Department of Energy). Il PNNL conduce attività di ricerca anche per conto di altre agenzie governative, università e industrie, per rispondere alle necessità nazionali più urgenti in ambito scientifico e tecnologico, ed è coinvolto nelle più importanti ricerche di frontiera nei settori dell'energia, dell'ambiente e della sicurezza nazionale. In particolare il gruppo di ricerca "Sviluppo di processi chimico e biologici" presso il Bioproducts, Science and Engineering Laboratory (BSEL) presenta elevate competenze nel campo della chimica e biologia molecolare, e coordina una serie di progetti di ricerca di genetica, genomica e proteomica riguardanti la biologia dei funghi, finalizzati allo sviluppo e perfezionamento di nuovi processi per la produzione di biocarburanti e altri composti/ metaboliti di interesse industriale.

L'esperienza maturata nell'ambito di questo gruppo da parte del Dr. Scott Baker e del Dr. Kenneth S. Bruno ha permesso alla Dr. Gallo di accrescere le sue conoscenze e di portare avanti la collaborazione già in atto con questo gruppo di ricerca internazionale per lo studio del metabolismo secondario in *A. carbonarius*. L'attività svolta in particolare ha riguardato la messa a punto della tecnica di trasformazione di questo fungo tramite protoplasti e la preparazione dei costrutti di delezione riferiti ad alcuni dei geni presenti nel cluster putativo per l'OTA.

Attività di ricerca

Diverse sono le tecniche utilizzate per la trasformazione dei funghi filamentosi, tra queste una delle più comunemente usate è quella basata sull'assorbimento di DNA ricombinante da parte di protoplasti competenti (Ruin-Diez, 2002). Solo recentemente sono stati approfonditi gli studi di genetica sull'*A. carbonarius* e fino ad adesso non è stato ancora sviluppato alcun sistema di trasformazione basato sui protoplasti in questa specie fungina. Tra i passaggi chiave nella preparazione dei protoplasti vi sono una efficiente digestione della parete cellulare, il trasferimento del DNA ricombinante e la capacità di successiva rigenerazione delle cellule. Durante l'attività di ricerca svolta presso il laboratorio BSEL, è stato messo a punto un protocollo di preparazione di protoplasti di *A. carbonarius* da utilizzare per la trasformazione. L'ottimizzazione della tecnica di produzione dei protoplasti ha riguardato inizialmente la scelta degli enzimi litici più adeguati, in questo caso glucanasi e pectinasi, il tempo di incubazione nella soluzione digestiva, e l'uso di stabilizzatori osmotici alla concentrazione più appropriata che non interferisse con la successiva crescita dei protoplasti. Altri fattori importanti nel processo di trasformazione dei protoplasti sono stati oggetto di ottimizzazione, come la concentrazione di cloruro di calcio da usare per rendere i protoplasti competenti, il pH delle soluzioni usate, la concentrazione di DNA da introdurre, l'eventuale utilizzo di DNA carrier, i tempi e le temperature di incubazione.

Sono stati inoltre preparati i costrutti per la inattivazione di alcuni dei geni individuati come potenzialmente coinvolti nel processo biosintetico dell'OTA in *A. carbonarius*. Per assicurare la ricombinazione omologa e quindi il silenziamento del gene di interesse sono solitamente necessarie regioni fiancheggianti il gene lunghe approssimativamente 500 paia di basi. In questo caso è stato utilizzato l'approccio indicato come "double joint PCR" e che consiste in una tecnica di fusione di frammenti genici basata sulla PCR (Yu et al., 2004). I frammenti genici, da unire per formare il costrutto di delezione, corrispondono alle sequenze fiancheggianti il gene da distruggere, rispettivamente al 5' e al 3', e al gene marker da utilizzare per permettere la selezione delle cellule trasformate. A questo fine è stato usato un marker selettivo per la resistenza all'antibiotico igromicina B, abitualmente utilizzato per le trasformazioni dei funghi. L'igromicina B è un antibiotico aminoglicosidico che interferisce con la sintesi proteica; il relativo gene per la resistenza, *hph*, isolato da *Escherichia coli*, codifica per la fosfotransferasi HmB che inattiva l'antibiotico tramite fosforilazione.

Sono stati preparati i costrutti per i geni codificanti una PKS (*pks*), una peptide sintetasi (*nrps*), una alogenasi (*hal*), un fattore di trascrizione (*fif450*), una ossigenasi (*p450*), e una proteina trasportatrice (*mfs*), facenti parte dell'ipotetico cluster per la biosintesi di OTA in *A. carbonarius*.

Per ognuno dei questi geni i frammenti necessari sono stati amplificati tramite una PCR convenzionale: i primers usati per amplificare l'estremità 3' della regione fiancheggiante al 5', e l'estremità 5' della regione fiancheggiante al 3' di ogni gene, presentavano 20 basi aggiuntive complementari all'estremità rispettivamente 5' e 3' del gene marker. Entrambi i primers utilizzati per amplificare il gene marker presentavano ognuno 20 basi aggiuntive complementari alle due sequenze fiancheggianti ogni gene.

I frammenti ottenuti dalla prima PCR convenzionale (la regione al 5' del gene, il marker, la regione al 3' del gene) sono stati usati per una seconda reazione di PCR che ha consentito di unirli in un unico prodotto di amplificazione. Il prodotto così ottenuto è stato ulteriormente amplificato con una coppia di primers "annidati" per l'ottenimento di un amplicone finale che, dopo essere stato

purificato e quantificato, è stato utilizzato per la trasformazione. I protoplasti trasformati sono stati piastrati sul substrato di crescita contenente l'agente selettivo in concentrazioni tali da prevenire la crescita di protoplasti non trasformati.

Prima del termine del soggiorno è stato possibile stabilire l'avvenuta trasformazione di *A. carbonarius* con i costrutti relativi ai geni *nrps*, *hal*, *ff450*, *mfs*, grazie alla confermata presenza di colonie fungine cresciute in presenza dell'antibiotico usato per la selezione. L'attività di ricerca verrà portata avanti in collaborazione tra i due istituti per stabilire che ci sia stata una integrazione omologa e non ectopica del DNA ricombinante nel genoma del fungo, e quindi una effettiva inattivazione del gene di interesse. A tale scopo verrà effettuato un primo screening tramite PCR sul DNA estratto dai trasformanti stabili, con coppie di primers complementari a sequenze genomiche esterne al costrutto di delezione, mentre una successiva selezione sarà effettuata tramite Southern blot. Una volta individuati i trasformanti stabili in cui il gene è stato inattivato, essi verranno analizzati per la produzione di ocratossina, per determinare quale delezione genica abbia maggiormente influito sulla produzione della micotossina.

Lo studio basato sull'inattivazione dei geni è di fondamentale importanza per stabilire quali geni siano responsabili della sintesi di ocratossina, e permetterebbe di definire anche quali siano i principali passaggi dell'intero processo biosintetico, ancora non completamente chiarito, di questa micotossina.

Si può ritenere pertanto che il periodo di soggiorno effettuato dalla Dr. Gallo presso il BSEL potrà essere molto utile ai fini della prosecuzione e del completamento del progetto i cui risultati saranno oggetto di pubblicazioni scientifiche. Il soggiorno di ricerca ha permesso inoltre il rafforzamento della collaborazione con un gruppo di ricerca internazionale di alto livello, e soprattutto l'acquisizione di nuove competenze tecniche utili sia ad incrementare le conoscenze tecnico-scientifiche della Dr. Gallo, sia ad implementare future attività di ricerca per l'Istituto.

Bibliografia

- Bacha, N., Atoui, A., Mathieu, F., Liboz, T., Lebrihi, A. 2009. *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene "aoks1" is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. *Fungal Genetics and Biology* 46: 77-84
- Chiang, Y-M., Oakley, B.R., Keller, N.P., Wang, C.C.C. 2010. Unraveling polyketide synthesis in members of the genus *Aspergillus*. *Applied and Microbiology Biotechnology* 86: 1719-1736
- Karolewicz, A., Geisen, R. 2005. Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 588-595
- O'Callaghan, J., Caddick, M.X., Dobson, A.D.W. 2003. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology* 149:3485-3491
- Ruin-Diez, B. 2002. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology* 92: 189-195

Yu, J-H., Hamari, Z., Han, K-H., Seo J-A., Reyes-Dominguez, Y., Scazzocchio, C. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* 41: 973-981

Bari, 10 novembre 2010

Fruitore



(Dr. Antonia Gallo)

Proponente



(Dr. Giancarlo Perrone)