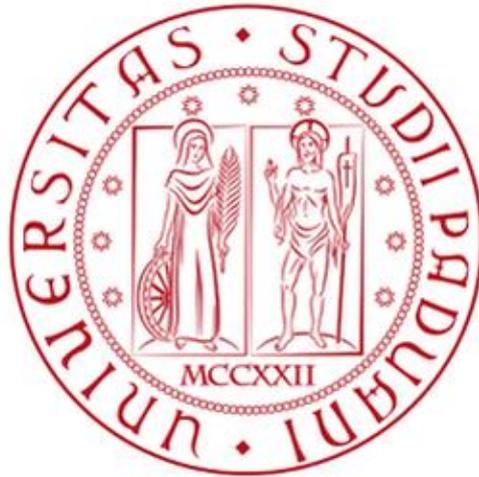


Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



**Studio della fotorespirazione in microalghe marine del
genere *Nannochloropsis***

Relatore: Prof. Giorgio Perin

Dipartimento di Biologia

Correlatore: Prof. Tomas Morosinotto

Dipartimento di Biologia

Controrelatore: Prof.ssa Donatella Carbonera

Dipartimento di Scienza Chimiche

Laureando: Francesco Paolo Tranne

Anno Accademico 2022/2023

SOMMARIO

ABSTRACT.....	5
1. INTRODUZIONE.....	7
1.1 CAMBIAMENTO CLIMATICO, AUMENTO DELLA POPOLAZIONE E LE PROPOSTE SOSTENIBILI.....	7
1.2 MICROALGHE COME POSSIBILE SOLUZIONE.....	8
1.3 <i>Nannochloropsis</i>	9
1.4 UTILIZZO A LIVELLO INDUSTRIALE.....	11
1.5 INGEGNERIA GENETICA IN <i>N. gaditana</i>	12
1.6 RICOMBINAZIONE OMOLOGA.....	14
1.7 FOTOSINTESI.....	15
1.8 MECCANISMI DI REGOLAZIONE DELLA FOTOSINTESI.....	20
1.9 NON-PHOTOCHEMICAL QUENCHING(NPQ).....	20
1.10 FOTORESPIRAZIONE.....	21
1.11 MECCANISMI DI CONCENTRAZIONE DEL CARBONIO (CCM).....	23
1.12 BYPASS FOTORESPIRATORI.....	24
1.13 CICLO DEL BETA-IDROSSI ASPARTATO.....	25
2. SCOPO DELLA TESI.....	27
3. MATERIALI E METODI.....	28
3.1 METODICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE.....	28
3.1.1 POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR).....	28
3.1.2 OVERLAP EXTENSION PCR (OE-PCR).....	30
3.1.3 ELETTROFORESI DU GEL DI AGAROSIO.....	34
3.1.4 PURIFICAZIONE DEL DNA.....	34
3.1.5 QUANTIFICAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI.....	36
3.1.6 ESTRAZIONE DI RNA DA <i>N. gaditana</i> E RETROTRASCRIZIONE.....	36
3.1.7 PREPARAZIONE E ASSEMBLAGGIO DELLE RIBONUCLEOPROTEINE PER LA TRASFORMAZIONE DI <i>N.gaditana</i>	39
3.2 COLTURA E TRASFORMAZIONE.....	40
3.2.1 COLTURA DI <i>N. gaditana</i>	40
3.2.2 TRASFORMAZION E DI <i>N. gaditana</i>	40
3.3 ANALISI FISILOGICHE E BIOCHIMICHE.....	42
3.3.1 CONTA CELLULARE.....	42
3.3.2 DETERMINAZIONE DEL PESO SECCO.....	42

3.3.3	ESTRAZIONE DEI PIGMENTI CON N,N-DIMETILFORMAMMIDE (DMF).....	42
3.3.4	QUANTIFICAZIONE IN ASSORBANZA DI CLOROFILLE E CAROTENOIDI IN <i>Nannochloropsis gaditana</i>	43
3.3.5	MISURAZIONI SULLA FLUORESCENZA DELLA CLOROFILLA.....	44
3.3.6	ESTRAZIONE DELLE PROTEINE DA <i>N. gaditana</i>	46
3.3.7	SDS-PAGE.....	47
3.3.8	WESTERN BLOT.....	47
4.	RISULTATI.....	49
4.1	ISOLAMENTO DI MUTANTI K.O. DI <i>Nannochloropsis gaditana</i> PER IL GENE <i>gox</i>	49
4.1.1	SETUP PER L'IDENTIFICAZIONE AFFIDABILE DI UN FENOTIPO FOTORESPIRATORIO.....	49
4.1.2	VALUTAZIONE DELLA CRESCITA DI <i>N. oceanica</i> IN TERRENO SOLIDO.....	50
4.1.3	VALUTAZIONE DELLA CRESCITA DI <i>N. oceanica</i> IN TERRENO LIQUIDO.....	51
4.2	CARATTERIZZAZIONE DEI MUTANTI KO IN <i>N. gaditana</i>	52
4.2.1	VALUTAZIONE DELLA CRESCITA IN TERRENO SOLIDO.....	53
4.2.2	VALUTAZIONE DELLA CRESCITA IN TERRENO LIQUIDO.....	54
4.2.3	CARATTERIZZAZIONE DELLA CRESCITA IN CONDIZIONI TIPICHE DELLA COLTIVAZIONE INDUSTRIALE.....	55
4.2.4	ANALISI DEI PIGMENTI.....	56
4.2.5	ANALISI QUANTITATIVA DEI COMPLESSI VCP1 ED LHCX1.....	57
4.2.6	VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ FOTOSINTETICA...58	
4.2.7	CONFERMA MANTENIMENTO MUTAZIONE.....	60
4.3	VALIDAZIONE BYPASS FOTORESPIRATORIO.....	61
4.3.1	GENERAZIONE DEL COSTRUTTO DI BYPASS.....	61
5.	DISCUSSIONE.....	63
5.1	ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DEI MUTANTI DI <i>N. gaditana</i> KO PER IL GENE <i>gox</i>	64
5.2	IMPLEMENTAZIONE DEL BYPASS SINTETICO.....	65
6.	CONCLUSIONI.....	68
7.	BIBLIOGRAFIA.....	70

ABSTRACT

Le microalghe sono organismi fotosintetici in grado di sintetizzare e accumulare diverse molecole con applicazioni in vari settori dell'attuale economia, fungendo da fonte sostenibile di biomassa, biocarburanti, alimenti e composti bioattivi. Nello specifico, le microalghe del genere *Nannochloropsis* hanno attirato l'attenzione per la loro capacità di produrre quantità significative di molecole di interesse commerciale, come carotenoidi, acidi grassi omega-3 (importante a scopo alimentare), clorofille e triacilgliceroli, questi ultimi convertibili facilmente in biodiesel attraverso la transesterificazione. Tuttavia, il pieno sfruttamento del potenziale delle microalghe è ostacolato da rese e costi attualmente non competitivi rispetto ai processi basati sui combustibili fossili. Per superare tali sfide, sono stati effettuati studi improntati al miglioramento dell'efficienza fotosintetica, ma con focus maggiore sulla fase luminosa della fotosintesi. Per questo motivo, in questo studio si propone un approccio mirato allo studio della fase oscura della fotosintesi. Nello specifico, viene preso in considerazione il processo di fotorespirazione: un pathway che è utile agli organismi fotosintetici per detossificare la cellula da un prodotto della reazione ossigenasica della RUBISCO: il 2-fosfoglicolato. Questo pathway è potenzialmente limitante per la produzione di biomassa a livello industriale. Si propone, quindi, uno studio basato su tecniche di ingegneria genetica, in particolare la tecnica CRISPR-Cpf1, che ha permesso di isolare ceppi di *N. gaditana* privi di un gene chiave coinvolto nel processo fotorespiratorio: il gene *gox*. Il primo obiettivo è stato quello di caratterizzare i ceppi KO per questo gene e studiare se questa delezione inducesse un fenotipo fotorespiratorio. Dai risultati si evince che non vi è fenotipo fotorespiratorio espresso nei mutanti KO comparati al ceppo WT. In aggiunta, è stata valutata la produzione di biomassa dei ceppi KO, comparata con il ceppo WT, simulando condizioni di crescita industriali. In questo caso non è risultata differenza nella produzione di biomassa. Inoltre, è stato analizzato il contenuto di complessi fotosintetici (evidenziando una riduzione degli stessi nei mutanti) e, di conseguenza, anche la funzionalità fotosintetica dei mutanti KO rispetto al WT. Dai risultati si evince un comportamento differente di uno dei mutanti rispetto al ceppo WT.

In aggiunta, è stata proposta l'implementazione di un pathway di bypass per il processo fotorespiratorio, per permettere comunque ai mutanti di poter eliminare il 2PG, ma senza le limitazioni che la fotorespirazione porterebbe alla produzione di biomassa. Il pathway individuato è quello del beta-idrossiaspartato (BHAC), il cui processo di implementazione dovrà essere portato avanti in futuro.

1. INTRODUZIONE

1.1 CAMBIAMENTO CLIMATICO, AUMENTO DELLA POPOLAZIONE E LE PROPOSTE SOSTENIBILI

Vi sono sempre più evidenze che riguardano il cambiamento climatico: lo scioglimento dei ghiacciai, l'innalzamento del livello del mare, la scomparsa di bacini idrici. Il tutto dovuto ad un crescente aumento delle temperature globali. Dal 1880 ad oggi la temperatura media globale è salita da $-0,16^{\circ}\text{C}$ ad $1,2^{\circ}\text{C}$ (*Anthropogenic Climate Change, Deforestation and Renewable Energy, s.d.*).

Le cause del cambiamento climatico sono dovute in gran parte all'utilizzo sempre più massiccio di combustibili fossili: il 75% dei gas serra sono riconducibili proprio all'utilizzo di tali combustibili (Liu & Li, 2023). Oltre al cambiamento climatico, la società moderna si trova ad affrontare anche un problema di sovrappopolazione. La popolazione mondiale si attesta al 2023 a circa 8 miliardi di individui, con proiezioni che parlano del raggiungimento di circa 9,7 miliardi di persone entro il 2050.

Quindi, con un cambiamento climatico in atto ed una popolazione sempre crescente, ci si ritrova a dover affrontare problematiche quali: il bisogno di dover trovare nuove fonti di energia sostenibili (come biodiesel e biogas) e la richiesta sempre maggiore di cibo e di conseguenza, di terre disponibili a scopo agricolo. Energia e cibo sono ai primi posti dei bisogni della società moderna.

HID is recognized as general index of 'quality of life'

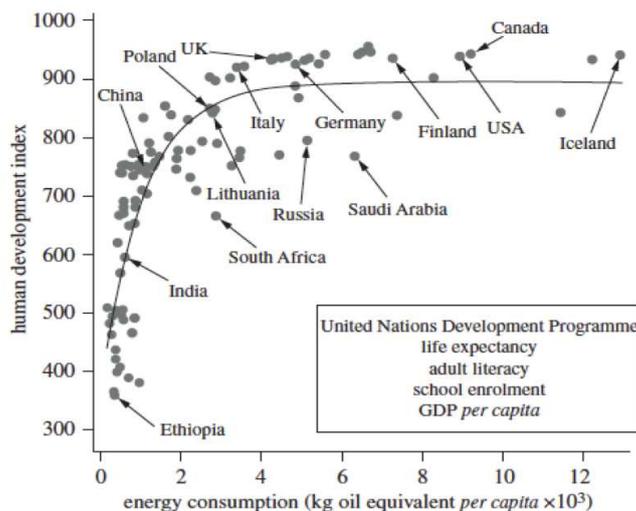


Figura 1: indice di sviluppo umano (HDI) in funzione dell'energia disponibile pro capite in 103 delle nazioni più popolose (adattato da Kolasinski 2006)

L'indice di sviluppo umano (HDI) (Figura 1), calcolato per nazione, è direttamente legato alla disponibilità energetica dello stesso Paese: più aumenta l'energia disponibile, più aumenta lo sviluppo associato.

Inoltre, l'edizione 2023 del rapporto FAO, (*Rapporto Fao, oltre 122 milioni di persone in più soffrono la fame, 2023*) rivela che tra 691 e 783 milioni di persone hanno sofferto la fame nel 2022. Spinta dalla crescita della popolazione e dell'economia, la domanda umana sui terreni da coltivare sia a scopo alimentare, sia a scopo di foraggio è aumentata drasticamente negli ultimi 50-100 anni. Va da sé il bisogno di virare verso una politica alimentare ed agricola sostenibile e che possa reggere l'urto di una popolazione in continua crescita.

Risulta necessario un miglior sfruttamento di quelle che sono le fonti alimentari, migliorando la produzione delle coltivazioni, ma facendo fronte ad un aumento della richiesta di terre coltivabili. Il tutto in un'ottica sostenibile, cercando di produrre di più a partire dalla stessa area coltivabile (Ort et al., 2015).

Da qui si rende necessario uno studio mirato verso organismi che possano soddisfare le richieste di produzione e sostenibilità in ambito alimentare ed energetico, tramite la produzione sempre maggiore di biomassa.

1.2 MICROALGHE COME POSSIBILE SOLUZIONE

Le microalghe sono microrganismi fotosintetici autotrofi in grado di svilupparsi mediante l'esposizione alla luce solare, alla CO₂ e ai nutrienti presenti nell'ambiente acquatico circostante. Ciò che risulta particolarmente notevole è che, a differenza delle piante terrestri, le microalghe non sempre richiedono acqua dolce né terreni coltivabili (Peter et al., 2022).

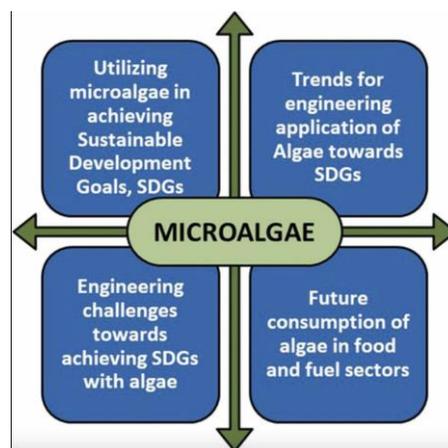


Figura 2: possibili utilizzi delle microalghe per un futuro sostenibile (Peter et al., 2022).

Di conseguenza, le microalghe sono state identificate come una delle possibili soluzioni per perseguire i Sustainable Development Goal (SDGs): si tratta di un insieme di 17 obiettivi globali stabiliti dalle Nazioni Unite per affrontare sfide urgenti e interconnesse, come la fame e la promozione della crescita economica sostenibile.

Inoltre, sono organismi con caratteristiche che le rendono particolarmente interessanti dal punto di vista industriale, grazie alla loro notevole flessibilità metabolica, capacità di adattamento a diverse condizioni di coltivazione e possibilità di crescita rapida (Dolganyuk et al., 2020)

In questo contesto le microalghe sono rilevanti per la loro capacità di attuare una produzione sostenibile di molte tipologie di molecole con applicazioni in vari ambiti: alimentare, farmaceutico, allevamento, agricolo ed in particolare del settore energetico.

Sono risultate importanti fonti per la produzione di biodiesel, data la loro capacità di accumulare lipidi (Wahlen et al., 2011). Inoltre, possono essere sfruttate per l'ottenimento di prodotti di interesse alimentare (Draaisma et al., 2013), farmaceutico, cosmetico e agricolo (Cheng et al., 2022).

Tra le microalghe spiccano quelle del genere *Nannochloropsis*: organismi fotosintetici con capacità di accumulare lipidi neutrali in particolari condizioni di crescita. Hanno anche la possibilità di produrre alti livelli di acidi grassi omega-3, clorofille e carotenoidi.

1.3 *Nannochloropsis*

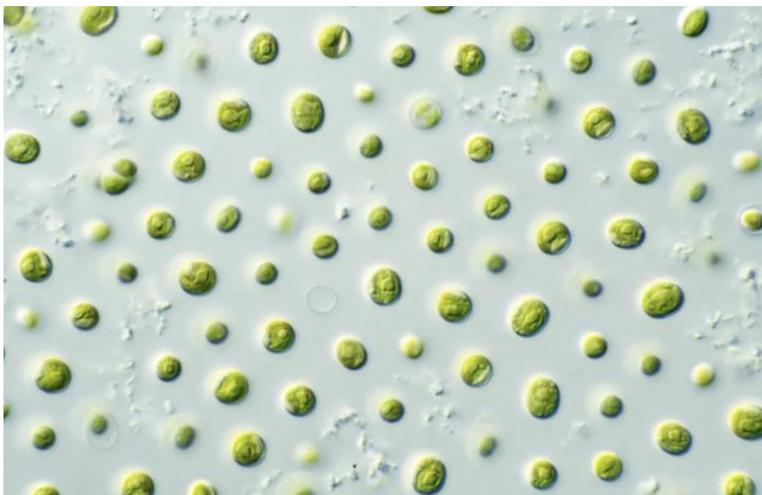


Figura 3: immagine al microscopio di alghe del genere *Nannochloropsis*. Adattato da Production of Fatty Acid, Protein by *Nannochloropsis* in Flat-Plate Photobioreactors - Responsible Seafood Advocate, 2019)

Le microalghe del genere *Nannochloropsis* (Figura 3) sono organismi unicellulari, con un diametro nel range 2-4 μm . Appartengono alla famiglia delle *Monodopsidaceae*, nella classe delle *Eustigmatophyceae*. Appartenendo agli endosimbionti secondari, presentano un cloroplasto caratterizzato da quattro membrane: derivano da un processo evolutivo durante il quale *Nannochloropsis* ha instaurato una relazione simbiotica con un endosimbionte primario.

Queste microalghe crescono preferibilmente in ambienti marini. Contengono cloroplasti con colore giallo-verde, il cui pigmento maggioritario è la clorofilla A, ma non presentano quelli di tipo "b" e "c". Altri pigmenti accessori sono la zeaxantina, la cantaxantina e l'astaxantina. Attualmente al genere *Nannochloropsis* appartengono sette specie: *N. oceanica*, *N. salina*, *N. australis*, *N. granulata*, *N. oculata*, *N. gaditana* ed *N. limnetica*, le quali hanno la capacità di accumulare lipidi in differenti condizioni di crescita, in particolar modo di acidi grassi polinsaturi a catena lunga (PUFAs) come l'acido eicosapentanoico (EPA). Le alghe del genere *Nannochloropsis* hanno applicazioni in ambito alimentare tramite la produzione di omega-3 ed omega-6. Inoltre, hanno un possibile utilizzo in ambito alimentare, dell'acquacoltura e farmaceutico (Paterson et al., 2023). Spicca anche la loro capacità di sintetizzare di lipidi, beta-carotene, zeaxantina e violaxantina (Perin & Morosinotto, 2020).

La tesi si concentra sul genere *Nannochloropsis* ed in particolar modo su *N. oceanica* ed *N. gaditana*.

Coltivata in condizioni di limitazione di azoto, *N. gaditana* (Simionato, Block, et al., 2013) è in grado di accumulare fino al 60-70% della propria biomassa. In tali circostanze particolari, l'organismo è stimolato ad aumentare la sintesi de novo degli acidi grassi e ad attivare meccanismi di riciclo dei lipidi presenti nelle membrane. Inoltre, in queste condizioni, non solo si verifica un aumento della quantità di oli che possono essere estratti, ma si verifica anche un cambiamento nella loro composizione, con un aumento proporzionale del contenuto in triacilgliceroli (TAGs). Tuttavia, è importante notare che la carenza di azoto ha un impatto negativo sulla crescita, poiché ostacola la sintesi proteica coinvolta nella produzione di pigmenti.

Quindi, le alghe del genere *Nannochloropsis* possono essere impiegate in sistemi di "bioraffineria", consentendo la produzione di diverse molecole e, contemporaneamente, contribuendo a vantaggi ambientali. Questa prospettiva si inserisce in un contesto di economia circolare, evidenziando la capacità della

microalga di svolgere un ruolo significativo nell'ottimizzazione e nella sostenibilità dei processi industriali.

1.4 UTILIZZO A LIVELLO INDUSTRIALE

I sistemi di coltura per le alghe possono essere aperti o chiusi. Nei sistemi aperti le alghe crescono in condizioni ambientali naturali e sono maggiormente soggette all'influenza degli agenti atmosferici (sole, temperatura, contaminazioni). I sistemi chiusi, invece, sono costituiti da strutture controllate dal punto di vista della temperatura, delle contaminazioni e della luce. In casi in cui si preferisca una soluzione "aperta", vengono sfruttate le "open ponds" (Figura 3) che hanno ampie superfici esposte alla luce in modo da promuovere la fotosintesi delle alghe. Quando, invece, si opta per un sistema chiuso vengono utilizzati i "FOTOBIOREATTORI" (PBRs). Quando la luce solare è scarsa o in ambienti controllati, vengono utilizzate le lampade LED per fornire l'illuminazione necessaria al processo fotosintetico. Una strategia efficace per massimizzare la produttività delle colture di alghe può essere l'integrazione di fonti luminose naturali e artificiali.



Figura 4: esempio di impianti industriali di tipo "PONDS". Adattato da (Jerney & Spilling, 2020).

Entrambe le tipologie presentano i loro vantaggi e svantaggi.

La coltura in ponds presenta un minor costo, ma allo stesso tempo è maggiormente soggetta a contaminazioni.

Con la coltura in PBRs, invece, si hanno costi maggiori, ma viene ridotto il rischio di contaminazioni, inoltre, nei fotobioreattori si ha una produttività in termini di biomassa maggiore (Barkia et al., 2019).

La produzione di biomassa a livello industriale richiede il raggiungimento di elevate densità cellulari al fine di massimizzare la produzione e ridurre i costi dei processi di raccolta. Ciò porta a una distribuzione non uniforme della luce nella coltura, con le cellule superficiali che assorbono la maggior parte della radiazione incidente, lasciando agli strati interni una luce limitante. La limitazione della luce ha implicazioni significative per il metabolismo fotosintetico e influisce sulla produttività della biomassa, in quanto è essenziale per il processo fotosintetico. Migliorare l'efficienza di conversione dell'energia luminosa in biomassa è essenziale per incrementare la produttività della coltivazione industriale delle alghe e renderla sia economicamente che energeticamente sostenibile (Perin et al., 2017) (Simionato, Basso, et al., 2013). Di conseguenza, possono essere attuate ricerche dal punto di vista biotecnologico con l'obiettivo di migliorare l'efficienza di utilizzo della luce da parte delle microalghe. Molti studi si sono concentrati sulla fase luminosa della fotosintesi. Questi miglioramenti comprendono, ad esempio, lo studio del trasporto degli elettroni. La fase oscura, invece, ha ricevuto molta meno attenzione dal punto di vista biotecnologico, in termini di come possa essere ottimizzata per sfruttare meglio la luce limitata su scala industriale.

1.5 INGEGNERIA GENETICA IN *N. gaditana*

Per rendere più efficiente un sistema produttivo, la ricerca si concentra su strategie volte a migliorare le rese spesso scarse, cercando di comprendere quali siano i fattori limitanti. Tra gli aspetti cruciali si trovano: la selezione accurata delle specie da utilizzare e l'ottimizzazione delle condizioni di coltivazione. Un punto fondamentale per sfruttare appieno il potenziale di questi organismi è l'applicazione dell'ingegneria genetica nella ricerca biotecnologica. In questo modo si possono isolare specie che possono essere ottimizzate per perseguire l'obiettivo di massimizzare la resa a livello industriale.

Il successo della modifica delle microalghe richiede l'espressione permanente dei geni inseriti dopo la trasformazione nucleare o cloroplastica (Mutanda et al., 2020). La maggior parte degli studi condotti riguardo a questo campo sono stati svolti utilizzando la specie modello *Chlamydomonas reinhardtii* (Mutanda et al., 2020).

Tra le tecniche utilizzate per la modificazione genetica delle microalghe, vi è il sistema CRISPR-Cas, utile per effettuare modifiche genomiche in modo efficiente.

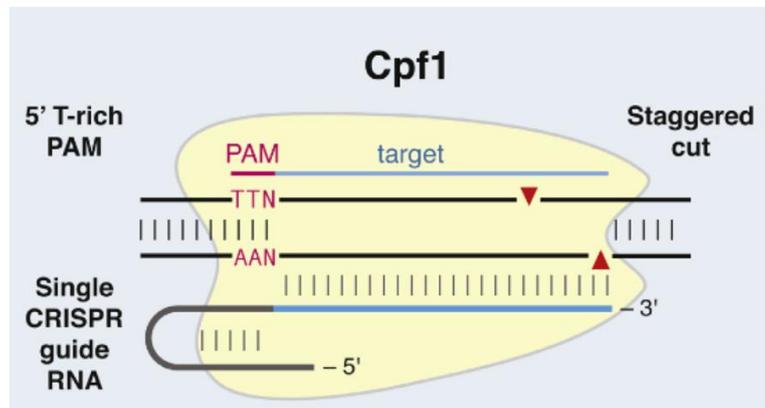


Figura 5: Cpf1 è una nucleasi guidata da RNA che fa parte del sistema di difesa in batteri e può essere utilizzata per l'editing genomico. La figura schematizza il suo meccanismo di azione: essa riconosce la sequenza PAM 5'-TTN-3' per effettuare il DSB. Immagine riadattata da: Zetsche et al., 2015

Il clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-Cas (proteine associate a CRISPR) è un sistema immunitario adattativo procariotico presente nella maggior parte degli archea e in molti batteri (Makarova & Koonin, 2015).

Il CRISPR-Cas è basato sulla formazione di Double Strand Breaks (DSBs) ottenuti grazie all'attività degli enzimi Cas, guidati nel processo da specifiche sequenze di RNA. Esistono 3 tipi distinti di sistemi CRISPR-Cas e dieci sottotipi per ciascuno dei quali sono stati identificati i geni di riferimento (Makarova & Koonin, 2015).

Tra i vari meccanismi CRISPR esistenti, vi è quello basato sulla proteina Cpf1 (Figura 5): un'endonucleasi di classe II, più piccola delle proteine CAS, in grado di effettuare un taglio nella doppia elica del DNA, lasciando delle estremità coesive di 4-5 nucleotidi. Questa proteina appartiene al sistema CRISPR di *Prevotella* e *Francisella* (Gupta et al., 2019)

L'enzima Cpf1 è in grado di elaborare autonomamente l'RNA precursore CRISPR (crRNA). Utilizza un singolo crRNA per riconoscere una sequenza nota come Protospacer Adjacent Motif (PAM) ricca in timina (T) (Zaidi et al., 2017; Zetsche et al., 2015) e infine provoca la generazione di estremità "sticky" durante il processo di taglio del DNA.

Queste particolari proprietà rendono il sistema CRISPR/Cpf1 un'interessante alternativa al sistema CRISPR/Cas9 e un promettente strumento per l'editing genico. Può anche essere utilizzata per l'inserzione di sequenze di DNA tramite meccanismo di ricombinazione omologa (HR). In particolare, in letteratura sono

documentati casi di applicazioni del metodo CRISPR/Cas per l'interruzione di geni target in *N.gaditana* (Vogler et al., 2021) e dell'impiego della tecnica CRISPR-Cpf1 per isolare ceppi ottimizzati mirati alla produzione di lipidi (Naduthodi et al., 2019).

1.6 RICOMBINAZIONE OMOLOGA

La ricombinazione omologa (Figura 6) è il meccanismo principale con cui un segmento di DNA può essere incorporato all'interno di un frammento di DNA più grande.

Perché avvenga, è necessario che le due molecole di DNA abbiano dei tratti di sequenza identici (cioè omologhi). Si sviluppa attraverso una sequenza di fasi, che comprendono: il riconoscimento di sequenze omologhe, la creazione di strutture di DNA eteroduplex, l'effettuazione di tagli nel DNA, lo scambio di segmenti di DNA e il successivo processo di riparazione.

La ricombinazione omologa è alla base dei meccanismi di riarrangiamento dei cromosomi durante la meiosi, favorendo il crossing over tra i cromosomi omologhi (James D. Watson et al., s.d.). Inoltre, sono fondamentali per permettere alle cellule di riparare le rotture a doppio filamento del DNA (DSBs), risultando un importante meccanismo di protezione della cellula. Da qui l'idea di sfruttare questo meccanismo in combinazione con CRISPR-Cpf1 per inserire nel genoma ospite una determinata sequenza di interesse sfruttando il taglio a doppio filamento creato.

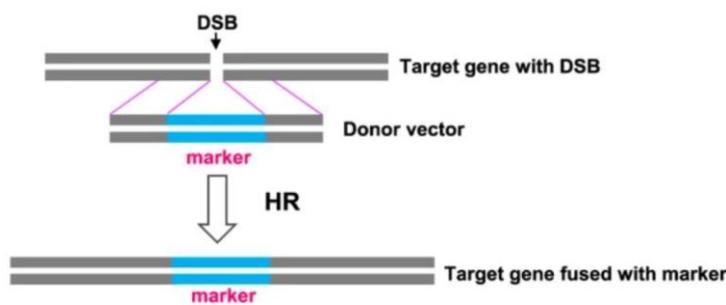


Figura 6: illustrazione schematica dell'evento di ricombinazione omologa. Questo meccanismo può essere sfruttato per introdurre sequenze di DNA all'interno di un determinato gene bersaglio. immagine riadattata da (Yoshino et al., 2019)

1.7 FOTOSINTESI

Le tecniche di ingegneria genetica, di cui si è discusso, possono essere utilizzate per migliorare l'efficienza del processo fotosintetico al fine di migliorare la resa in biomassa delle microalghe.

Il processo di fotosintesi è caratteristico degli organismi fotoautotrofi come le piante, i batteri fotosintetici e le alghe.

Lo scopo della fotosintesi è quello di catturare l'energia luminosa e convertirla in energia chimica contenuta in composti organici ridotti (David L. Nelson, s.d. p.786). Nelle cellule eucariotiche fotosintetiche il processo di fotosintesi avviene nei cloroplasti: organelli subcellulari tipici delle cellule vegetali. I cloroplasti (Figura 7), così come i mitocondri, sono il risultato di un rapporto di simbiosi instaurato tra un organismo procariote ed una cellula eucariote ospite. Essi sono costituiti, nella maggior parte dei casi da due membrane: una esterna ed una interna, quella interna deriva dalla membrana originale dell'organismo inglobato, mentre quella esterna deriva dall'evento di fagocitosi.

La membrana interna assume complesse strutture chiamate tilacoidi, al cui interno è presente lo stroma (fase acquosa con diversi enzimi al suo interno). I tilacoidi si organizzano in strutture più grandi chiamati "grana".

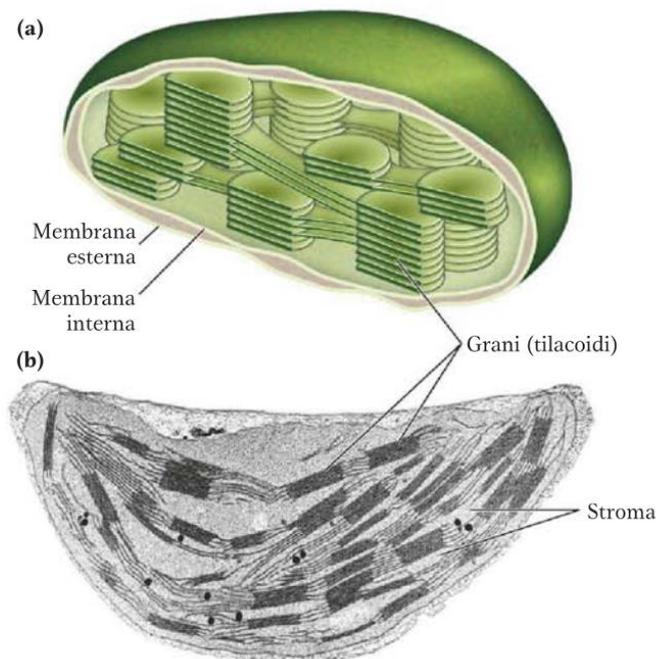


Figura 7: i cloroplasti. a) rappresentazione schematica. b) fotografia al microscopio elettronico ad alto ingrandimento che mette in evidenza i grani, pile di membrane dei tilacoidi. Immagine adattata da (David L. Nelson, s.d.), p.787.

Nel processo di fotosintesi si distinguono due fasi cruciali. La prima (Figura 8) è costituita dalle reazioni che dipendono dalla presenza di luce in modo diretto. Questi processi avvengono nei tilacoidi dei cloroplasti e coinvolgono la trasformazione dell'energia solare in energia chimica, con la produzione di ossigeno, ATP e NADPH.

La seconda fase: l'insieme delle reazioni di assimilazione del carbonio, avviene indipendentemente dalla luce diretta. Queste reazioni utilizzano l'energia chimica accumulata durante le fasi dipendenti dalla luce per convertire la CO_2 in zuccheri complessi come il glucosio. Questo processo è essenziale per la produzione di sostanze organiche e rappresenta un passaggio fondamentale nella fotosintesi delle piante superiori (David L. Nelson, s.d. p.787).

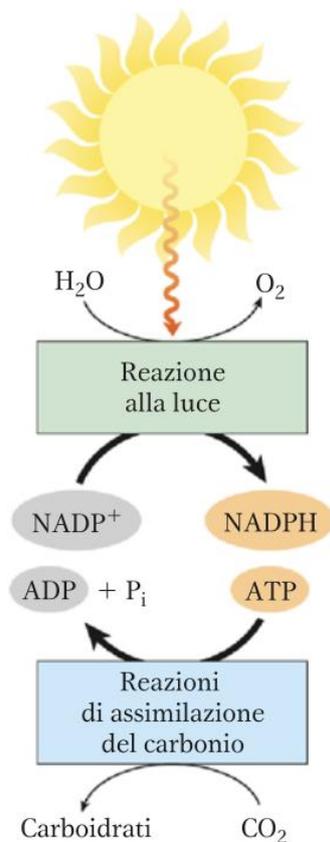


Figura 8: le reazioni alla luce della fotosintesi generano molecole ricche di energia come l'ATP e il NADPH a carico della luce solare. L'NADPH e l'ATP sono utilizzati nelle reazioni di assimilazione del carbonio, che possono avvenire sia alla luce sia al buio; la CO_2 viene ridotta a triosi e a composti molto più complessi (come il glucosio), derivanti però dai triosi. Immagine adattata da (David L. Nelson, s.d.)p.786.

FASE LUMINOSA

Per poter convertire l'energia luminosa in energia chimica sono necessari dei complessi molecolari che catturino l'energia luminosa.

I sistemi deputati a ciò sono i sistemi antenna, i quali sono costituiti da proteine e pigmenti come le clorofille ("a", "b", "c") e carotenoidi come β -carotene che è ubiquitario. Nelle alghe verdi e nelle piante terrestri, i più comuni sono: luteina, violaxantina e neoxantina, nelle Rhodophyta zeaxantina e luteina.

I pigmenti permettono di raccogliere l'energia luminosa e di convogliarla verso i centri di reazione del FOTOSISTEMA II (PSII) e del FOTOSISTEMA I (PSI) (Figura 9). Il centro di reazione del PSII viene indicato con la sigla P680 ad indicare la capacità di raccogliere energia luminosa con lunghezza d'onda pari a 680nm, mentre il centro di reazione del PSI viene indicato come P700 (David L. Nelson, s.d., p.793).

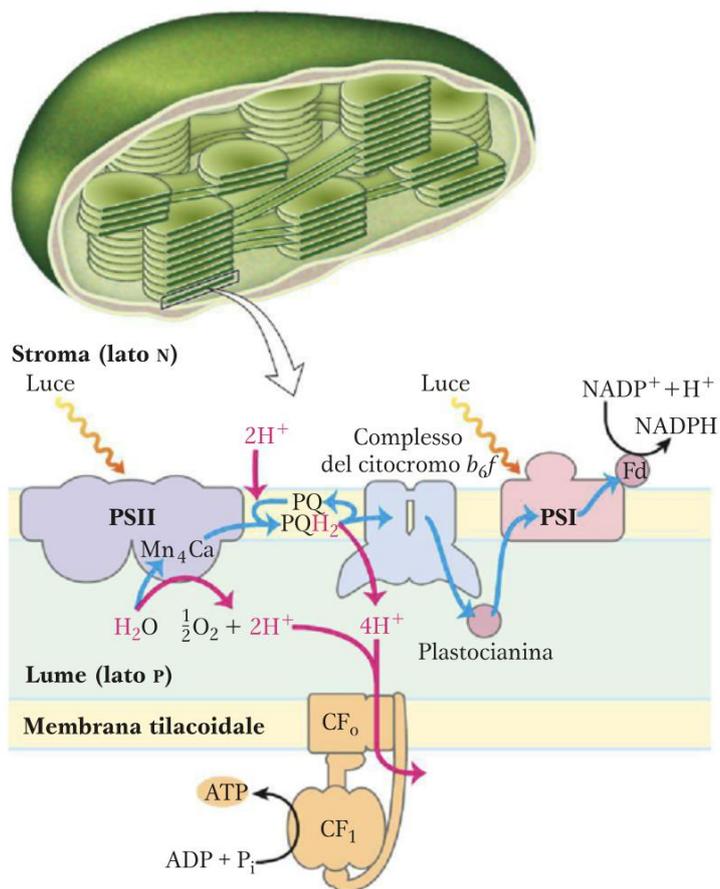


Figura 9: circuiti elettronici e protonici nei tilacoidi da (David L. Nelson, s.d.)

La luce viene assorbita dal PSII (Figura 9) e viene utilizzata per l'eccitazione di e dalle clorofille che costituiscono il centro di reazione. Questi elettroni vengono

portati alla feofitina che viene ridotta, mentre il centro di reazione viene ossidato prelevando elettroni da molecole di H₂O, la quale subisce una scissione in H⁺ ed O₂ (la cui molecola viene dispersa nell'ambiente). Si innesca, così, un processo redox che porta elettroni da:

- Feofitina → plastochinone;
- Plastochinone → complesso del citocromo b6/f;
- Complesso del citocromo b6/f → plastocianina;

Il PSI (P700) viene eccitato dalla luce, perde i suoi elettroni trasferendoli alla ferridossina e li recupera prelevando gli elettroni provenienti dalla plastocianina (ri-ossidazione del PSI). Da qui passano all'enzima Ferridossina-NADP⁺-reduttasi, il quale permette la riduzione dell'NADP⁺ a NADPH.

Tutto questo processo comporta, quindi, la formazione di NADPH. Un altro prodotto è l'ATP che deriva dal processo di formazione di un gradiente elettrochimico all'interno del lume dei tilacoidi, dovuto ai protoni derivanti dall'H₂O che viene scissa in H⁺ ed O₂ e dall'attività di pompaggio degli H⁺ da parte del complesso del citocromo b6f. I protoni passano dal lume allo stroma grazie all'enzima ATP-sintasi, permettendo la formazione di ATP.

Quindi, alla fine della fase luminosa avremo i seguenti prodotti (Figura 10):



Figura 10: bilancio complessivo delle reazioni della fase luminosa della fotosintesi.

Le molecole di ATP ed NADPH servono per alimentare la fase oscura della fotosintesi.

Su alcuni aspetti della fase luminosa della fotosintesi possono essere effettuate alcune misurazioni tramite il monitoraggio della fluorescenza della clorofilla con strumenti come il PAM – Dual 100 (Walz) (Metodi 3.3.5). Tramite misura indiretta della fluorescenza della clorofilla, i parametri misurabili sono diversi e verranno descritti nel dettaglio in Metodi 3.3.5.

FASE OSCURA

Durante la FASE OSCURA avviene quello che viene definito “CICLO DI CALVIN-BENSON” (Figura 11): una serie di reazioni, che avvengono nello stroma dei cloroplasti e che portano alla formazione di gliceraldeide-3-fosfato (G3P).

Il pathway è illustrato in figura 8:

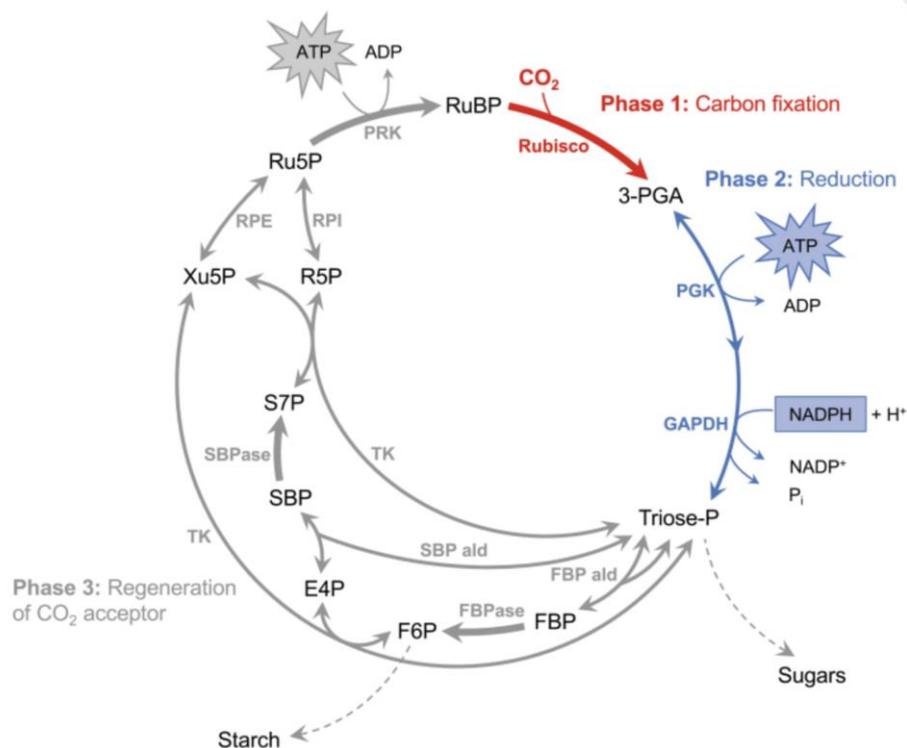


Figura 11: illustrazione del ciclo di Calvin-Benson. Adattato da (Schreier & Hibberd, 2019)

Le reazioni del ciclo di Calvin-Benson si dividono in 3 fasi:

1. Fase di carbossilazione: una molecola di CO₂ subisce una reazione di condensazione con una molecola a 5 atomi di carbonio (C) chiamata ribuloso-1,5-bisfosfato. Passando per un intermedio a 6 atomi di C, si ha la formazione di 3-fosfoglicerato (3PGA). La reazione avviene ad opera dell'enzima ribuloso-1,5-bisfosfato-carbossilasi-ossigenasi (RUBISCO);
2. Fase di riduzione: sfruttando il gruppo fosfato dell'ATP e gli elettroni donati da NADPH si ha la produzione di 2 molecole di GLICERALDEIDE-3-FOSFATO (G3P) che servirà sia per la fase di rigenerazione, sia per andare a produrre zuccheri;
3. Fase di rigenerazione: la G3P viene utilizzato per andare a ricostituire il RuBP;

Durante il ciclo di Calvin vengono sfruttate le molecole di ATP ed NADPH ottenute nella fase luminosa, in modo da andare a produrre (in assenza di luce) G3P e molecole che possano mantenere il ciclo attivo. In totale (Figura 12) per produrre una molecola di glucosio serve la fissazione di 3 molecole di CO₂ con 3 molecole di RuBP e questo permette di produrre 6 molecole di G3P grazie anche all'utilizzo di 6 ATP e 6 NADPH. Delle 6 G3P prodotte una sola viene utilizzata per la produzione del glucosio, mentre le altre 5 vengono riassemblate (spendendo 3 ATP) per la rigenerazione di 3 molecole di RuBP.



Figura 12: bilancio complessivo reazioni della fase oscura.

1.8 MECCANISMI DI REGOLAZIONE DELLA FOTOSINTESI

Gli organismi fotosintetici in natura sono esposti a condizioni variabili di luce. Quest'ultima può essere limitante o in eccesso. Nel primo caso si ha una riduzione del processo fotosintetico, mentre nel secondo caso si può avere un sovraccarico dei fotosistemi con conseguente produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), dannose per l'apparato fotosintetico, come lo ione superossido ed H₂O₂ che vengono prodotti soprattutto a livello del PSI, mentre a livello del PSII viene prodotto maggiormente ossigeno singoletto. Quindi, gli organismi fotosintetici devono regolare l'assorbimento della luce per evitare danni dovuti all'eccessiva eccitazione che potrebbe portare alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Krieger-Liszkay & Shimakawa, 2022). Esistono diversi sistemi con i quali gli organismi fotosintetici attuano questa tipologia di protezione ed uno di questi è il sistema del non-photochemical quenching (NPQ), del quale si può misurare l'attivazione tramite misure indirette della fluorescenza della clorofilla (Metodi 3.3.5).

1.9 NON-PHOTOCHEMICAL QUENCHING (NPQ)

Nelle alghe e nelle piante, il NPQ (Non-Photochemical Quenching) è un processo complesso che coinvolge diversi componenti con meccanismi attivati in tempi variabili, che vanno da pochi secondi a diversi minuti dopo l'esposizione a una luce intensa. Dissipa l'eccesso di energia sotto forma di calore (Grouneva et al., 2008; Nilkens et al., 2010; Niyogi & Truong, 2013). Le piante e le alghe attivano il

meccanismo di NPQ per proteggersi dallo stress ossidativo, ed è principalmente regolato da variazioni di pH. Ad esempio, nelle piante, la proteina PsBs svolge un ruolo essenziale nella risposta veloce, agendo come un sensore di pH. Nelle alghe, diversi complessi antenna coinvolti nella raccolta della luce (come LHCSR in alghe verdi e LHCX in diatomee) sono coinvolti nel NPQ in risposta a luce intensa o a livelli limitati di CO₂. L'NPQ è attivato da processi di protonazione che causano un cambiamento nella conformazione delle proteine coinvolte, passando da un ruolo di assorbimento della luce a uno di dissipazione del calore (Chukhutsina et al., 2017). Nell'NPQ è coinvolto anche il ciclo delle xantofille, che rappresenta uno dei meccanismi di controllo della fotosintesi, coinvolgendo una trasformazione reversibile tra due pigmenti ossigenati denominati violaxantina e zeaxantina. La violaxantina favorisce l'assorbimento della luce, quindi è prediletta in situazioni di illuminazione limitata, mentre la zeaxantina agevola la dissipazione della luce in eccesso ed è quindi preferita in condizioni di intensa luminosità. La velocità di attivazione di questi sistemi varia tra le diverse specie: ad esempio, nelle diatomee è più rapida rispetto alle piante o alle alghe verdi.

1.10 FOTORESPIRAZIONE

La RUBISCO è la carbossilasi del ciclo di Calvin-Benson e converte a livello globale ogni anno ~100 gigatonnellate di carbonio (in forma di CO₂) in biomassa. Questo tasso di fissazione corrisponde a circa 10 volte di più delle emissioni umane annuali (Bar-On & Milo, 2019)(Prywes et al., 2023; Raven, 2009).

L'enzima RUBISCO si è evoluto circa 3 miliardi di anni fa a partire da enzimi coinvolti nel metabolismo dello zolfo ed è, ad oggi, l'enzima maggiormente responsabile della fissazione della CO₂ (Peterhansel et al., 2010).

L'ambiente in cui l'enzima RUBISCO si è evoluto era un ambiente con una concentrazione di CO₂ circa 100 volte maggiore di quella attuale (Peterhansel et al., 2010). Nel corso del processo evolutivo l'O₂ è risultato predominante, per via degli stessi organismi fotosintetici che lo hanno prodotto. In questo contesto la RUBISCO è entrata in contatto con due gas molto simili (CO₂ ed O₂), portando al problema della reazione della stessa con l'ossigeno (reazione ossigenasica).

La reazione ossigenasica prevede che RUBISCO vada a fissare, nel primo step del ciclo di Calvin Benson, l'ossigeno al posto dell'anidride carbonica, portando alla produzione di una molecola di 3-fosfoglicerato (3PG) ed una molecola di 2-fosfoglicolato (2PG). Quest'ultima molecola risulta essere tossica perché va a

bloccare molti enzimi del metabolismo fotosintetico (Peterhansel et al., 2010). Per limitare i danni derivati dalla tossicità, gli organismi fotosintetici hanno sviluppato un pathway che aiuti a gestire il 2PG e di reintegrarlo come 3PGA.

Il processo della fotorespirazione avvenendo all'interno di 3 diversi organelli: cloroplasti, mitocondri e perossisomi, prevede l'utilizzo di ATP e, inoltre, porta all'emissione di CO₂ precedentemente fissata nel processo di fotosintesi ed all'emissione di NH₃.

Da qui deriva la problematica riguardante una possibile influenza negativa di questo pathway nel processo di produzione di biomassa: viene spesa energia per fissare CO₂ che, poi, con la fotorespirazione viene nuovamente emessa.

Il pathway è illustrato in figura 13:

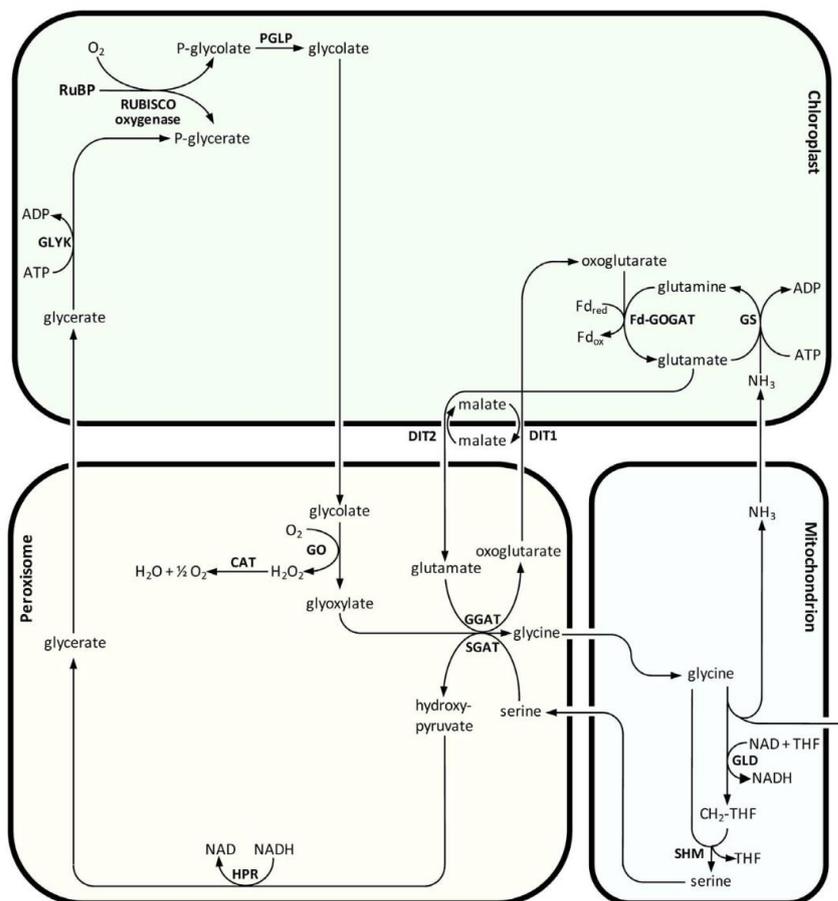


Figura 13: illustrazione pathway fotorespirazione. Adattato da (Peterhansel et al., 2010)

In questo elaborato si parlerà della reazione della fotorespirazione catalizzata dall'enzima glicolato-ossidasi (GOX) (Figura 14): permette la conversione del

glicolato in gliossilato. Avviene nel perossisoma, con eliminazione di H₂O₂ che viene gestita dall'enzima catalasi;

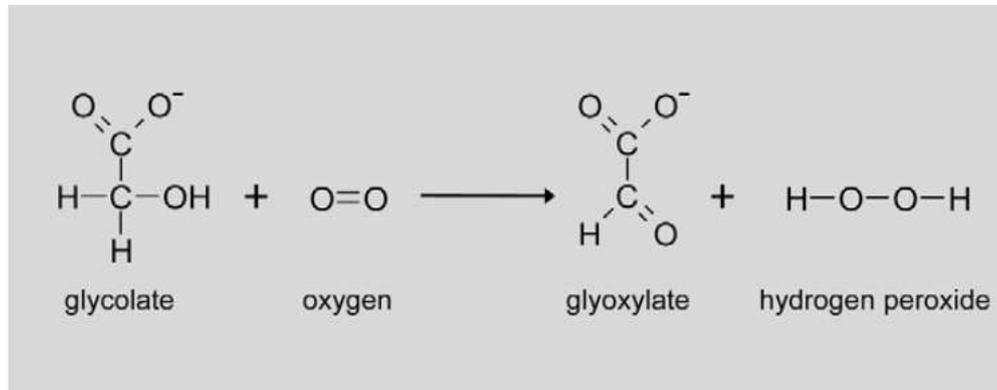


Figura 14: reazione catalizzata dall'enzima GOX. Adattato da (Peterhansel et al., 2010)

Inoltre, dagli studi in *Arabidopsis thaliana* è risultato che il processo di fotorespirazione subisce un'accentuazione in condizioni di alte temperature e di assenza di acqua (situazione che per le microalghe non si verifica) per i seguenti motivi:

- La specificità di RUBISCO per CO₂ rispetto ad O₂ diminuisce con l'aumentare della temperatura;
- La solubilità dell'O₂ in soluzioni acquose come il citoplasma e lo stroma diminuisce meno rispetto a quella della CO₂ alle alte temperature;
- In condizioni di aridità le piante tendono a minimizzare gli scambi gassosi, trattenendo tutto l'O₂ al loro interno.

Tutte queste considerazioni sono state svolte in *Arabidopsis Thaliana* (Peterhansel et al., 2010). Quindi, scopo di questa tesi sarà anche quello di caratterizzare, tramite l'utilizzo di mutanti, la fotorespirazione in *Nannochloropsis gaditana*, in modo da porre le basi per ulteriori studi che possano mettere in luce come questo pathway possa essere accentuato, in organismi diversi dalle piante. Questo perché, sviluppandosi in ambiente acquoso, le microalghe devono affrontare situazioni diverse rispetto alle piante terrestri.

1.11 MECCANISMI DI CONCENTRAZIONE DEL CARBONIO (CCM)

Gli organismi fotosintetici che vivono in ambienti acquatici sono limitati dalla disponibilità di carbonio inorganico (Ci), dovuta alla minore diffusione della CO₂ nell'acqua. Evolutivamente questa difficoltà è stata superata tramite i "Carbon

Concentration Mechanisms" (CCM): meccanismi molecolari che consentono di concentrare il carbonio nei pressi all'enzima RUBISCO (figura 15). Ciò non solo aumenta l'efficienza della fissazione del carbonio, ma riduce anche gli effetti della reazione di ossigenazione dello stesso enzima riducendo di conseguenza la frequenza del processo di fotorespirazione. Anche nelle alghe del genere *Nannochloropsis* questo meccanismo è risultato essere basato su enzimi come l'anidraasi carbonica (CA) che permette di convertire il carbonio inorganico disciolto (DIC, dissolved inorganic carbon) in ione idrogenocarbonato. Quest'ultimo, attraverso dei trasportatori del bicarbonato viene concentrato nei pressi dell'enzima RUBISCO che, a differenza di alghe come *Chlamydomonas reinhardtii*, non si trova all'interno di strutture specializzate dette pirenoidi. In *Nannochloropsis* è stata rilevata la presenza dell'anidraasi carbonica di tipo alfa CAH1, all'interno del lume del Reticolo Endoplasmatico (Gee & Niyogi, 2017).

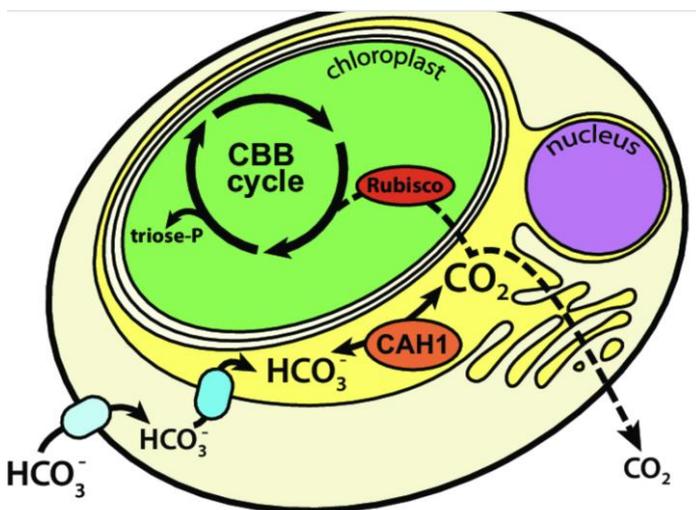


Figura 15: rappresentazione schematica del CCM presente in *N. oceanica*. I trasportatori pompano il bicarbonato nel citoplasma. All'interno della cellula, l'enzima CA genera la CO₂, utilizzabile dall'enzima RUBISCO. immagine adattata da (Gee & Niyogi, 2017)

1.12 BYPASS FOTORESPIRATORI

Ad oggi si ha la possibilità, tramite l'ingegneria genetica di agire direttamente sul genoma di un organismo per poterne migliorare le prestazioni, in termini di produzione di biomassa e di miglioramento dell'efficienza fotosintetica.

Nell'ottica della massimizzazione della produzione di biomassa, sono possibili diversi approcci: ottimizzare la fase luminosa della fotosintesi, riducendo la dimensione dei sistemi antenna (Bar-Even, 2018; Blankenship & Chen, 2013; Ort et al., 2011) o permettendo la produzione di ulteriori pigmenti presenti in natura

per espandere lo spettro della radiazione fotosinteticamente attiva alla gamma dell'infrarosso (Allakhverdiev et al., 2016; Bar-Even, 2018; Blankenship & Chen, 2013; Wolf et al., 2018) ma anche accelerando l'adattamento della fotosintesi a intensità luminose in rapido cambiamento. In ultima analisi si potrebbe andare ad agire sulla RUBISCO stessa: aumento del tasso di carbossilazione, riduzione del tasso di ossigenazione, aumento della specificità verso la CO₂ (Bar-Even, 2018; Whitney, Houtz, et al., 2011; Whitney, Sharwood, et al., 2011; Wilson & Whitney, 2017). In questo elaborato viene proposto un approccio di miglioramento basato sulla creazione di un bypass al processo fotorespiratorio. In pratica si cerca di sostituire la fotorespirazione con un pathway che possa comunque permettere la detossificazione dal 2PG, ma che non comporti gli svantaggi (emissione di CO₂) della fotorespirazione stessa: si può parlare di bypass a “zero emissioni”, quindi che non portino ad un’emissione di CO₂ o che comportino un’ulteriore fissazione della CO₂.

1.13 CICLO DEL BETA-IDROSSIASPARTATO

In questo elaborato verrà preso in considerazione il ciclo del beta-idrossiaspartato (BHAC) (Schada von Borzyskowski et al., 2019) (figura 16): il quale rappresenta una delle poche soluzioni, inteso come pathway da utilizzare a scopo di bypass. Inoltre, è l’unico pathway sul quale sono stati fatti già dei lavori di implementazione. Il BHAC viene preso in considerazione come possibile catena di reazioni da implementare per massimizzare la resa in biomassa in *N. gaditana*. Questo pathway è stato individuato nel proteobatterio *Paracoccus denitrificans* e permette ai proteobatteri marini di metabolizzare il glicolato: metabolita molto presente nelle acque in forma di acido organico disciolto, permettendo loro di utilizzarlo come fonte di carbonio.

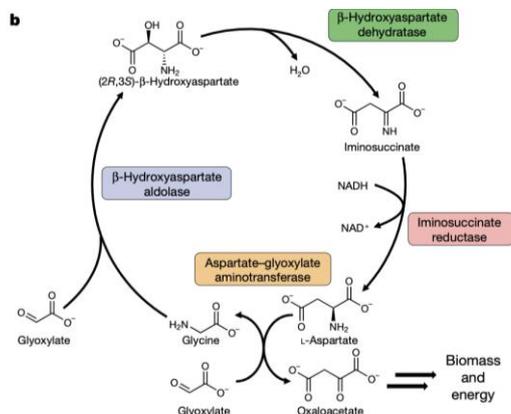


Figura 16: schema del ciclo del beta-idrossiaspartato presente in proteobatteri marini. Immagine adattata da Schada von Borzyskowski et al., 2019

Affinché il pathway BHAC possa iniziare vi è la necessità di gliossilato come substrato del pathway. Questa molecola, inoltre, alla fine del ciclo va a reagire con aspartato per andare a formare glicina ed ossalacetato (utili per la produzione di biomassa ed energia). Inoltre, si vuole attuare questo pathway all'interno del cloroplasto, quindi, anche il gliossilato dovrà essere prodotto al suo interno a partire dal glicolato già presente (prodotto, nel cloroplasto dall'attività dell'enzima PGLP), ma senza la produzione di H₂O₂. Da qui, la necessità di indirizzare il prodotto dei geni inseriti, al cloroplasto.

Data la difficoltà nell'attuare l'inserimento di 5 geni diversi nel genoma di un organismo; in *N. gaditana* non si è programmato l'inserimento di tutti i geni necessari per il pathway, ma si è puntato all'inserimento di due geni in particolare: gene che codifica per l'enzima glicolato-deidrogenasi (GDH) (esterno al pathway BHAC) e gene che codifica per l'enzima ASGAT (aspartato-gliossilato-amminotransferasi). GDH (proviene da *Chlamydomonas reinhardtii*) (Kebeish et al., 2007) (figura 17) e catalizza la reazione da glicolato a gliossilato senza utilizzare O₂ e senza produzione di H₂O₂. ASGAT catalizza la reazione da gliossilato che reagisce con aspartato per ottenere glicina ed ossalacetato. Il lavoro di questi due enzimi è comunque sufficiente a detossificare la cellula dal 2PG.

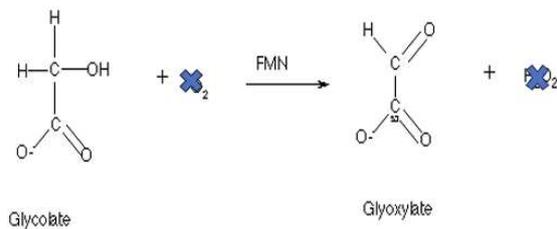


Figura 17: reazione catalizzata dall'enzima GDH nel cloroplasto. Quest'enzima permette la conversione del glicolato in gliossilato senza utilizzo di O₂ e senza produzione di H₂O₂.

2. SCOPO DELLA TESI

C'è una crescente richiesta globale di biomassa per scopi alimentari, energetici (come i biocarburanti) e mangimi. Di conseguenza, si rendono necessarie politiche mirate a migliorare le produzioni, mantenendo sempre come priorità la sostenibilità.

Oggi, l'attenzione si sposta verso il miglioramento degli organismi stessi utilizzati per la produzione di biomassa vegetale e nel caso di questo lavoro, le microalghe. Le microalghe, in particolare, emergono come potenziale risposta a questa sfida grazie alla loro capacità di produrre una vasta gamma di composti, come i triacilgliceroli (importanti per la produzione di biodiesel), i pigmenti, i carboidrati e gli acidi grassi omega-3 (utili a scopi alimentari).

Il miglioramento della produzione di biomassa dalle microalghe passa per l'ottimizzazione dell'efficienza fotosintetica.

In questo lavoro di tesi, l'attenzione si concentra sulle microalghe del genere *Nannochloropsis*. Tra le varie soluzioni per migliorarne la produzione di biomassa, questo lavoro di tesi si è concentrato sullo studio della fotorespirazione.

L'obiettivo di questo progetto è quello di studiare il meccanismo di fotorespirazione nelle microalghe del genere *Nannochloropsis*: sebbene ampiamente studiato in organismi modello come *Arabidopsis thaliana*, questo meccanismo non è stato ancora esplorato in *Nannochloropsis*.

Inoltre, si vuole valutare il ruolo della fotorespirazione nella produzione di biomassa, in quanto potrebbe risultare limitante, dato che prevede l'emissione di CO₂. In particolare, potrebbe risultare limitante in condizioni di crescita industriali, nelle quali si creano delle condizioni limitanti per la crescita cellulare, dovute ad una non omogenea distribuzione della luce ed a possibili regioni di scarsa disponibilità di carbonio per l'elevata concentrazione cellulare.

Tutto ciò avviene attraverso la creazione e la caratterizzazione di mutanti K.O. del gene *gox*: gene che codifica per un importante enzima del pathway di fotorespirazione. La caratterizzazione avviene in varie condizioni di crescita ed intensità d'illuminazione.

Inoltre, viene valutata l'implementazione di possibile bypass del processo di fotorespirazione tramite il pathway BHAC. L'obiettivo è ottenere mutanti in grado di detossificare le cellule dal 2PG senza emettere CO₂ precedentemente fissata dal ciclo di Calvin-Benson.

3. MATERIALI E METODI

3.1 METODICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

3.1.1 Polimerase Chian Reaction (PCR)

La tecnica della Polimerase Chian Reaction (PCR) è stata utilizzata per ottenere i singoli frammenti necessari al protocollo di OE-PCR (Overlap-Extension-PCR) per la creazione del costrutto unico di delezione e del costrutto unico di espressione per i geni per glycolate dehydrogenase (GDH) ed aspartate-gloxylate-aminotransferase (ASGAT). Le componenti di reazione per ogni PCR sono indicate di seguito (Tabella 1):

COMPONENTI	CONCENTRAZIONI
H ₂ O	A volume
5X Phusion HF buffer	1X
dNTPs	200µM
Primer 10µM (Fw+Rev)	0,2µM
Templato DNA*	variabile
Phusion DNA Polymerase (Thermo Scientific™)	1 unità/50µL

Tabella 1: componenti e concentrazioni della miscela di reazione di PCR. *Il templato per l'amplificazione della cassetta di resistenza è DNA plasmidico, di cui si utilizzano 1-10 ng

I parametri utilizzati per la reazione di amplificazione sono riportati in tabella 2.

STEP	TEMPERATURA	TEMPO
Denaturazione iniziale (1 ciclo)	98°C	30s
<ul style="list-style-type: none">• Denaturazione• Appaiamento• Estensione (35 cicli)	98°C 45-72°C* 72°C	10s 30s **
Estensione finale (1 ciclo)	72°C 4°C	5 minuti -

Tabella 2: parametri utilizzati nelle reazioni di PCR condotte con la polimerasi Phusion High-Fidelity. *le temperature di appaiamento utilizzate sono calcolate utilizzando il calcolatore di Temperatura di Melting specifico per la polimerasi Phusion High-Fidelity:

https://www.thermofisher.com/it/en/home/brands/thermoscientific/molecular_biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html

** il tempo necessario alla fase di estensione degli ampliconi di interesse è calcolato sulla base della processività della polimerasi Phusion High-Fidelity: 15- 30 s/kb.

In tabella 3 sono presenti i primer impiegati per amplificare le sequenze di interesse. Le porzioni sottolineate indicano le estremità dei primer utilizzate nella tecnica di overlap extension-PCR (OE-PCR) per la fusione dei frammenti di DNA per la delezione del gene *gox*

HR 5'	GOX FW	ATACGCATGCCTGAGGAAGGGCGTTTGTGC
	GOX REV	<u>TCGGGGCAGCAGCT</u> CTGTCTCTTCCGCT
Cassetta di resistenza	ZeoR FW	<u>AGCGGAAGAGACAGAGCT</u> GCTGCCCCGA
	ZeoR REV	<u>CGTACTCCGCTGGC</u> CTCGAGAAAACCTCA
HR 3'	GOX FW	<u>TGAGTTTTCTCGAG</u> GCCAGCGGAGTACG
	GOX REV	GATTCGAGAAGATGTGCTCCGACACATCAA

Tabella 3: coppie di primer per amplificare le regioni di interesse. Le sequenze sono utilizzate per la generazione del costrutto di delezione per *gox*.

Di seguito sono riportate le sequenze dei primer necessari all'amplificazione tramite PCR dei frammenti di DNA utili per la creazione della cassetta di espressione per GDH (Tabella 4) e per ASGAT (Tabella 5). Anche qui le regioni sottolineate hanno lo stesso significato precedentemente espresso.

FRAMMENTI PRIMERS

Promotore <i>lhcx1</i> + Peptide segnale	Fw:	TCTGGTGGGTCTCTGTCCTACTTTTTATTTCCTTTA
	Rev:	<u>TGGTGATGGTGATGACGAGTGCGAGACC</u>
Gene per GDH	Fw:	<u>GGTCTCGCACTCGT</u> CATCACCATCACCA
	Rev:	<u>TTTTTAAGGAAGGT</u> ITAGGCGGTTTTGG
Terminatore <i>fcpA</i>	Fw:	<u>CCAAAACCGCCTAAACCTT</u> CCTTAAAA
	Rev:	CGATAGGTCTCCCGAGCCGAAAACCTCATCCTGTGCC

Tabella 4: coppie di primer per amplificare le regioni di interesse per la cassetta con gene per GDH. In questo caso i frammenti ottenuti verranno utilizzati per la creazione del costrutto per il bypass fotorespiratorio.

FRAMMENTI PRIMERS

Promotore <i>lhcx1</i> + Peptide segnale	Fw:	TCTGGTGGGTCTCTGTCCTACTTTTTATTTCCTTTAAC
	Rev:	<u>ACATCGTAAGGGTAACGAGTGCGAGACC</u>
Gene <i>bhca</i> (ASGAT)	Fw:	<u>GGTCTCGCACTCGT</u> TACCCTTACGATGT
	Rev:	<u>TTTTTAAGGAAGGT</u> ITCAAGCAGCCTTCT
Terminatore <i>fcpA</i>	Fw:	<u>AGAAGGCTGCTTGAACCTT</u> CCTTAAAAATTT
	Rev:	CGATAGGTCTCCCGAGCCGAAAACCTCATCCTGTGCC

Tabella 5: coppie di primer per amplificare le regioni di interesse per la cassetta con *bhcA*. In questo caso i frammenti ottenuti verranno utilizzati per la creazione del costrutto per il bypass fotorespiratorio.

3.1.2 OVERLAP EXTENSION PCR (OE-PCR):

Questa tecnica si avvale della PCR per unire frammenti di DNA, senza la necessità di utilizzare enzimi di restrizione e ligazione. Alla base della tecnica di overlap extension-PCR (OE-PCR) vi è l'utilizzo di primer per amplificare singoli frammenti che contengono sia una sequenza complementare al frammento d'interesse, sia una regione aggiuntiva complementare alla terminazione del frammento che si desidera legare a quello amplificato (Figura 18). Questa è una strategia efficace per unire e manipolare sequenze di DNA, consentendo anche la creazione di costrutti genetici su misura per una vasta gamma di applicazioni. Nel caso di questo elaborato, la metodica di OE-PCR è stata utilizzata per unire i frammenti (promotore, sequenza codificante, terminatore) necessari ad ottenere la cassetta di delezione per il gene *gox* e le cassette d'espressione per GDH ed ASGAT.

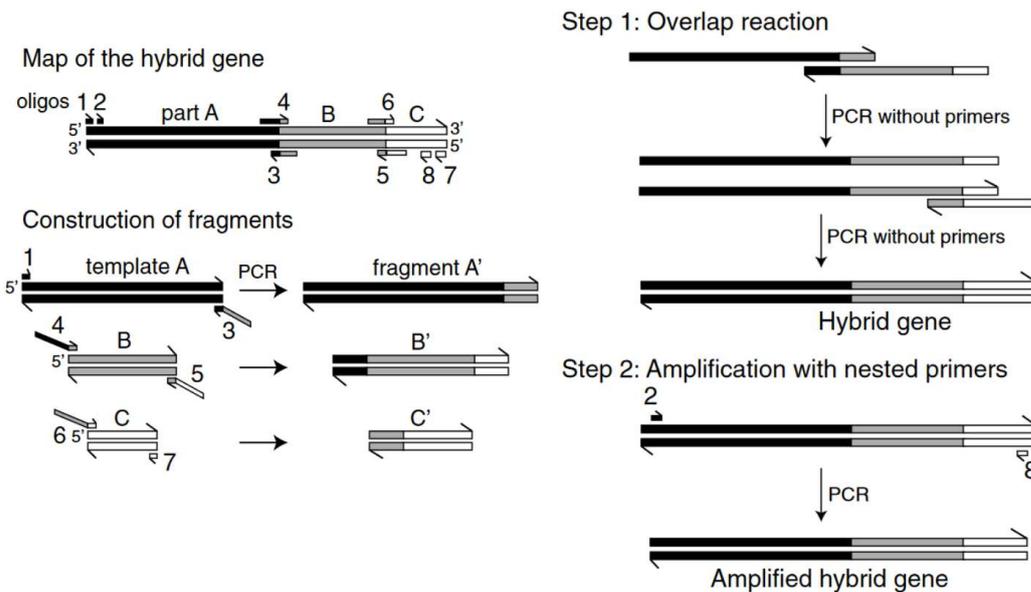


Figura 18: Nella figura a sinistra, viene fornito un esempio di un prodotto finale di OE-PCR, costituito dai frammenti A, B e C. Questi frammenti possono rappresentare parti specifiche del DNA, come un promotore (A), una sequenza codificante (B) e un terminatore (C), come nel caso della generazione delle cassette dei geni *gdh* e *bhcA*. Ogni frammento viene amplificato singolarmente tramite PCR. Utilizzando primers specifici, le estremità 3' dei frammenti di DNA si appaiono, mentre le code al 5' consentono la sovrapposizione necessaria per la formazione del costrutto finale (Nelson & Fitch, 2011).

Nella figura a destra, vengono delineate le due fasi cruciali della tecnica OE-PCR:

1. **Prima fase senza primer:** Qui, le estremità 3' dei singoli filamenti si appaiono tra loro senza l'uso di primers. Questo processo di appaiamento consente la creazione del costrutto combinato desiderato.

2. **Seconda fase con primer:** Il prodotto ottenuto dalla fase precedente viene amplificato utilizzando primer esterni specifici. Questo passaggio mira ad amplificare in modo mirato il costrutto genetico desiderato.

I due step del processo (Figura 18) sono stati portati avanti seguendo il seguente protocollo:

La prima parte di reazione (senza l'utilizzo di primer) (Figura 18) serve per generare il costrutto unico dato dai tre frammenti di interesse. Di solito, si utilizzano circa 100 ng di materiale genomico per 1 kb di frammento nella reazione di PCR. Per calcolare i rapporti molari, strumenti online come NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) sono stati utilizzati per determinare le proporzioni corrette.

Le reazioni di PCR sono condotte in un volume di 50 µL.

Tutta questa parte di processo viene eseguita con un protocollo di touch-down-pcr per evitare la formazione di aspecifici. La touchdown-PCR mira ad aumentare la specificità della PCR, quindi, ridurre la probabilità di errori di appaiamento dei primer. La temperatura di annealing iniziale in è impostata ad una temperatura superiore (5°C–10°C) rispetto alla temperatura di melting (T_m) dei primer. Ciò aiuta a creare legami più stabili tra i primer e il DNA bersaglio. Per consentire una maggiore specificità e amplificare principalmente la sequenza bersaglio desiderata, la temperatura di annealing viene successivamente gradualmente ridotta nei cicli successivi, arrivando ad una temperatura di 2-5°C più bassa della T_m dei primer (Zhang et al., 2013).

La prima parte di reazione prevede il protocollo indicato in Tabella 6.

STEP	TEMPERATURA	TEMPO
Denaturazione iniziale (1 ciclo)	94°C	30s
<ul style="list-style-type: none"> • Denaturazione • Appaiamento+Estensione (9 cicli)	94°C 72°C (-0,5°C/cycle)	15s Variabile*
<ul style="list-style-type: none"> • Denaturazione • Appaiamento • Estensione (5 cicli)	94°C 67,5°C (-0,5°C/cycle) 72°C	15s 15s Variabile*
Estensione finale	72°C	2minuti

(1 ciclo)	10°C	-
-----------	------	---

Tabella 6: parametri utilizzati nella prima fase della reazione di OE-PCR condotta con la polimerasi Q5 (senza primer).

La seconda parte di reazione (con primer) (figura 18) prevede gli step indicati di seguito (Tabella 7):

STEP	TEMPERATURA	TEMPO
Denaturazione iniziale (1 ciclo)	94°C	30s
<ul style="list-style-type: none"> • Denaturazione • Appaiamento • Estensione (17 cicli)	94°C 67°C (-0,5°C/cycle) 72°C	15s 15s *Variabile
<ul style="list-style-type: none"> • Denaturazione • Appaiamento • Estensione (23 cicli)	94°C 59°C (-0,5°C/cycle) 72°C	15s 15s Variabile*
Estensione finale (1 ciclo)	72°C 10°C	2minuti -

Tabella 7: parametri utilizzati nella seconda fase della reazione di OE-PCR condotta con la polimerasi Q5 (con primer). il tempo necessario alla fase di estensione degli ampliconi di interesse è calcolato sulla base della processività della polimerasi Q5 utilizzata durante il processo: 15- 30 s/kb.

Per i due step di reazione sono stati utilizzati le seguenti componenti (Tabelle 8 e 9):

Step1

COMPONENTI	CONCENTRAZIONI
5X Q5 reaction buffer	10 µL
10 mM dNTP	2 µL
Promotore (~100 ng/Kb)	X µL
Sequenza codificante (~100 ng/Kb)	X µL
Terminatore (~100 ng/Kb)	X µL
Q5 DNA polimerasi	0.5 µL
H2O	A volume per 50 µL

Tabella 8: componenti e concentrazioni della miscela di reazione di PCR per la prima fase.

Step2

COMPONENTI	CONCENTRAZIONI
5X Q5 reaction buffer	10 μ L
10 mM dNTP	2 μ L
Reazione di PCR dello Step 1	4 μ L
Primer Fw esterno (1–2.5 μ M)	1 μ L
Primer Rev esterno (1–2.5 μ M)	1 μ L
Q5 DNA polimerasi	0.5 μ L
H2O	A volume per 50 μ L

Tabella 9: componenti e concentrazioni della miscela di reazione di PCR per la seconda fase.

a) OE-PCR per la generazione del costrutto di delezione genica di *gox*

Il costrutto finale prevede la presenza di: due regioni di omologia con la sequenza genomica del gene *gox* (in 5' e 3'), poste in mezzo a queste due è presente la sequenze per la cassetta di resistenza alla zeocina: promotore Ubiquitina, *Sh-ble* (gene che codifica per l'enzima necessario alla resistenza all'antibiotico Zeocina) e terminatore *fcpA*.

Il template per le sequenze di omologia al 5' ed al 3' del locus genico bersaglio è il DNA genomico estratto da *N. gaditana*; mentre, quello utilizzato per le sequenze della cassetta di resistenza è DNA plasmidico. Per la reazione di OE-PCR servono dai 50 ai 150ng di template per ciascun frammento. La miscela di reazione dei due step viene riportata in Tabelle 8 e 9. Al termine della prima fase (Tabella 6), viene allestita la seconda fase (Tabella 7), per l'amplificazione del costrutto totale. Le coppie di primers utilizzati corrispondono a quelli più esterni (primer Forward HR 5' + Primer Reverse HR 3'), illustrati in Tabella 10 per GOX.

GOX Fw:	ATACGCATGCCTGAGGAAGGGCGTTTGTGC
GOX Rev:	GATTCGAGAAGATGTGCTCCGACACATCAA

Tabella 10: coppie di primer utilizzati per la seconda fase di OE-PCR per l'ottenimento del costrutto di delezione genica.

b) OE-PCR per la generazione dei costrutti di bypass

Sia per GDH, sia per ASGAT sono stati utilizzati i protocolli indicati precedentemente in Tabelle 6 e 7 e le miscele di reazione sono quelle riportate in tabelle 8 e 9 ed i primer utilizzati nella seconda fase di OE-PCR sono riportati in tabelle 11 e 12:

Per GDH:

Primer FW:	TCTGGTGGGTCTCTGTCCTACTTTTTATTTCCTTTA
Primer REV:	CGATAGGTCTCCCGAGCCGAAAACATCCTGTGCC

Tabella 11: coppie di primer utilizzati per la seconda fase di OE-PCR per l'ottenimento del costrutto di espressione per GDH

Per ASGAT:

Primer FW:	TCTGGTGGGTCTCTGTCCTACTTTTTATTTCCTTTAAC
Primer REV:	CGATAGGTCTCCCGAGCCGAAAACATCCTGTGCC

Tabella 12: coppie di primer utilizzati per la seconda fase di OE-PCR per l'ottenimento del costrutto di espressione per ASGAT.

3.1.3 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

La tecnica di elettroforesi su gel d'agarosio è un metodo impiegato per separare i frammenti di DNA in base al loro peso molecolare.

Il gel d'agarosio viene generalmente preparato ad una concentrazione dell'0,8-1% (peso/volume), sciogliendo polvere di agarosio in una soluzione tampone TAE (40 mM Tris pH 8, 20 mM acido acetico, 1 mM EDTA). Dopo essere stato riscaldato a 85-95°C, si aggiunge l'intercalante, come EuroSafe – Fluorescent Nucleic Acid Stain (Euroclone) 20.000X, ad una concentrazione di 0,005 µL/ml. Questo intercalante consente la visualizzazione delle bande di DNA attraverso l'emissione di fluorescenza quando esposte a raggi UV. Applicando un campo elettrico a un voltaggio costante, generalmente compreso tra 100 e 110 V, si induce la migrazione delle molecole (molecole polianioniche) verso il polo positivo. La separazione dei frammenti di DNA avviene in base al peso molecolare, con le molecole più piccole che migrano più velocemente rispetto a quelle di peso molecolare maggiore.

Per avere un riferimento sulle dimensioni e le quantità di DNA, è stato utilizzato un marker come il GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermofisher), contenente frammenti di DNA di lunghezze note.

3.1.4 PURIFICAZIONE DEL DNA

La purificazione del DNA è essenziale per eliminare contaminanti e ottenere campioni di DNA puri per ulteriori analisi o applicazioni sperimentali. Esistono diversi metodi per poterlo effettuare e durante il mio progetto di tesi ho utilizzato i seguenti:

a) Purificazione dalla miscela di reazione di PCR utilizzando il Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit:

Questo kit è impiegato per isolare e purificare gli ampliconi generati dalla reazione di PCR, rimuovendo primer, dNTPs, enzimi, sali e altri composti organici. Vengono utilizzate delle colonne che permettono di legare il DNA in soluzione e rimuovere i contaminanti attraverso processi di lavaggio e successiva eluizione del DNA purificato.

b) Estrazione dal gel di agarosio con il Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit:

In questo caso, la banda su gel di agarosio corrispondente alla sequenza di interesse viene tagliata, trasferita in una Eppendorf e processata utilizzando il GeneJET Gel Extraction Kit. Questo permette di estrarre e purificare il DNA specifico dalla banda del gel, eliminando frammenti aspecifici, o parziali, prodotti durante l'amplificazione tramite PCR o, nel mio caso, anche di OE-PCR.

c) Precipitazione con sodio acetato e isopropanolo:

È possibile utilizzare questa tecnica per ottenere una soluzione concentrata di DNA eliminando contaminanti come fenolo, carboidrati, composti organici, proteine, enzimi e sali. Il sodio acetato e l'isopropanolo devono essere aggiunti alla soluzione che contiene il DNA, quindi, esso viene precipitato per centrifugazione. Una soluzione di DNA purificato viene ottenuta dopo il lavaggio con etanolo al 70%.

0,1 volumi di sodio acetato 3M (a un pH di 5,2) e 0,7 volumi di isopropanolo vengono aggiunti alla soluzione contenente il DNA. L'alta concentrazione di sale (sodio acetato) facilita l'interazione con le cariche del DNA, rendendo più facile per il DNA precipitare nell'isopropanolo.

La miscela viene centrifugata per 30' a 4°C ed a 18000 g. Il DNA viene separato dal resto della soluzione dalla forza centrifuga, creando un pellet sul fondo del tubo.

Viene aggiunto etanolo al 70% per lavare il pellet di DNA. Successivamente, un secondo ciclo di centrifugazione viene utilizzato per rimuovere i residui di etanolo. Si preleva il surnatante, senza lasciare seccare il pellet, e si lascia evaporare l'etanolo per 10- 20 min.

Il pellet è risospeso in 20-50 μL di acqua sterile Milli-Q. La soluzione è conservata a -20°C .

3.1.5 QUANTIFICAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

Il NanoDropTM ND-1000 Spectrophotometer di Thermo Scientific è uno strumento (spettrofotometro) comunemente utilizzato per la quantificazione di acidi nucleici, come il DNA e l'RNA. Il software che è collegato allo strumento calcola automaticamente la concentrazione di acidi nucleici e valuta la purezza del campione. La procedura inizia con la misurazione del "blank", (acqua deionizzata sterile). Successivamente, il campione viene posizionato sulla piattaforma del NanoDrop caricandone tipicamente 1 μL . Questo strumento può misurare l'assorbanza del campione a 230 nm e 280 nm. La presenza di carboidrati contaminanti nel campione è definita dal rapporto A260/230: un valore inferiore a 2 indica una certa quantità di contaminanti come fenoli e carboidrati. Il rapporto A260/280 mostra la presenza di contaminanti proteici nel campione: il valore ideale per il DNA è di circa 1,8 e per l'RNA è di circa 2. Un rapporto inferiore a questi numeri indica che ci sono contaminanti proteici.

3.1.6 ESTRAZIONE DI RNA DA *N. gaditana* E RETROTRASCRIZIONE

Cellule da una coltura di *Nannochloropsis* vengono centrifugate e dal pellet l'RNA viene estratto e poi retrotrascritto.

I passaggi del protocollo per estrazione e retrotrascrizione dell'RNA sono i seguenti:

- Da ogni coltura viene prelevato 1ml e posto in eppendorf con tappo a vite da 1ml;
- Viene effettuata una centrifugazione a 5000g per 10';
- Viene rimosso il surnatante;
- Il pellet viene trasferito in azoto liquido e conservato a -20°C ;
- Si aggiungono 50 μL di soluzione TRIZOL e bead glass (SIGMA) del diametro di 150-200nm per coprire il pellet di cellule;
- Seguono 3 cicli di 30'' a velocità massima allo strumento BeadsBeater (Biospec), alternati a 1' di raffreddamento a T ambiente.
- Si aggiungono 950 μL di TRIZOL per ottenere un volume di 1 mL e si esegue un ciclo aggiuntivo con il BeadsBeater;

- 15' di vortex e quindi 5 minuti di riposo a temperatura ambiente per consentire la disgregazione dei complessi ribonucleoproteici.
- Si aggiungono 200 ml di cloroformio, si mescolano e si lascia riposare per 10' a temperatura ambiente.
- Centrifugazione a 12000 g per 15' a 4°C. Questa fase suddivide la soluzione in tre fasi distinte: una fase acquosa con RNA, un'interfase di DNA e una fase organica con proteine.
- Si trasferisce la fase acquosa superiore in una nuova eppendorf e si aggiungono 0,5 ml di isopropanolo (in ghiaccio).
- Si mescola la soluzione e si lascia riposare per 10' a temperatura ambiente.
- Centrifuga 12000 g per 10' a 4°C. L'RNA precipita in un pellet.
- Si effettuano lavaggi con etanolo al 75% (1 mL) dopo l'eliminazione del surnatante. Segue un mescolamento rapido con il Vortex e centrifuga di nuovo a 12000 g, 5' a 4°C. I campioni possono essere conservati per un anno ad una temperatura di -20 °C.
- In questa fase, l'etanolo viene fatto evaporare per 10–20' e il pellet viene risospeso in 30–50 µL di acqua DEPC trattata: 15'' vortex, 5' a 65°C e, nuovamente, 15'' vortex.

Come descritto in precedenza, l'RNA estratto viene quantificato tramite Nano-DROP (Metodi 3.1.5). Prima di effettuare la retrotrascrizione, vengono eliminate eventuali contaminazioni da DNA genomico usando una DNasi. In questo caso viene allestita una reazione come in Tabella 13.

COMPONENTE	QUANTITÀ
RNA	1 µL
Buffer di reazione 10X con MgCl	1 µL
DNasi 1u, libera da RNasi	1 µL
Acqua trattata DEPC	A volume finale di 10 µL

Tabella 13: componenti e concentrazioni della miscela di reazione di PCR.

Per 30', la miscela di reazione è incubata a temperatura ambiente: Successivamente viene aggiunta la Stop solution e la reazione viene incubata per

10' a 65°C in modo da fermare l'attività della DNasi. Successivamente, vengono aggiunte le componenti indicate in Tabella 14.

COMPONENTI	QUANTITÀ
RNA templato	1µg
Primers oligo(dT)	0,5µg
Acqua DEPC	a volume

Tabella 14: componenti e concentrazioni della miscela di reazione di PCR.

Dopo aver effettuato un'incubazione di 5' a 65°C, vengono aggiunte le componenti indicate in Tabella 15, in modo da attuare la retrotrascrizione.

COMPONENTI	QUANTITÀ
H2O DEPC	A volume
5X Buffer per la retrotrascrizione	4 µL
Inibitore di RNasi RiboLock (Thermo Scientific)	20 U
dNTPs 10mM	2 µL
Trascrittasi Inversa RevertAid	1 µL

Tabella 15: componenti e concentrazioni della miscela di reazione di PCR.

La reazione viene incubata per 60' a 42°C dopo l'aggiunta di tutte le componenti. Per inattivare l'enzima (Trascrittasi inversa), l'ultima fase prevede di riscaldare la miscela per 10' a 70°C.

Successivamente è stata utilizzata una RT-PCR: un processo di PCR effettuato sul cDNA ottenuto, in modo da verificare la presenza del trascritto del gene *gox*. Il processo prevede di utilizzare un controllo, dato dall'amplificazione di un gene housekeeping. Nel caso di questo progetto, il gene housekeeping considerato è il gene che codifica per QSAM. Quindi, vengono allestite due reazioni di PCR, una portata avanti con i primer per rilevare la presenza del trascritto di *gox* (Tabella 16) ed una con i primer per *qsam* (Tabella 17).

<i>gox</i> FW:	CGAGAAAATCGAGCGGCTTTTCG
<i>gox</i> REV:	GCAGCATTTGCAACCTGCCC

Tabella 16: coppia di primer utilizzata per la reazione di RT-PCR di *gox*.

<i>qsam</i> FW:	CACCCTTTGTCGGTCTTTGT
-----------------	----------------------

<i>qsam</i> REV:	GGGCCGTTTCAAATTCAGGT
------------------	----------------------

Tabella 17: coppia di primer utilizzata per la reazione di RT-PCR di *qsam*.

3.1.7 PREPARAZIONE E ASSEMBLAGGIO DELLE RIBONUCLEOPROTEINE PER LA TRASFORMAZIONE DI *N. gaditana*

Per il gene *gox*, sono state disegnate tre guide a RNA a singolo filamento (sgRNA), utilizzando il sito: <http://crispor.tefor.net/>

Le sequenze sono indicate in Tabella 18.

sgRNA	Sequenza nucleotidica
I	GCCTACGCGAAAGCGACCCTCCCCAAA
II	TGGAAGACGGGAAGCAGATGTTTCGAAA
III	TTTCGGATATCCAGCGGTCTATGGTCA

Tabella 18: sequenze delle guide ad RNA utilizzate.

L'endonucleasi Cpf1 commerciale purificata utilizzata (IDT, integrated DNA Technologies) viene fatta interagire con le sgRNA *in vitro*, seguendo il protocollo indicato in Tabella 19.

COMPONENTE	QUANTITÀ
sgRNA	1 μ M
NEBuffer 3.1	1 μ M
H ₂ O milliQ	30 μ M

Tabella 19: coppia di primer utilizzata per la reazione di RT-PCR di *qsam*.

Le concentrazioni specificate vengono utilizzate per impostare la mix di reazione. Dopo, si procede con il mescolamento e l'incubazione per un periodo di 15' a 37°C al fine di consentire l'assemblaggio delle sgRNA e delle Cpf1 ed ottenere ribonucleoproteine (RNP). Successivamente, per testare le guide a RNA *in vitro*, ai complessi RNP assemblati vengono aggiunti 100 ng di DNA templato e incubati a 37°C per 1h.

3.2 COLTURA E TRASFORMAZIONE

3.2.1 COLTURA DI CELLULE DI *N. GADITANA*

La specie *Nannochloropsis gaditana*, ceppo 849/5, è stata acquistata dal CCAP (Colture Collection of Algae and Protozoa) e viene coltivata in un terreno F/2 minimo. Per preparare questo terreno, viene utilizzato un sistema di pompa a vuoto (KNF Lab) con filtri di nitrocellulosa da 0.45 μm per filtrare l'acqua di mare. La salinità dell'acqua filtrata è del 32% in quanto questi filtri trattengono il materiale particellare e consentono il passaggio dei sali. Seguono l'aggiunta di Tris (Trizma – SIGMA) ad una concentrazione finale 40 mM e del bicarbonato ad una concentrazione finale 40mM. Con l'utilizzo di HCl 6N, il pH del terreno viene mantenuto ad un valore di 8. Prima di sterilizzare in autoclave, vengono aggiunti 10 g/l di Plant Agar (Duchefa Biochimie) se il terreno deve essere solido. Si aggiunge, quindi, il Marine Water Enrichment Solution di Guillard (F/2) che fornisce i microelementi e le vitamine necessarie per la crescita della microalga. Le colture in terreno liquido vengono mantenute a 22 °C in una cella termostata, in beute, bottiglie di tipo Drechsel o fiaschette. È possibile mantenere la luce in un regime continuo o in un fotoperiodo (16 ore di luce e 8 ore di buio). Per promuovere lo scambio gassoso, viene mantenuta un'agitazione costante a 100 rpm; Per le colture che simulano una condizione di crescita in un impianto industriale, l'aria addizionata di CO₂ al 5% viene insufflata con un flusso di 1 l/h nelle bottiglie che simulano le condizioni di un FOTOBIOREATTORE (PBR). Inoltre, per le colture riguardanti i mutanti KO per *gox*, al terreno (sia solido che liquido), viene aggiunta Zeocina in concentrazione 3,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ al fine di selezionare solo i mutanti che hanno integrato il costrutto per la resistenza all'antibiotico stesso.

3.2.2 TRASFORMAZIONE DI *N. gaditana*

Il processo di trasformazione genetica delle cellule di *Nannochloropsis gaditana* mediante l'elettroporazione coinvolge diverse fasi:

1. Preparazione delle cellule: le cellule vengono ottenute da una coltura in piastra, successivamente stemperate in un mezzo di crescita F/2 e coltivate in beuta un'agitazione ad un'illuminazione di circa $100\mu\text{molphotons m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2. Preparazione alla trasformazione: durante la fase esponenziale di crescita, la coltura viene trasferita in una bottiglia di tipo Drechsel e coltivata in eccesso di CO₂ (5%) e di azoto (12 mM di NaNO₃). Una volta acclimata a queste condizioni di crescita, la coltura viene utilizzata per allestire una curva di crescita partendo da una concentrazione iniziale di 7x10⁶ cellule/ml.
3. Raccolta: per ogni trasformazione sono necessari 500x10⁶ cellule/ml; quindi, viene prelevato il volume di coltura (necessario ad avere la concentrazione di cellule indicata) richiesto e centrifugato a 3500g per 10' a temperatura ambiente. Viene rimosso il surnatante e le cellule vengono risospese in 5 mL di D-sorbitolo Plant Cell Tested 375 mM, a 4°C. Successivamente sono previsti tre cicli di centrifugazione a 3500 g per 5' ciascuno, seguiti da lavaggi con D-sorbitolo. Dopo l'ultimo lavaggio, le cellule vengono risospese per ottenere un volume di 100 µl per ogni trasformazione.
4. Trasformazione delle cellule: le cellule, insieme al materiale genetico, vengono mantenute in ghiaccio per 15' e successivamente inserite in cuvette preraffreddate. Si esegue, quindi l'elettroporazione con un elettroporatore ECM 630 a 12000 V/cm e i parametri specifici (voltage, resistenza, capacità) come indicati: voltage 2400V; resistenza:500 Ω; capacità: 50 µF . Un *time-constant* (valore che indica il tempo impiegato dalla corrente per raggiungere l'estremità della cuvetta) di 20-25 ms è considerato ottimale.
5. Recovery e coltivazione delle cellule trasformate: dopo l'elettroporazione, le cellule sono trasferite in un Recovery medium (F/2 con Tris-HCl e bicarbonato) e coltivate a bassa luce (20 µmol photons m⁻² s⁻¹) per circa 48h. Successivamente, le colonie vengono lasciate crescere a 22°C per un periodo di 30-35 giorni, arricchendo l'ambiente con CO₂ o utilizzando bicarbonato (NaHCO₃) nel terreno come alternativa.

3.3 ANALISI FISIologiche E BIOCHIMICHE

3.3.1 CONTA CELLULARE

Lo strumento Cellometer Auto X4 prodotto da Nexcellom Bioscience viene utilizzato per misurare la quantità di cellule presenti in un terreno liquido.

Mediante misurazioni in brightfield, lo strumento Cellometer Auto X4 fornisce dati sulla concentrazione totale di cellule, mentre le misure di fluorescenza consentono di identificare il numero di cellule vitali.

Il processo prevede la raccolta di 20 µL di coltura liquida, che vengono successivamente caricati su supporti specifici e inseriti all'interno della camera di lettura dello strumento dopo un intervallo di 10'.

1. Misure in Brightfield: queste misure rivelano il numero totale di cellule nel campione in campo chiaro.

2. Misure di Fluorescenza: queste procedure consentono il conteggio delle cellule vitali nel campione. La fluorescenza viene rilevata alla lunghezza d'onda di massima emissione della clorofilla.

3.3.2 DETERMINAZIONE DEL PESO SECCO

La determinazione della produttività della biomassa per tutti i ceppi esaminati è stata effettuata attraverso determinazione del peso secco della biomassa prima e dopo il processo di diluizione delle colture in semicontinuo. La concentrazione di biomassa è stata quantificata in termini di peso secco (DW) mediante la filtrazione di 5 mL di coltura diluita 1:5 per rimuovere i sali. Questo è stato realizzato utilizzando filtri di acetato di cellulosa con pori di dimensione 0,45 µm. I filtri sono stati successivamente essiccati a una temperatura di 60 °C per almeno 24 ore, e i pesi secchi sono stati misurati in grammi per litro. La produttività della biomassa è stata poi calcolata tramite la formula $([C_f] - [C_i]) / (t_f - t_i)$, dove C rappresenta la concentrazione di biomassa finale o iniziale della coltura, mentre t indica il numero di giorni considerato nel calcolo.

3.3.3 ESTRAZIONE DEI PIGMENTI CON N, N-DIMETILFORMAMMIDE (DMF)

Per estrarre clorofille e carotenoidi, 1 ml di coltura viene centrifugato a 5000g per 10' a temperatura ambiente. Per facilitare l'estrazione dei pigmenti, il pellet è stato

risospeso in 1 ml di DMF (Sigma) dopo la rimozione del surnatante. L'intero processo è stato condotto al buio. I campioni sono stati quindi conservati al buio a 4°C.

3.3.4 QUANTIFICAZIONE IN ASSORBANZA DI CLOROFILLE E CAROTENOIDI IN *Nannochloropsis gaditana*

Per l'analisi in assorbanza dei pigmenti contenuti nei ceppi di *N. gaditana* Viene utilizzato uno spettrofotometro a due raggi Cary 60 UV-VIS (agilent). Uno spettrofotometro è uno strumento utilizzato per misurare l'assorbimento di luce da parte di una sostanza in funzione della lunghezza d'onda. Il funzionamento dello spettrofotometro si basa sul principio per il quale le diverse sostanze assorbono la luce in modo diverso a diverse lunghezze d'onda. Misurando l'assorbimento della luce da parte di una sostanza è possibile ottenere informazioni sulla concentrazione della stessa nel campione analizzato, secondo la legge di Lamber-Beer:

$$A = \varepsilon * l * C$$

A = valore di assorbanza (adimensionale)

ε = coefficiente di estinzione molare (identificativo di ogni molecola)

L = lunghezza del cammino ottico

C = concentrazione della specie in esame

Dopo centrifugazione e rimozione del surnatante, il pellet ottenuto secondo protocollo di estrazione dei pigmenti (Metodi 3.3.3) è stato risospeso in 1ml di DMF e successivamente 50 μ l di soluzione sono stati prelevati e diluiti in ulteriori 450 μ l di DMF ed analizzati allo spettrofotometro.

I pigmenti estratti con DMF sono stati quantificati utilizzando cuvette di quarzo con una lunghezza di percorso di 1 cm. Per calcolare la concentrazione di clorofille e carotenoidi in ciascun campione, sono state adottate le formule indicate (Figura 19):

$$Chl a [\mu g/ml] = (12 - Abs_{664}) - (3.11 - Abs_{646})$$

$$Car [\mu g/ml] = [(1000 - Abs_{480}) - (1.12 - [Chl a])] \div 245$$

Figura 19: formule utilizzate per il calcolo della concentrazione di clorofille e carotenoidi.

Eventuali differenze significative sono state valutate mediante il test t di Student a due code, senza appaiamenti.

3.3.5 MISURAZIONI SULLA FLUORESCENZA DELLA CLOROFILLA

Alcuni parametri fotosintetici come il non-photochemical quenching (NPQ), l'efficienza fotosintetica o il trasporto elettronico (ET), possono essere valutati tramite analisi *in vivo* della fluorescenza della clorofilla.

Viene sfruttato uno strumento chiamato "Pulse Amplitude Modulation PAM – Dual 100" (Walz).

Lo strumento misura la fluorescenza della clorofilla ed è in grado di farlo anche quando la luce di eccitazione è attiva, tramite un sistema di pulsazione modulate. prende in considerazione le diverse tipologie di percorso che può effettuare l'energia luminosa quando viene assorbita dalla clorofilla nei fotosistemi.

Principalmente possono essere 3 (Figura 20) le diverse tipologie di processi derivanti: NPQ, emissione sotto forma di fluorescenza e fotosintesi.

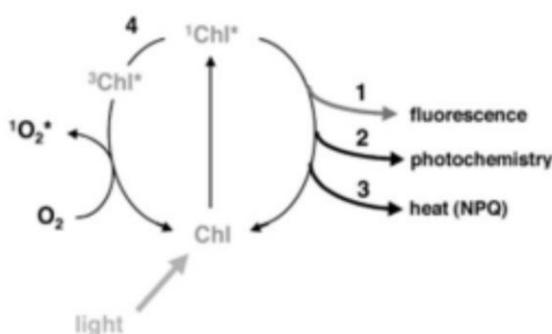


Figura 20: diverse vie di diseccitazione della clorofilla. Adattato da (PAM-CONTROL Universal Control Unit Hein Walz GmbH, 1999)

Il processo di NPQ prevede la dissipazione dell'energia sotto forma di calore. La fotosintesi porta l'energia luminosa ed essere convertita in energia chimica

necessaria alla sopravvivenza della pianta, mentre il processo di fluorescenza porta all'emissione di parte dell'energia assorbita, sotto forma di radiazione elettromagnetica.

Questi tre processi sono complementari, quindi, l'aumento di attività di uno indicherebbe la riduzione di quella degli altri due. Di conseguenza, misurando la fluorescenza della clorofilla è possibile ottenere informazioni indirette sulla fotochimica e sulla fotoprotezione tramite NPQ.

Prima delle misurazioni il campione viene mantenuto al buio per circa 30' di modo che tutti i PSII siano "aperti", ossia recettivi alla luce, ed il meccanismo di NPQ sia disattivato.

Le misure effettuate al PAM utilizzano più impulsi luminosi sequenziali. La measuring light ha un'intensità più debole, viene emessa per un tempo breve e, quindi, non è sufficiente per provocare il trasferimento di elettroni, consentendo quindi la misurazione della fluorescenza basale (F_0) delle cellule.

Il flash di saturazione ha un'intensità molto elevata (raggiunge $6000 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e una durata molto breve (meno di 1 s), quindi non può contribuire significativamente alla fotosintesi. Ma è in grado di saturare tutti i fotosistemi, riducendo tutti i carriers di elettroni. In queste condizioni, tutta l'energia viene liberata o dissipata come calore o fluorescenza. Ciò consente di identificare la massima efficienza fotosintetica e l'efficienza di dissipazione nota come NPQ.

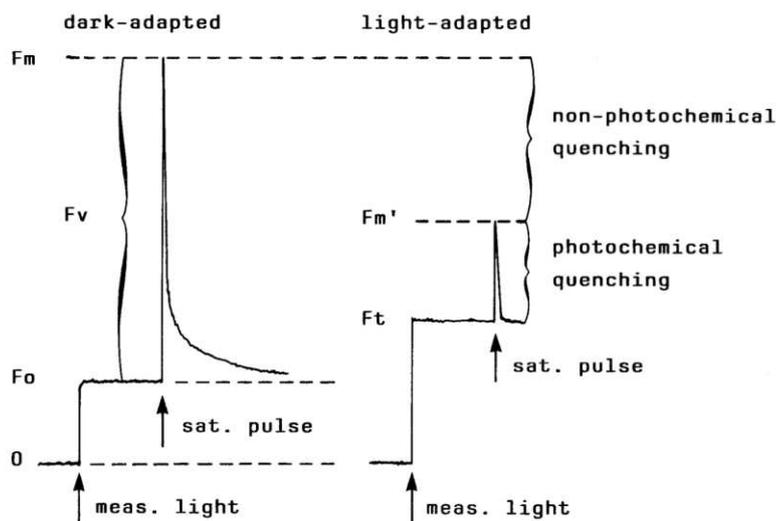


Figura 21: principio dell'analisi del pulse quenching analysis (PAM-CONTROL Universal Control Unit Hein Walz GmbH, 1999). F_m = fluorescenza massima delle cellule adattate al buio; F_0 = fluorescenza basale; F_v = differenza tra F_m ed F_0 ; F_m' = fluorescenza massima nell'esposizione alla luce attinica; measuring light= detection light,

di intensità debole; Impulso di saturazione= flash di luce somministrati alla fluorescenza massima, prima quando le cellule sono adattate al buio e poi durante il trattamento con la luce.

Quando le cellule sono adattate al buio e, quindi, il sistema NPQ è al minimo, può essere calcolata la fluorescenza massima (F_m).

La luce “attinica”, invece, è abbastanza intensa ed abbastanza duratura per poter indurre reazioni fotochimiche. La sua intensità può essere modulata per poter causare, in base alle analisi da effettuare: la saturazione, l’oversaturazione e la sottosaturazione dei fotosistemi. Inoltre, possono essere forniti flash di luce saturante ad intervalli regolari per misurare la massima fluorescenza alla luce (F'_m). Il processo prevede un declino graduale della resa di fluorescenza nel tempo, dovuta alla maggiore attività fotosintetica e della resa del sistema NPQ. Spegnendo la luce attinica, è possibile fornire flashes di saturazione sequenziali per seguire la fase di rilassamento dei processi di dissipazione attivati. In questo elaborato verranno considerati i valori di NPQ, ETR (electron transport rate) ed F_v/F_m .

3.3.6 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE DA *N. gaditana*

Da colture liquide è stato prelevato 1ml per ciascun ceppo. È stata effettuata una centrifugazione a 5000rpm per 10’.

Il pellet è stato lavato due volte con 1 mL di tampone B1 composto da 400 mM di cloruro di sodio, $MgCl_2 \times 6H_2O$ 2 mM e 20 mM di tricina/KOH, pH 7,8. In queste condizioni le proteine dovrebbero essere solubili, in particolar modo a pH pari a 7,8. Dopo il lavaggio, sono state aggiunte le microsfere di vetro (lavate con acido, 150-212 μm , Sigma-Aldrich) e 100 μL di miscela generale che conteneva tampone B1, benzamidina (3 mM), PMSF (1 mM) e latte in polvere.

Le cellule sono state rotte con il Beadbeater-16 (Glen Mills) a tre cicli di 20s a 3.500 rpm alternati a 5’ in ghiaccio per evitare che i campioni stessero troppo tempo a T ambiente. Sono stati aggiunti tre volte 60 μL di tampone campione contenente glicerolo 30%, SDS 9%, DTT 0,1 M e Tris al pH 6,8 125 mM. È stato eseguito un ciclo di rottura aggiuntivo di 5 s. Ogni campione è stato centrifugato a 11000 giri/min per 15 minuti dopo 20 minuti a temperatura ambiente ed il surnatante è stato conservato a -20 °C in una nuova provetta.

3.3.7 SDS-PAGE

Le proteine estratte vengono separate in base alle loro dimensioni utilizzando come metodo di separazione l' SDS-Page, in cui, la presenza del sodio-dodecil-solfato (SDS) nel gel, ha il ruolo di denaturare le proteine e di caricarle negativamente in modo da farle migrare tutte verso il polo positivo, discriminandole solo in base alle dimensioni e non in base a forma e carica.

La metodica prevede l'utilizzo di due differenti tipologie di gel: uno stacking gel al 4% di acrilammide che permette di allineare tutte le proteine per la successiva corsa ed un Running gel al 12% di acrilammide che permette la separazione vera e propria.

Il testo sembra essere ben scritto, ma posso suggerire alcune piccole correzioni per migliorarne la chiarezza e la coerenza:

La corsa viene eseguita in tampone di corsa SDS (3,02 g/L Tris, 14,4 g/L glicina, 1 g/L SDS) a una corrente di 15 mA fino a quando il fronte di corsa ha raggiunto il gel di corsa; successivamente, la corrente è stata aumentata a 25 mA. Per stimare il peso molecolare, su ciascun gel è stato caricato il Precision Plus Protein Standards di BioRad come marker. I gel sono stati successivamente risciacquati con una soluzione di metanolo al 10% e acido acetico al 7,5%, lavati con acqua e sottoposti a imaging.

3.3.8 WESTERN BLOT

Il trasferimento delle proteine è stato effettuato mediante western blotting, applicando un voltaggio costante di 100 V per 1h a 4°C in un tampone di trasferimento contenente 152 mM glicina, 20 mM Tris a pH 8,3 e 20% di metanolo. Successivamente, le proteine sulla membrana sono state colorate con Ponceau-S per confermare il successo del trasferimento proteico. Dopo un lavaggio con acqua deionizzata, la membrana è stata bloccata con latte al 10% in TBS (Tris Buffered Saline) 1x (0,4 M Tris-HCl pH 7,4, 3M NaCl) per una notte a 4°C. Il latte al 10% è stato successivamente rimosso con tre lavaggi utilizzando il TBS e l'anticorpo primario, precedentemente diluito in TTBS (tampone TBS 1x con 1% Tween®20), è stato aggiunto a temperatura ambiente per 2h.

Sono stati impiegati due diversi anticorpi primari: l'anticorpo alfa-LHCX1 e l'anticorpo alfa-VCP1. Dopo un lavaggio della membrana per 10', è stato applicato l'anticorpo secondario, diluito in TTBS (anticorpo coniugato con fosfatasi alcalina

anti-mouse 1:30000 e anticorpo coniugato con fosfatasi alcalina anti-rabbit 1:10000, rispettivamente), per 1h a temperatura ambiente. Successivamente, la membrana è stata nuovamente lavata tre volte per 10 minuti con TTBS ed incubata con una soluzione di colorazione, composta da una soluzione di sviluppo (Tris-HCl pH 9,5 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM), BCIP 0,165 mg/mL e NBT 0,675 mg/mL. Appena le bande rilevate hanno raggiunto un'intensità sufficiente, la membrana è stata immersa in acqua deionizzata.

4. RISULTATI

4.1 Isolamento di mutanti K.O. di *Nannochloropsis gaditana* per il gene *gox*

L'obiettivo della prima parte del progetto è quello di generare ceppi mutanti KO di *N.gaditana* per il gene *gox* e studiare se essi mostrano un fenotipo fotorespiratorio. Il primo passo prevede la progettazione di un costrutto per un'efficace delezione del gene d'interesse, attraverso l'introduzione di un maker di selezione (resistenza alla zeocina) che interrompa la sequenza codificante del gene e l'isolamento di ceppi con il genotipo atteso. Questa procedura si basa sul sistema di riparazione omologa endogena mediato dalla tecnologia CRISPR-Cpf1 (Metodi 3.1.7) (Figura 22.A). La mutazione è stata confermata mediante RT-PCR per ciascuna delle tre linee KO isolate in questo lavoro (Figura 22.B).

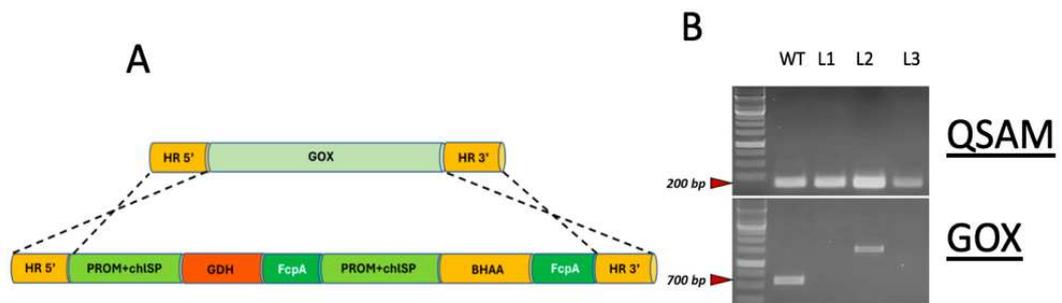


Figura 22: A. Rappresentazione schematica del processo di homology-repair CRISPR-Cpf1-mediato per la generazione di linee *gox* KO. B. RT-PCR che conferma la mutazione. In tutti i ceppi analizzati è presente il gene housekeeping (*QSAM*, 200bp), mentre per il gene *gox* (700bp) nessuno dei ceppi mutanti presenta la banda corrispondente, mentre il ceppo WT si.

4.1.1 SETUP PER L'IDENTIFICAZIONE AFFIDABILE DI UN FENOTIPO FOTORESPIRATORIO

Come prima cosa ho eseguito dei test preliminari per individuare il setup sperimentale ottimale per l'identificazione di un fenotipo fotorespiratorio in *N. gaditana*. Quindi, le analisi sono state condotte su un ceppo mutante di *N. oceanica*, KO per il gene che codifica per l'enzima **anidrasi carbonica (CA)**. Questo enzima è implicato nel meccanismo di concentrazione del carbonio (CCM) che permette a *N. oceanica* di sopperire alla scarsa concentrazione di carbonio inorganico presente in un ambiente acquatico. Il ruolo di quest'enzima è quello di convertire gli ioni HCO_3^- , provenienti dall'esterno della cellula ed indirizzati al cloroplasto, in forma di CO_2 .

Di conseguenza, è stata valutata la crescita dei mutanti KO per CA di *N. oceanica*, facendo un confronto con il ceppo WT. Sono state predisposte 3 condizioni di crescita:

- 1% CO₂: questa condizione è caratterizzata da una concentrazione di anidride carbonica 25 volte superiore a quella atmosferica. In questa condizione, il carbonio è in eccesso e le CA sono inattive perché non è necessaria la loro attività di concentrazione;
- CO₂ atmosferica (0,04%): in questa condizione la concentrazione di anidride carbonica è quella atmosferica; Di conseguenza la CO₂ è limitante per la crescita e le CA sono attive con il compito di concentrare il carbonio. quindi, un fenotipo simile a quello fotorespiratorio è caratterizzato da crescita del ceppo WT, mentre i mutanti dovrebbero mostrare crescita ridotta/nulla perché le CA non hanno fonte di carbonio dalla quale attingere;
- CO₂ atmosferica + 10mM NaHCO₃: questa condizione di crescita viene utilizzata come controllo positivo ed in questo caso nel terreno viene aggiunta un'ulteriore fonte di carbonio, in forma di bicarbonato i mutanti KO per CA non sono in grado di trasformare lo ione HCO₃⁻ in CO₂, di conseguenza si dovrebbe osservare una crescita ridotta/assente dei mutanti KO rispetto al ceppo WT.

Sia la condizione di crescita in liquido, sia quella in solido sono state condotte a 22°C con luce di intensità 100 μmol photons m⁻² s⁻¹

4.1.2 VALUTAZIONE DELLA CRESCITA DI *N. oceanica* IN TERRENO SOLIDO

Il ceppo WT di *Nannochloropsis oceanica* e due ceppi K.O. per il gene che codifica per l'ANIDRASI CARBONICA: mutante #5 e mutante #6 indipendenti tra di loro, sono stati fatti crescere in terreno solido F/2 (Metodi 3.2.1). Sono state preparate 3 condizioni di crescita diverse, come indicato precedentemente. Sono state allestite 9 piastre totali: 3 repliche per ogni condizione. La temperatura è stata settata a 22°C e l'intensità luminosa era di 100 μmol photons m⁻² s⁻¹.

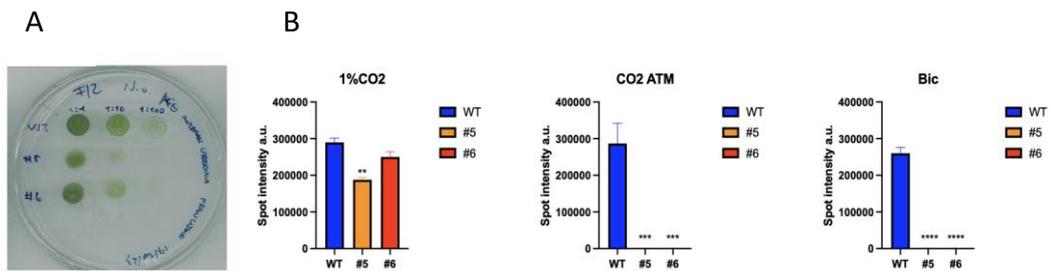


Figura 23: A. Esempio di piastra utilizzata per lo spot test; i mutanti #5 ed #6n e il ceppo WT sono visibili con le loro diluizioni. Questa è una piastra tenuta all'1% di CO₂. Per ogni condizione sono state preparate tre repliche e 40 microlitri di soluzione sono stati piastrati per ogni ceppo a tre diversi valori di diluizione (1:1, 1:10, 1:100). B. I grafici mostrano l'analisi densitometrica degli spot. L'analisi dei dati è stata eseguita dopo 12 giorni e alla diluizione 1:1. Sono osservabili tre condizioni: 1% CO₂, CO₂ atmosferica e CO₂ atmosferica+10mM NaHCO₃. Gli asterischi indicano differenze significative tra ceppi mutanti e WT (t-Test, *valore p<0,05, ** valore p<0,01).

Lo scopo dell'esperimento è quello di settare le condizioni sperimentali per evidenziare un fenotipo fotorespiratorio nei mutanti di *N. gaditana*. In questo modo, se le differenze di crescita attese nelle 3 condizioni dovessero essere rispettate, allora il setup sarebbe corretto anche per evidenziare un fenotipo fotorespiratorio nei mutanti KO di *N. gaditana*.

Dai risultati ottenuti (Figura 23.B), si osserva che in condizioni di crescita in cui viene fornita una concentrazione 10mM di NaHCO₃ ed in presenza di CO₂ atmosferica, si osserva un fenotipo di crescita assente rispetto a quello del WT, mentre in condizioni di 1% di CO₂ viene osservata crescita e nel caso del mutante #6 essa è paragonabile a quella del WT. Per confermare che i fenotipi osservati non siano legati alle condizioni di crescita, entrambe le linee WT e CA KO sono state coltivate in terreno liquido e il loro fenotipo di crescita è stato studiato.

4.1.3 VALUTAZIONE DELLA CRESCITA DI *N. oceanica* IN TERRENO LIQUIDO

Le colture liquide (Metodi 3.1.2) sono state condotte in 20 ml di terreno F/2 in beute da 100 ml, con un'intensità luminosa di 100 μmol di fotoni m⁻² s⁻¹ in una camera di crescita a una T controllata di 22 °C. La crescita delle linee mutanti #5 e #6 è stata confrontata con quella del ceppo WT, nelle stesse condizioni ambientali: 1% CO₂, CO₂ atmosferica e CO₂ atmosferica+NaHCO₃ 10mM.

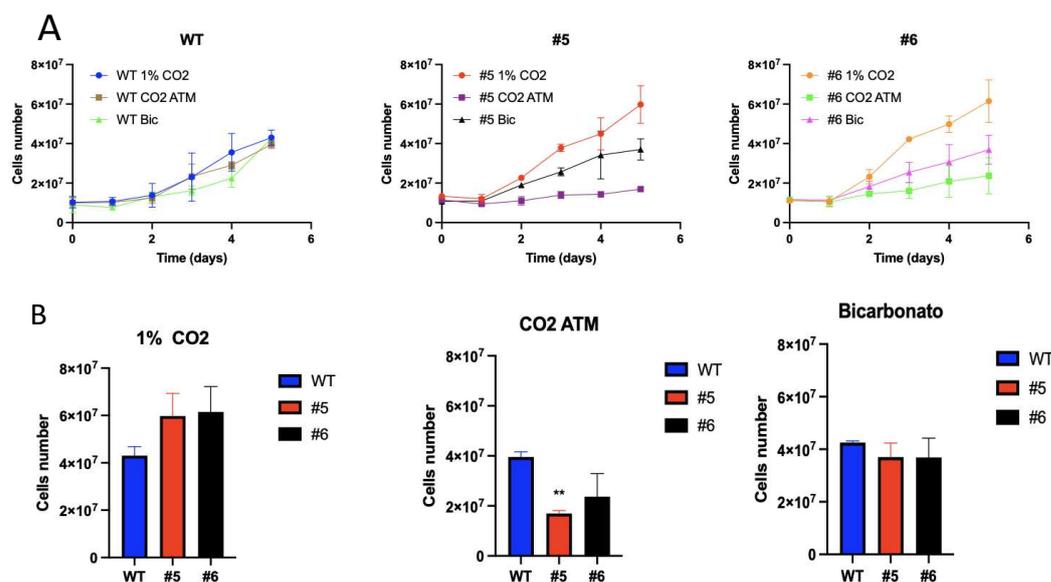


Figura 24: A. Grafici che mostrano il profilo di crescita di tutti i ceppi (WT, L1, L2, L3) utilizzati in questo lavoro in coltura liquida dopo l'esposizione alle tre diverse condizioni ambientali, descritte nel testo. B. Analisi statistica effettuata con un t-test a due code. È stata eseguita un'analisi per ogni condizione di crescita, confrontando il valore del numero di cellule rilevate nell'ultimo giorno (5) dell'analisi WT con quello di uno dei tre mutanti (t-Test, *p-valore<0,05, ** p-valore<0,01, *** p-valore<0,001).

In questo caso è stata valutata la crescita, tramite conta cellulare (Metodi 3.3.1), dei mutanti KO per CA (#5 ed #6) paragonata con quella del WT e dai risultati si può osservare che in coltura liquida (Figura 24.B) i mutanti crescono con un valore simile a quello del ceppo WT.

Inoltre, si può notare (Figura 24.B) come anche in presenza di 1% di CO₂ i mutanti crescono come il WT, mentre in condizioni di CO₂ atmosferica la crescita del mutante #5 è ridotta, come atteso, mentre per il mutante #6 la crescita è paragonabile a quella del ceppo WT.

Dai dati ottenuti si può notare come il setup utilizzato aiuti ad evidenziare le differenze tra mutanti KO e ceppo WT. Di conseguenza possono essere utilizzate anche per la caratterizzazione dei mutanti KO di *N. gaditana*.

4.2 CARATTERIZZAZIONE DEI MUTANTI KO IN *N. gaditana*

Dopo aver verificato che il setup utilizzato per i mutanti di *N. oceanica* fosse corretto, si è passati alla caratterizzazione dei mutanti KO per *gox* in *N. gaditana*. Il processo di caratterizzazione è stato portato avanti su 3 ceppi mutanti indipendenti: L1, L2, L3 seguendo 4 approcci diversi:

8. Valutazione della crescita in terreno solido
9. Valutazione della crescita in terreno liquido
10. Caratterizzazione della crescita in condizioni tipiche della coltivazione industriale
11. Valutazione della funzionalità fotosintetica

4.2.1 VALUTAZIONE DELLA CRESCITA IN TERRENO SOLIDO

Il ceppo WT di *Nannochloropsis gaditana* e tre ceppi K.O. per il gene *gox* indipendenti sono stati fatti crescere in terreno solido F/2 (Metodi 3.1.2). Sono state preparate 3 condizioni di crescita diverse, identiche a quelle valutate in *N. oceanica*: 1% di CO₂ (in questo caso si parla di una condizione in cui la concentrazione di CO₂ è più alta rispetto alle condizioni ambientali), CO₂ 0,04% (condizione di CO₂ a livello atmosferico) e condizione di terreno solido F/2 mantenuto a CO₂ 0,04%, con aggiunta di NaHCO₃ 10mM nel terreno (viene fornita una fonte secondaria di carbonio che permette di raggiungere i livelli di concentrazione pari alla condizione di 1% CO₂). Sono state allestite 9 piastre totali: 3 repliche per ogni condizione. La temperatura è stata settata a 22°C e l'intensità luminosa era di 100 μmol photons m⁻² s⁻¹.

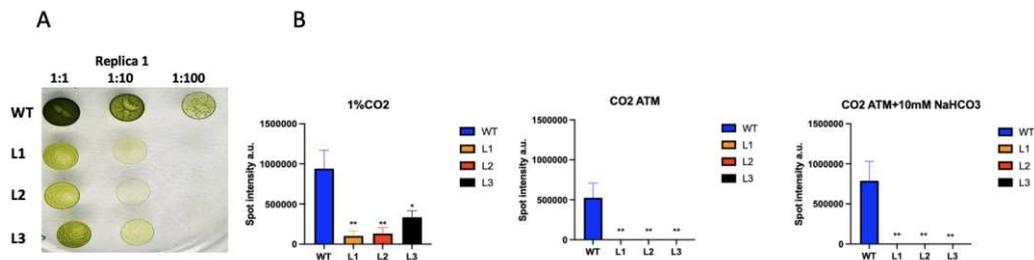


Figura 25: A. Esempio di piastra utilizzata per lo spot test; i mutanti L1, L2, L3 e il ceppo WT sono visibili con le loro diluizioni. Questa è una piastra tenuta all'1% di CO₂. Per ogni condizione sono state preparate tre repliche e 40 microlitri di soluzione sono stati piastrati per ogni ceppo a tre diversi valori di diluizione (1:1, 1:10, 1:100). B. I grafici mostrano l'analisi densitometrica degli spot. L'analisi dei dati è stata eseguita dopo 12 giorni e alla diluizione 1:1. Sono osservabili tre condizioni: 1% CO₂, CO₂ atmosferica e CO₂ atmosferica+10mM NaHCO₃. Gli asterischi indicano differenze significative tra ceppi mutanti e WT (t-Test, *valore p<0,05, ** valore p<0,01).

Lo scopo dell'esperimento è quello di valutare la presenza di un fenotipo fotorespiratorio nei mutanti, valutandone la crescita in terreno solido rispetto all'organismo WT. Il fenotipo fotorespiratorio è caratterizzato da difetti di crescita o assenza di crescita alla concentrazione di CO₂ atmosferica, che possono essere recuperate ad alta concentrazione di CO₂ o se si utilizza una fonte di carbonio

supplementare (ad esempio, bicarbonato). Ciò dipende dal fatto che, all'1% di CO₂ o in presenza di NaHCO₃, l'attività ossigenasica della RUBISCO soppressa con una conseguente diminuzione della produzione di 2-FOSFOGLIOLATO (2-PG) e in queste condizioni non dovrebbe verificarsi la fotorespirazione.

Dai risultati ottenuti (Figura 25.B), risulta che le linee KO per *gox* di *Nannochloropsis gaditana* non sono cresciute in condizioni di crescita con concentrazione di CO₂ ambientale e all'1% di CO₂ hanno mostrato una significativa riduzione della crescita rispetto al WT (Figura 25.B). Sorprendentemente, i mutanti non sono cresciuti anche in presenza di bicarbonato esattamente come osservato per i mutanti KO per CA di *N. oceanica*. Per confermare che i fenotipi osservati non siano legati alle condizioni di crescita, entrambe le linee WT e *gox* KO sono state coltivate in terreno liquido e il loro fenotipo di crescita è stato studiato.

4.2.2 VALUTAZIONE DELLA CRESCITA IN TERRENO LIQUIDO

Le colture in terreno liquido (Metodi 3.1.2) sono state condotte in 20 ml di terreno F/2 in beute da 100 ml, con un'intensità luminosa di 100 μmol di fotoni m⁻² s⁻¹ in una camera di crescita a una T controllata di 22 °C. La crescita delle linee mutanti L1, L2, L3 è stata confrontata con quella del ceppo WT, nelle stesse condizioni ambientali: 1% CO₂, CO₂ atmosferica e CO₂ atmosferica+NaHCO₃ 10mM (Figura 26.A).

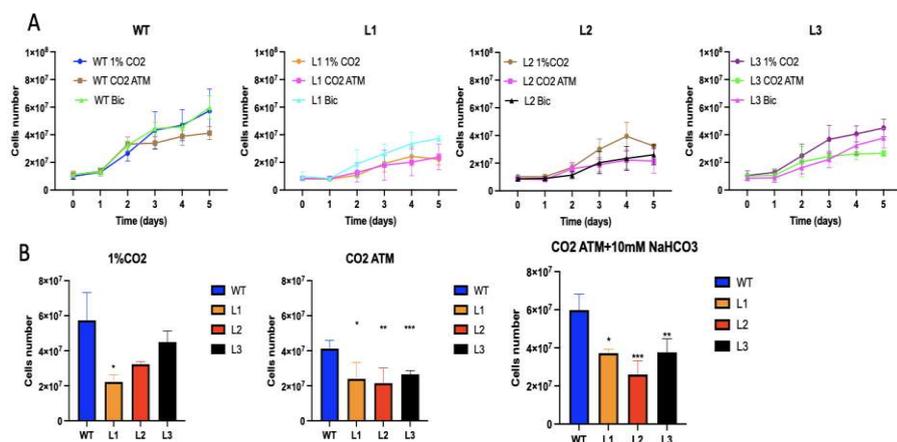


Figura 26: A. Grafici che mostrano il profilo di crescita di tutti i ceppi (WT, L1, L2, L3) utilizzati in questo lavoro in coltura liquida dopo l'esposizione alle tre diverse condizioni ambientali, descritte nel testo. B. Analisi statistica effettuata con un t-test a due code. È stata eseguita un'analisi per ogni condizione di crescita, confrontando il valore del numero di cellule rilevate nell'ultimo giorno (5) dell'analisi WT con quello di uno dei tre mutanti (t-Test, *p-valore<0,05, ** p-valore<0,01, *** p-valore<0,001).

La valutazione della crescita è stata fatta tramite conta cellulare (Metodi 3.3.1). Anche in questo caso, il WT mostra una crescita maggiore in condizioni di maggiore concentrazione di CO₂ e in presenza di bicarbonato. Al contrario, mostra un fenotipo di crescita inferiore in condizioni di CO₂ atmosferica. Lo scopo di questa analisi è ancora una volta quello di valutare se le tre linee *gox* KO mostrano un fenotipo fotorespiratorio. I dati della Figura 26.B, nell'ultimo giorno della curva di crescita, mostrano che i mutanti crescono meno del WT a CO₂ ambientale. All'1% di CO₂, due su tre recuperano il fenotipo di crescita, ma sorprendentemente questo non accade a CO₂ ambiente con l'aggiunta di bicarbonato.

I risultati suggeriscono che il bicarbonato ha un'influenza sulla crescita. In presenza di bicarbonato ci si aspetta una crescita simile a quella del ceppo WT. Si osserva, invece, una crescita ridotta dei mutanti e ciò potrebbe indicare la possibile presenza di ulteriori mutazioni che influenzano la fotosintesi, ma anche una possibile influenza della variazione di pH dovuta al bicarbonato.

4.2.3 CARATTERIZZAZIONE DELLA CRESCITA IN CONDIZIONI TIPICHE DELLA COLTIVAZIONE INDUSTRIALE

Le linee di *Nannochloropsis gaditana* KO per *gox* isolate in questo lavoro sono state coltivate in coltura semicontinua (Metodi 3.1.2), a partire da alte concentrazioni di biomassa (> 1 g/L) in bottiglie di Drechsel di 5 cm di diametro (Figura 27.A), illuminate da un lato (400 μmol fotoni m⁻² s⁻¹), con un volume di lavoro di 250 mL e gorgogliate con aria arricchita con il 5% di CO₂ (v/v), a una portata totale di 1 L/h e la loro crescita è stata confrontata con quella della WT. Tutti i nutrienti e la CO₂ sono stati forniti in eccesso. Questi sistemi in scala di laboratorio sono stati scelti per simulare le condizioni di coltivazione dei fotobioreattori (PBRs) industriali, come la geometria, l'esposizione alla luce e per rendere la coltura limitata solo dalla disponibilità di luce. Le colture sono state condotte in modalità semi-continua per mantenere le cellule in crescita attiva in una coltura ad alta densità (250 milioni di cellule/ml). La modalità di coltura in semicontinuo prevede l'aggiunta periodica (ogni due giorni) di nuovi nutrienti e la rimozione di una parte del contenuto del sistema (Figura 27.B).

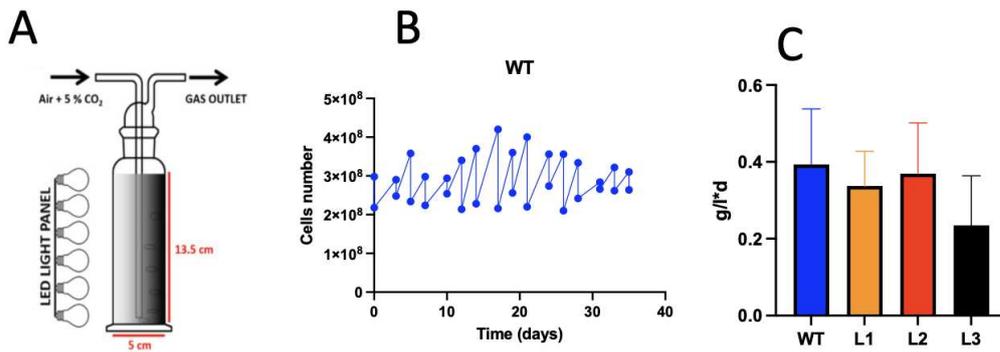


Figura 27: A mostra il tipo di bottiglia utilizzata per l'analisi. B. Un esempio riguardante il ceppo WT per illustrare la procedura di diluizione nella coltura semicontinua. C. Viene presentato un confronto tra i mutanti e il ceppo WT in termini di produzione di biomassa, misurata come peso secco. L'asterisco indica l'analisi eseguita con un t-test a due code per ciascun mutante rispetto al rispettivo WT nella data condizione di crescita. Un singolo * indica un valore $p < 0,05$, mentre un doppio * indica un valore $p < 0,01$.

La Figura 27.C mostra la produttività della biomassa per ciascun ceppo in g/l*d, valutata su un arco di tempo di 35 giorni. La valutazione del peso secco (Metodi 3.3.2) è stata fatta utilizzando dei filtri da 0,45 μ m sui quali sono stati posti 5ml di coltura per ogni ceppo, prendendo un campione prima ed uno dopo la diluizione. Lo scopo di questo test è capire se *gox* KO ha un effetto sulla produttività della biomassa in condizioni che simulano la crescita in PBR. I risultati indicano che non c'è differenza nella produzione di biomassa tra i mutanti e il WT.

4.2.4 ANALISI DEI PIGMENTI

Per investigare se l'assenza del gene *gox* avesse un effetto sulle reazioni alla luce della fotosintesi, ho valutato il contenuto di pigmenti (clorofille e carotenoidi) dei mutanti rispetto al WT.

In particolar modo, dalle colture in semicontinuo è stato prelevato 1ml di coltura da ogni ceppo (WT, L1, L2, L3). Ho misurato lo spettro di assorbimento degli estratti (Metodi 3.3.4) a lunghezze d'onda da 400nm a 800nm, come indicato in Figura 28.

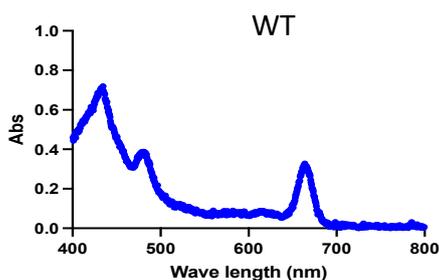


Figura 28: spettro d'assorbimento dei pigmenti del ceppo WT. Lo spettro va da una lunghezza d'onda di 800nm a 400nm.

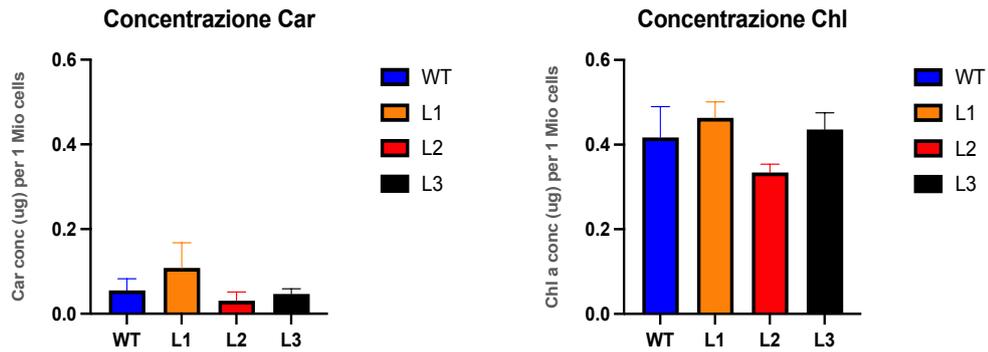


Figura 29: analisi sul contenuto di pigmenti dei 3 mutanti rispetto al ceppo WT. È stata effettuata un'analisi statistica tramite un t-test a due code (un * indica $p\text{-value} < 0,05$).

Dai risultati mostrati in Figura 29 si può osservare come, per quanto riguarda sia la concentrazione di clorofille, sia per quella di carotenoidi, non vi è differenza significativa nel contenuto tra mutanti KO e WT, ma vi è una certa variabilità. Di conseguenza, per valutare se questa variabilità influenzasse le reazioni alla luce della fotosintesi, ho valutato tramite un'analisi quantitativa il contenuto di proteine dei complessi LHCX1 e VCP1.

4.2.5 ANALISI QUANTITATIVA DEI COMPLESSI VCP1 ED LHCX1

In questo caso l'analisi è stata condotta tramite WB (Metodi 3.3.8) andando a prelevare 2ml di coltura per ogni ceppo, dalle coltura in PBR su scala di laboratorio. In seguito, è stata fatta l'estrazione proteica (Metodi 3.3.6). Il materiale caricato per ogni ceppo deriva dallo stesso contenuto di molecole di clorofilla.

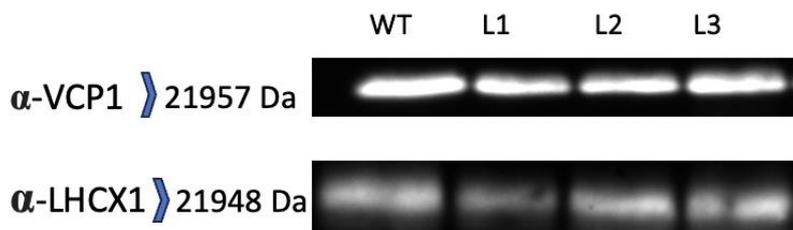


Figura 30: analisi al WB (Metodi 3.3.8) dei complessi VCP1 ed LHCX1.

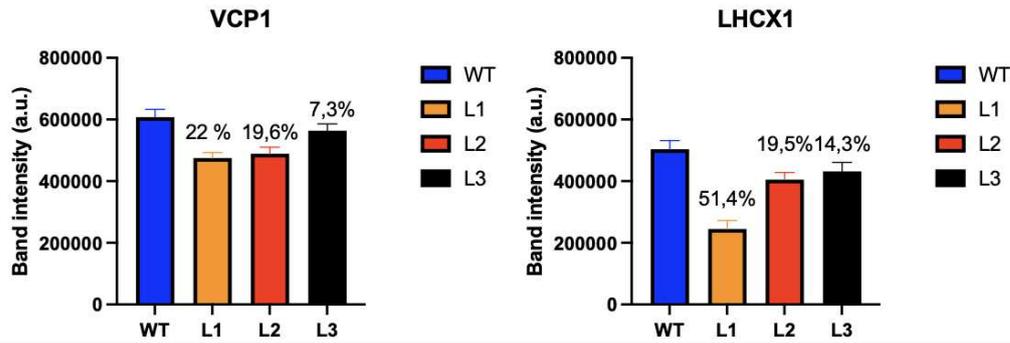


Figura 31: analisi statistica sul contenuto dei complessi VCP1 ed LHCX1. I dati in percentuale indicano quanto quel dato complesso sia minore in uno dei mutanti, in termini quantitativi, rispetto al contenuto del WT.

Dai risultati ottenuti, mostrati in Figura 31, si può notare che, vi è una differenza nel contenuto sia di VCP1, sia di LHCX1, nei mutanti rispetto al WT. Dato che è stata effettuata solo una misurazione, in futuro andranno effettuate ulteriori misurazioni per poter ottenere un dato statisticamente significativo. Successivamente, dopo aver valutato il contenuto di pigmenti e di proteine dei complessi VCP1 ed LHCX1, ed aver osservato che sono presenti differenze nel contenuto di alcuni complessi fotosintetici, è stata effettuata una valutazione sulla funzionalità fotosintetica, tramite misurazioni ottenute con l'analisi della fluorescenza della clorofilla.

4.2.6 VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ FOTOSINTETICA

Ho valutato le prestazioni fotosintetiche dei mutanti L2, L3 e del ceppo WT (i dati per il ceppo L1 sono attualmente in fase di raccolta poiché la coltura ha subito contaminazione e non si è riusciti a farla ripartire in tempo) utilizzando lo strumento DUAL-PAM-100 (Waltz) (Metodi 3.3.5). Ho utilizzato un protocollo light curve che prevedeva l'aumento dell'intensità luminosa da $0 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fino a $2008 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per poi tornare al buio. Sono stati valutati i seguenti parametri:

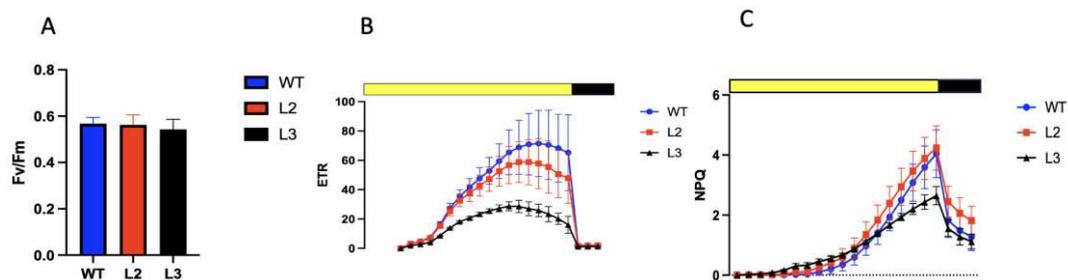


Figura 32: A. Risultati dell'analisi dei parametri Fv/Fm. Le analisi statistiche eseguite con un t-test a due code sui dati Fv/Fm non mostrano differenze nei valori Fv/Fm: gli asterischi indicano differenze significative tra i ceppi mutanti e WT (t-Test, *p-value<0.05, ** p-value<0.01). B. Grafico per il parametro ETR. C. Grafico del parametro NPQ. Nei grafici relativi a NPQ ed ETR, la barra gialla indica la fase in cui il campione è stato illuminato, mentre la barra nera indica la fase di buio.

La Figura 32.A mostra i valori di efficienza fotosintetica massima (Fv/Fm): parametro che indica l'efficienza massima della fotosintesi. Si calcola dal rapporto tra la resa massima di fluorescenza (Fm) e la fluorescenza minima (Fo) quando il fotosistema II è completamente aperto e quando è completamente chiuso.

Il risultato dell'analisi di questo parametro sui due mutanti rispetto al ceppo WT indica che non c'è alcuna differenza rispetto al WT, suggerendo che tutti i ceppi di questo lavoro hanno un metabolismo fotosintetico pienamente funzionale.

In Figura 32.B sono presenti i dati riguardanti la velocità di trasporto degli elettroni (ETR) (Figura 32.B): parametro che valuta la velocità di trasporto degli elettroni attraverso la catena di trasporto degli elettroni fotosintetica.

Nel ceppo WT, l'ETR aumenta all'aumentare dell'intensità luminosa e diminuisce al buio. Anche i mutanti L2 e L3 presentano lo stesso andamento, ma il mutante L2 ha valori simili di ETR mentre il mutante L3 mostra un ETR inferiore rispetto agli altri due ceppi ad intensità di luce più elevate.

I valori di Non-photochemical quenching (NPQ) sono riportati in Figura 32.C. L'NPQ è un parametro che permette di valutare l'efficienza della fotoprotezione. In quest'ultimo processo, quando la luce è in saturazione, la radiazione assorbita in eccesso viene dissipata come calore. Si tratta di un sistema di protezione che gli organismi fotosintetici utilizzano quando c'è un eccesso di luce che potrebbe danneggiare l'organismo.

Nel ceppo WT, l'NPQ si attiva con l'intensità della luce e si disattiva al buio (Figura 32.C) Lo stesso andamento è presente anche nelle linee mutanti. Il mutante L2 segue un andamento simile al WT, con valori di NPQ comparabili. Il mutante L3, invece, non è in grado di attivare l'NPQ con la stessa intensità del WT. Ciò

suggerisce la presenza di possibili mutazioni aggiuntive, casuali nei geni correlati alla fotosintesi che comportano attività diverse nel mutante L3.

4.2.7 CONFERMA MANTENIMENTO MUTAZIONE

Al fine di valutare la stabilità della mutazione indotta, è stata effettuata nuovamente un'estrazione dell'RNA (Metodi 3.1.6) dal ceppo WT e dai tre mutanti L1, L2, L3 e, lo stesso RNA è stato sottoposto a RT-PCR. L'analisi è stata effettuata sempre andando a rilevare il cDNA relativo al trascritto del gene *gox*, confrontando il risultato ottenuto tramite un controllo positivo: rilevazione del cDNA relativo al gene per QSAM per valutare la presenza di template cDNA e non di DNA genomico. I risultati sono indicati in figura 33 dopo analisi su gel di agarosio (Metodi 3.1.3).

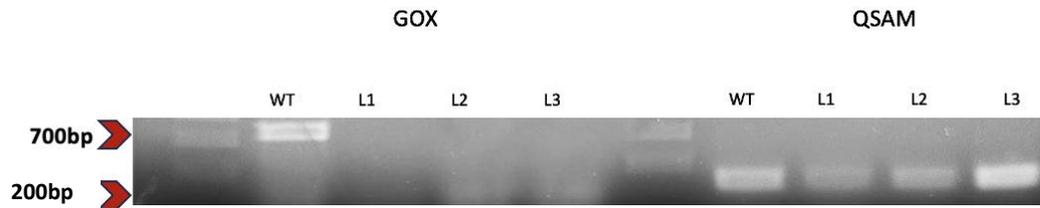


Figura 33: RT-PCR che conferma la mutazione. In tutti i ceppi analizzati è presente il gene housekeeping (QSAM , 200bp), mentre per il gene *gox* (700bp) nessuno dei ceppi mutanti presenta la banda corrispondente, mentre il ceppo WT sì.

Da come si può notare in figura 33, il test è risultato negativo per tutti e tre i mutanti, confermando il mantenimento della mutazione anche a distanza di 9 mesi dall'inizio della caratterizzazione.

4.3 VALIDAZIONE BYPASS FOTORESPIRATORIO

Nella seconda parte del progetto di tesi, l'obiettivo è validare la funzionalità di un bypass sintetico in grado di metabolizzare in modo alternativo il 2PG, riducendo la perdita energetica associata al processo fotorespiratorio. Il ciclo del beta-idrossiaspartato è il pathway identificato per questo scopo. Per l'inserimento dei geni necessari, sono stati generati dei costrutti tramite la metodica di OE-PCR (Metodi 3.1.2) (Figura 34).

4.3.1 GENERAZIONE DEL COSTRUTTO DI BYPASS

La prima fase per ottenere i componenti necessari al bypass richiede la creazione dei singoli frammenti destinati a costituire la cassetta d'espressione sia per GDH che per ASGAT.

Questi componenti sono 3:

Il promotore di *lhcx1*, seguito da un peptide segnale:

- Il promotore utilizzato appartiene al complesso LHCX1, una delle proteine antenna tra le più abbondanti in *Nannochloropsis* e l'attuatore principale del processo di fotoprotezione (Buck et al., 2019). Inoltre, viene integrata una sequenza codificante un peptide necessario per indirizzare l'enzima verso il cloroplasto, poiché l'intenzione è quella di eseguire l'intero processo di bypass in quest'organello (1087bp).
- La sequenza codificante per GDH/ASGAT (GDH= 3306bp; ASGAT=1218bp).
- Il terminatore *fcpA* (237bp) .

L'amplificazione dei singoli frammenti è avvenuta come indicato in Metodi 3.1.1. Dai risultati mostrati (Figura 35), si è riusciti ad ottenere i singoli frammenti sia per la cassetta d'espressione per GDH (Figura 35.A), sia per ASGAT (Figura 35.B).

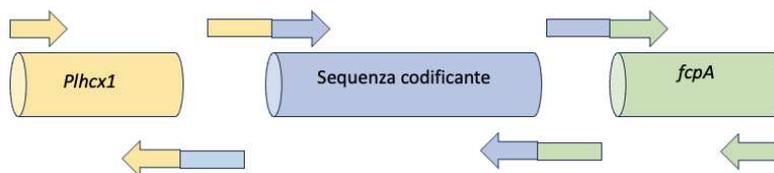


Figura 34:Le sequenze del promotore, del gene e del terminatore vengono amplificate tramite PCR, con l'aggiunta di sequenze di sovrapposizione tra i tre frammenti grazie all'utilizzo di primer specifici. Successivamente, l'OE-PCR viene impiegata per unire in un'unica entità i tre componenti, generando così la cassetta di espressione completa

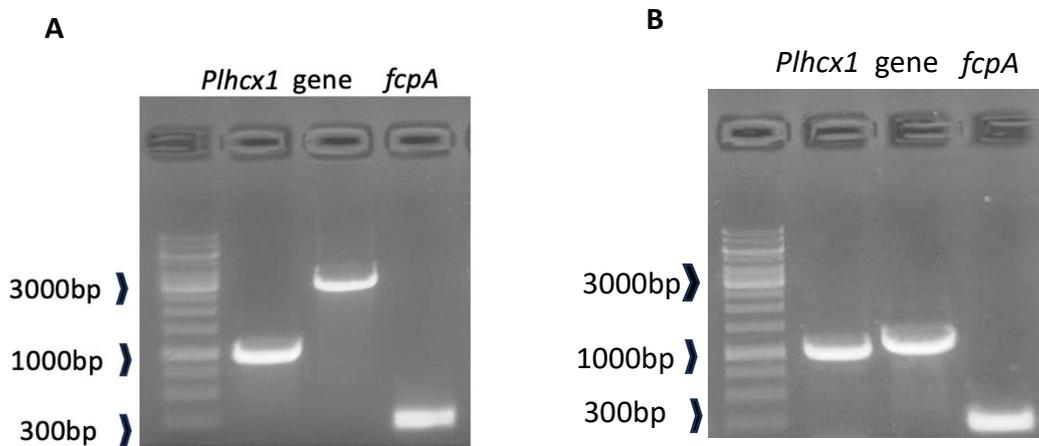


Figura 35: L'analisi è stata condotta mediante elettroforesi su gel di agarosio. Nella figura sono presentati i risultati delle amplificazioni del DNA ottenute tramite PCR per i frammenti costituenti le cassette di espressione dei geni GDH (visualizzati a sinistra) e ASGAT (visualizzati a destra). Per l'amplificazione, sono stati impiegati specifici primer dotati di sequenze aggiuntive che consentono la generazione completa delle cassette mediante OE-PCR. Le lunghezze previste degli ampliconi sono: Plhcx 1100bp, terminatore fcpA 230bp, GDH 3300 bp e ASGAT 1218bp.

Il processo di OE-PCR non ha ancora dato risultati apprezzabili; quindi, si continuerà a portare avanti il lavoro in futuro.

5. DISCUSSIONE

Questo progetto di tesi è incentrato sullo studio della fotorespirazione nelle microalghe del genere *Nannochloropsis*.

Questo genere di microalghe è caratterizzato da crescita rapida e dalla possibilità di produrre lipidi, tra cui triacilgliceroli (TAGs) ed acidi grassi a catena lunga come omega-3 (Poliner et al., 2018).

Durante la coltivazione in fotobioreattori per la produzione di biomassa su scala industriale, *Nannochloropsis* presenta un limite legato all'efficienza di conversione della luce in biomassa tramite il processo di fotosintesi. Per ottimizzare questo aspetto, ci si è concentrati su metodiche di ingegneria genetica. Tra queste spicca il sistema di ingegnerizzazione CRISPR-Cpf1 che è risultato utile alla trasformazione di microalghe in generale (Naduthodi et al., 2019) ma, nello specifico anche di microalghe come *Chlamydomonas reinhardtii* e *Nannochloropsis oceanica*

In questo progetto ci si è focalizzati sullo studio della fotorespirazione, in quanto processo utile agli organismi fotosintetici, in natura, ma che potrebbe risultare limitante per l'accumulo di biomassa. Ciò è dovuto al fatto che durante il processo fotorespiratorio viene emessa CO₂, precedentemente fissata durante il processo di fotosintesi con annesse spese energetiche.

Inoltre, la fotorespirazione non è stata caratterizzata in microalghe del genere *Nannochloropsis* e le informazioni attualmente a disposizione sul suo funzionamento riguardano maggiormente piante terrestri come la pianta modello *Arabidopsis thaliana*. Quindi, un primo obiettivo del lavoro all'interno di questa tesi è stato quello di caratterizzare questo processo tramite l'utilizzo di mutanti KO per un importante gene del processo fotorespiratorio e comprendere se i geni conservino le stesse funzionalità degli omologhi in *Arabidopsis thaliana*. Ciò permetterebbe di capire se effettivamente questo processo ha la stesse funzionalità che ha nelle piante terrestri e se possa risultare limitante per la produzione di biomassa a livello industriale.

In questo lavoro di tesi ho anche valutato la possibilità di implementare nei mutanti KO per il gene *gox* un bypass fotorespiratorio identificato nel ciclo del beta-idrossi-aspartato (BHAC) (Schada von Borzyskowski et al., 2019), che permetterebbe di eliminare il 2PG, senza emissione di CO₂ e facendo avvenire tutto il processo all'interno del cloroplasto con un ridotto dispendio di risorse metaboliche.

Al fine di implementare questo pathway, si è considerata la difficoltà nel trasformare *N. gaditana*, di conseguenza si è deciso di inserire solo due geni che codificano per GDH: enzima che permette di avere gliossilato (primo substrato del pathway BHAC) a partire da glicolato ed ASGAT: enzima che permette di fare reagire gliossilato con aspartato per ottenere glicina ed ossalacetato, utili alla produzione di biomassa. Questi due enzimi assieme sono sufficienti ad eliminare il 2PG. Per la loro implementazione si è deciso di creare un costrutto unico contenente promotore, sequenza codificante e terminatore, tramite OE-PCR. Non vengono sfruttate regioni di omologia, di conseguenza, l'inserimento nel genoma sarà casuale.

5.1 ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DEI MUTANTI DI *N. gaditana* KO PER IL GENE *gox*

Nella prima parte del mio elaborato di tesi, ho completato l'isolamento di ceppi di *Nannochloropsis gaditana* KO per il gene *gox* e la loro caratterizzazione preliminare. Il setup per la caratterizzazione è basato su uno screening di mutanti KO di *Nannochloropsis oceanica* per l'enzima CA implicato nel meccanismo CCM (Crabon Concentration Mechanisms). Successivamente, ho iniziato a indagare se i mutanti KO di *N. gaditana* presentassero un fenotipo fotorespiratorio, utilizzando colture solide e liquide. In nessuno dei due casi si osserva un fenotipo fotorespiratorio completo, ma, mentre in coltura solida non si nota crescita in condizioni di CO₂ atmosferica, in coltura liquida la si osserva. Infatti, in entrambe le condizioni, in presenza di bicarbonato, la crescita dei mutanti non è paragonabile a quella del WT e ciò potrebbe essere dovuto alla variazione di pH che potrebbe portare ad influenzare negativamente la crescita. La discrepanza dei comportamenti potrebbe essere dovuta al loro genotipo, data la possibile presenza di mutazioni casuali aggiuntive che porterebbero a comportamenti diversi dei mutanti, rispetto a quanto atteso. In alternativa, potrebbe essere attribuita al fatto che *Nannochloropsis gaditana* è un endosimbionte secondario, suggerendo una potenziale compensazione del fenotipo: nel genoma di *N. gaditana* potrebbero essere presenti dei geni che codifichino per enzimi con funzioni simili e che, quindi, sopperiscano in parte alla funzione di *gox*. Sono state condotte analisi per quanto riguarda il contenuto di complessi fotosintetici (VCP1 ed LHCX1), i quali hanno evidenziato un contenuto ridotto di questi complessi nei mutanti KO, rispetto al ceppo WT. Di conseguenza, è stato attuato uno studio sulla

funzionalità fotosintetica dei mutanti rispetto al ceppo WT. Questo studio ha evidenziato una funzionalità diversa di uno dei mutanti analizzati (L3) rispetto al ceppo WT ed al restante mutante (L2). Inoltre, durante le analisi, uno dei mutanti, L1, è stato perso, evidenziando una certa instabilità nel mantenimento dei mutanti stessi, nonché una risposta complessa alle condizioni di crescita e, validare ciò sarà utile per future campagne sperimentali. L'esperimento di simulazione della coltura in fotobioreattore su scala di laboratorio ha dimostrato che i mutanti presentano un fenotipo di produzione di biomassa simile a quello del WT. Sembra quindi che l'assenza di *gox* non sia problematica in condizioni di elevata concentrazione cellulare e luce limitata con alta concentrazione di CO₂.

A distanza di tempo dalla prima analisi è stata fatta anche un'ulteriore analisi di RT-PCR sul trascritto del gene *gox*, evidenziando che i mutanti KO analizzati non hanno subito reversione nel tempo.

5.2 IMPLEMENTAZIONE DEL BYPASS SINTETICO

Per evitare il coinvolgimento di meccanismi di trasporto ad altri organelli, come avviene nel processo di fotorespirazione, è essenziale sviluppare il gliossilato (a partire da glicolato) nel cloroplasto perché questa molecola è il primo substrato del pathway BHAC. Normalmente, la fotorespirazione produce gliossilato nel perossisoma tramite l'enzima GOX, utilizzando O₂ come cofattore e generando H₂O₂. Quest'ultimo, però, non può essere metabolizzato nel cloroplasto. Per superare questa limitazione, l'implementazione del bypass prevede l'utilizzo dell'enzima Glicolato Deidrogenasi (GDH), costituito da tre subunità che non richiedono O₂ e non generano H₂O₂.

Per l'implementazione del pathway BHAC sarebbero necessari 5 geni diversi, ma data la difficoltà nell'andare ad eseguire l'inserimento di 5 sequenze diverse in un unico organismo, allora sono stati scelti due geni da inserire che codificano per GDH ed ASGAT. Questi due geni sono sufficienti a detossificare la cellula, in quanto, GDH (proveniente dall'alga *Chlamydomonas reinhardtii*) permette di far reagire il glicolato ed ottenere gliossilato, il quale viene poi utilizzato da ASGAT, reagendo con aspartato, per ottenere ossalacetato e glicina, utili alla produzione di biomassa. Utilizzando solo questi due geni si potrebbe avere una limitazione dai substrati, quindi, in futuro sarà interessante inserire tutti i geni del pathway. I due geni coinvolti nella strategia di implementazione del bypass (GDH e ASGAT) vengono inseriti nel genoma senza utilizzare regioni di omologia, ma l'inserimento avviene casualmente. Questo mira a rendere più semplice l'espressione dei due

geni in *N.gaditana*. È essenziale utilizzare ceppi mutanti di *N. gaditana* che siano KO per il processo endogeno della fotorespirazione nelle prime fasi per indirizzare il flusso metabolico verso il bypass, ma che al contempo garantiscano comunque la presenza di glicolato per alimentare l'attività enzimatica di GDH. Di conseguenza, ho selezionato come candidati gli enzimi coinvolti nelle prime reazioni per bloccare il flusso metabolico della fotorespirazione nativa.

La prima proteina coinvolta nel ciclo della fotorespirazione è l'enzima cloroplastidiale PGLP, specifico per il 2PG, che catalizza la trasformazione di quest'ultimo in glicolato. È necessario mantenere l'attività dell'enzima PGLP e non è idoneo per il KO perché la reazione catalizzata da GDH richiede il glicolato come substrato per ottenere gliossilato. Di conseguenza, è necessario mantenere l'attività dell'enzima PGLP e non è idoneo per il KO.

Il trasportatore BASS6, localizzato nella membrana cloroplastidiale, non è considerato un candidato ideale poiché, in *Arabidopsis*, esiste un trasportatore alternativo del glicolato, il trasportatore plastidiale del glicolato/glicerato (PLGG1/2) (Pick et al., 2013). Quest'ultimo è coinvolto nell'ultimo step della fotorespirazione, trasportando il glicerato nel cloroplasto, ma può anche trasportare il 2PG nel perossisoma. Quindi, il blocco unicamente della proteina BASS6 potrebbe essere insufficiente per interrompere il flusso dei metaboliti; sarebbe necessario un doppio KO per entrambi i geni coinvolti. Inoltre, il BASS6 è coinvolto nel trasporto di numerose molecole e il suo blocco potrebbe generare problemi significativi nel metabolismo cellulare.

Il gene *gox*, invece, codifica per l'ossidasi che converte il glicolato in gliossilato utilizzando O_2 e si localizza nel perossisoma. I perossisomi sono organuli specializzati nella riduzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), come H_2O_2 generato dalla reazione catalizzata da GOX. Questa molecola è tossica e viene metabolizzata da un enzima specifico, la catalasi, che utilizza alcoli per reagire con H_2O_2 , per proteggere la cellula dalla formazione di radicali liberi.

Considerando le problematiche legate al KO dei geni PGLP e BASS6, l'enzima GOX risulta essere il candidato più adatto per bloccare il ciclo endogeno nelle prime fasi e garantire la presenza del substrato necessario per il funzionamento del bypass metabolico da validare.

Quindi, ho deciso di integrare il bypass in un genotipo *gox* KO.

6. CONCLUSIONI

L'obiettivo di questa ricerca consiste nello studio della fotorespirazione in microalghe del genere *Nannochloropsis*. Approfondire la comprensione di questo processo metabolico può fornire le basi per progetti futuri mirati a migliorare la produttività di biomassa da questa microalga e ad espandere le sue potenziali applicazioni industriali. Nonostante l'assenza di studi che confermino la presenza della fotorespirazione in *N. gaditana*, si ipotizza, tramite studi bioinformatici ed i risultati del mio progetto, che questo processo possa essere conservato. Al fine di validare questa ipotesi, è stata utilizzata la strategia CRISPR-Cpf1, in modo da attuare una delezione per il gene responsabile della codifica per l'enzima GOX, che risulta omologo al gene di *A. thaliana* coinvolto nel processo di fotorespirazione. Le cellule di *N. gaditana* sono state trasformate tramite elettroporazione ed è stata sfruttata la ricombinazione omologa per l'inserimento della cassetta di resistenza nel *locus* di interesse. Sono stati isolati 3 ceppi KO per il gene che codifica la proteina GOX, e il loro genotipo è stato validato dall'assenza dell'mRNA della proteina di interesse.

Non ho osservato un fenotipo fotorespiratorio nei mutanti comparati con il ceppo WT. La simulazione di coltura in condizioni industriali ha, invece, evidenziato che i ceppi mutanti producono biomassa tanto quanto il WT.

Dalle analisi risulta anche una riduzione, nei mutanti, nel contenuto dei complessi fotosintetici LHCX1 e VCP1 e, pertanto, ho condotto un'analisi più approfondita sulla funzionalità fotosintetica, mettendo in luce un comportamento anomalo di uno dei due mutanti confrontati con il WT.

Il processo di implementazione del bypass fotorespiratorio, invece, dovrà essere portato avanti per creare i costrutti necessari alla trasformazione e, in seguito, caratterizzare anche i mutanti derivanti.

7. BIBLIOGRAFIA

- Allakhverdiev, S. I., Kreslavski, V. D., Zharmukhamedov, S. K., Voloshin, R. A., Korol'kova, D. V., Tomo, T., & Shen, J.-R. (2016). Chlorophylls d and f and their role in primary photosynthetic processes of cyanobacteria. *Biochemistry (Moscow)*, *81*(3), 201–212. <https://doi.org/10.1134/S0006297916030020>
- Anthropogenic Climate Change, Deforestation and Renewable Energy*. (s.d.). <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=121491>
- Bar-Even, A. (2018). Daring metabolic designs for enhanced plant carbon fixation. *Plant Science*, *273*, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.12.007>
- Barkia, I., Saari, N., & Manning, S. R. (2019).
- Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. *Marine Drugs*, *17*(5), 304. <https://doi.org/10.3390/md17050304>
- Bar-On, Y. M., & Milo, R. (2019). The global mass and average rate of rubisco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(10), 4738–4743. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816654116>
- Blankenship, R. E., & Chen, M. (2013). Spectral expansion and antenna reduction can enhance photosynthesis for energy production. *Current Opinion in Chemical Biology*, *17*(3), 457–461. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.031>
- Cheng, P., Li, Y., Wang, C., Guo, J., Zhou, C., Zhang, R., Ma, Y., Ma, X., Wang, L., Cheng, Y., Yan, X., & Ruan, R. (2022). Integrated marine microalgae biorefineries for improved bioactive compounds: A review. *Science of The Total Environment*, *817*, 152895. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152895>
- Chukhutsina, V. U., Fristedt, R., Morosinotto, T., & Croce, R. (2017). Photoprotection strategies of the alga *Nannochloropsis gaditana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1858*(7), 544–552. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.05.003>
- David L. Nelson, M. M. C. (s.d.). *I principi di biochimica di Lehninger* (Sesta edizione).
- Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., Patyukov, N., & Sukhikh, S. (2020). Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules*, *10*(8), Articolo 8. <https://doi.org/10.3390/biom10081153>
- Draaisma, R. B., Wijffels, R. H., (Ellen) Slegers, P., Brentner, L. B., Roy, A., & Barbosa, M. J. (2013). Food commodities from microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*, *24*(2), 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.012>

Gee, C. W., & Niyogi, K. K. (2017). The carbonic anhydrase CAH1 is an essential component of the carbon-concentrating mechanism in *Nannochloropsis oceanica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(17), 4537–4542. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700139114>

Grouneva, I., Jakob, T., Wilhelm, C., & Goss, R. (2008). A New Multicomponent NPQ Mechanism in the Diatom *Cyclotella meneghiniana*. *Plant and Cell Physiology*, *49*(8), 1217–1225. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn097>

Gupta, D., Bhattacharjee, O., Mandal, D., Sen, M. K., Dey, D., Dasgupta, A., Kazi, T. A., Gupta, R., Sinharoy, S., Acharya, K., Chattopadhyay, D., Ravichandiran, V., Roy, S., & Ghosh, D. (2019). CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sciences*, *232*, 116636. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116636>

James D. Watson, Tania A. Baker, Stephen P. Bell, Alexander Gann, Michael Levine, & Richard Losick. (s.d.). *Biologia molecolare del gene*.
Jerney, J., & Spilling, K. (2020). Large Scale Cultivation of Microalgae: Open and Closed Systems. In K. Spilling (A c. Di), *Biofuels from Algae: Methods and Protocols* (pp. 1–8). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-978-1_130

Kebeish, R., Niessen, M., Thiruveedhi, K., Bari, R., Hirsch, H.-J., Rosenkranz, R., Stähler, N., Schönfeld, B., Kreuzaler, F., & Peterhänsel, C. (2007). Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, *25*(5), Articolo 5. <https://doi.org/10.1038/nbt1299>

Krieger-Liszka, A., & Shimakawa, G. (2022). Regulation of the generation of reactive oxygen species during photosynthetic electron transport. *Biochemical Society Transactions*, *50*(2), 1025–1034. <https://doi.org/10.1042/BST20211246>

Liu, C., & Li, Q. (2023). Air Pollution, Global Warming and Difficulties to Replace Fossil Fuel with Renewable Energy. *Atmospheric and Climate Sciences*, *13*(04), 526–538. <https://doi.org/10.4236/acs.2023.134030>

Makarova, K. S., & Koonin, E. V. (2015). Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. In M. Lundgren, E. Charpentier, & P. C. Fineran (A c. Di), *CRISPR: Methods and Protocols* (pp. 47–75). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9_4

Mutanda, T., Naidoo, D., Bwapwa, J. K., & Anandraj, A. (2020). Biotechnological Applications of Microalgal Oleaginous Compounds: Current Trends on Microalgal Bioprocessing of Products. *Frontiers in Energy Research*, *8*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenrg.2020.598803>

Naduthodi, M. I. S., Mohanraju, P., Südfeld, C., D'Adamo, S., Barbosa, M. J., & van der Oost, J. (2019). CRISPR–Cas ribonucleoprotein mediated homology-directed repair for efficient targeted genome editing in microalgae *Nannochloropsis oceanica* IMET1. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1401-3>

Nelson, M. D., & Fitch, D. H. A. (2011). Overlap Extension PCR: An Efficient Method for Transgene Construction. In V. Orgogozo & M. V. Rockman (A c. Di), *Molecular Methods for Evolutionary Genetics* (pp. 459–470). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-228-1_27

Nilkens, M., Kress, E., Lambrev, P., Miloslavina, Y., Müller, M., Holzwarth, A. R., & Jahns, P. (2010). Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1797*(4), 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.001>

Niyogi, K. K., & Truong, T. B. (2013). Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, *16*(3), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.03.011>

Ort, D. R., Merchant, S. S., Alric, J., Barkan, A., Blankenship, R. E., Bock, R., Croce, R., Hanson, M. R., Hibberd, J. M., Long, S. P., Moore, T. A., Moroney, J., Niyogi, K. K., Parry, M. A. J., Peralta-Yahya, P. P., Prince, R. C., Redding, K. E., Spalding, M. H., van Wijk, K. J., ... Zhu, X. G. (2015). Redesigning photosynthesis to sustainably meet global food and bioenergy demand. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(28), 8529–8536. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424031112>

Ort, D. R., Zhu, X., (朱新广), & Melis, A. (2011). Optimizing Antenna Size to Maximize Photosynthetic Efficiency. *Plant Physiology*, *155*(1), 79–85. <https://doi.org/10.1104/pp.110.165886>

Perin, G., & Morosinotto, T. (2020). Potential of Microalgae Biomass for the Sustainable Production of Bio-commodities. In F. M. Cánovas, U. Lüttge, C. Leuschner, & M.-C. Risueño (A c. Di), *Progress in Botany Vol. 81* (pp. 243–276). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/124_2019_30

Perin, G., Simionato, D., Bellan, A., Carone, M., Occhipinti, A., Maffei, M. E., & Morosinotto, T. (2017). Cultivation in industrially relevant conditions has a strong influence on biological properties and performances of *Nannochloropsis gaditana* genetically modified strains. *Algal Research*, *28*, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.10.013>

Peter, A. P., Yew, G. Y., Tang, D. Y. Y., Koyande, A. K., Chew, K. W., & Show, P. L. (2022). Microalgae's prospects in attaining sustainable economic and environmental development. *Journal of Biotechnology*, 357, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.08.009>

Peterhansel, C., Horst, I., Niessen, M., Blume, C., Kebeish, R., Kürkcüoglu, S., & Kreuzaler, F. (2010). Photorespiration. *The Arabidopsis Book*, 2010(8). <https://doi.org/10.1199/tab.0130>

Pick, T. R., Bräutigam, A., Schulz, M. A., Obata, T., Fernie, A. R., & Weber, A. P. M. (2013). PLGG1, a plastidic glycolate glycerate transporter, is required for photorespiration and defines a unique class of metabolite transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(8), 3185–3190. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215142110>

Poliner, E., Farré, E., & Benning, C. (2018). Advanced genetic tools enable synthetic biology in the oleaginous microalgae *Nannochloropsis* sp. *Plant Cell Reports*, 37. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2270-0>

Production of fatty acid, protein by Nannochloropsis in flat-plate photobioreactors—Responsible Seafood Advocate. (2019, aprile 8). Global Seafood Alliance. <https://www.globalseafood.org/advocate/production-fatty-acids-protein-nannochloropsis-in-flat-plate-photobioreactors/>

Prywes, N., Phillips, N. R., Tuck, O. T., Valentin-Alvarado, L. E., & Savage, D. F. (2023). Rubisco Function, Evolution, and Engineering. *Annual Review of Biochemistry*, 92(1), 385–410. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-040320-101244>

Rapporto Fao, oltre 122 milioni di persone in più soffrono la fame. (2023, luglio 12). euronews. <https://it.euronews.com/2023/07/12/rapporto-fao-oltre-122-milioni-di-persone-in-piu-soffrono-la-fame-nel-mondo>

Raven, J. A. (2009). Contributions of anoxygenic and oxygenic phototrophy and chemolithotrophy to carbon and oxygen fluxes in aquatic environments. *Aquatic Microbial Ecology*, 56(2–3), 177–192. <https://doi.org/10.3354/ame01315>

Schada von Borzyskowski, L., Severi, F., Krüger, K., Hermann, L., Gilardet, A., Sippel, F., Pommerenke, B., Claus, P., Cortina, N. S., Glatter, T., Zauner, S., Zarzycki, J., Fuchs, B. M., Bremer, E., Maier, U. G., Amann, R. I., & Erb, T. J. (2019). Marine Proteobacteria metabolize glycolate via the β -hydroxyaspartate cycle. *Nature*, 575(7783), Articolo 7783. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1748-4>

Schreier, T. B., & Hibberd, J. M. (2019). Variations in the Calvin–Benson cycle: Selection pressures and optimization? *Journal of Experimental Botany*, 70(6), 1697–1701. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz078>

- Simionato, D., Basso, S., Giacometti, G. M., & Morosinotto, T. (2013). Optimization of light use efficiency for biofuel production in algae. *Biophysical Chemistry*, *182*, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.06.017>
- Simionato, D., Block, M. A., La Rocca, N., Jouhet, J., Maréchal, E., Finazzi, G., & Morosinotto, T. (2013). The Response of *Nannochloropsis gaditana* to Nitrogen Starvation Includes De Novo Biosynthesis of Triacylglycerols, a Decrease of Chloroplast Galactolipids, and Reorganization of the Photosynthetic Apparatus. *Eukaryotic Cell*, *12*(5), 665–676. <https://doi.org/10.1128/ec.00363-12>
- Vogler, B. W., Ashford, A., & Posewitz, M. C. (2021). CRISPR/Cas9 disruption of glucan synthase in *Nannochloropsis gaditana* attenuates accumulation of β -1,3-glucose oligomers. *Algal Research*, *58*, 102385. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102385>
- Wahlen, B. D., Willis, R. M., & Seefeldt, L. C. (2011). Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. *Bioresource Technology*, *102*(3), 2724–2730. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.026>
- Whitney, S. M., Houtz, R. L., & Alonso, H. (2011). Advancing Our Understanding and Capacity to Engineer Nature's CO₂-Sequestering Enzyme, Rubisco. *Plant Physiology*, *155*(1), 27–35. <https://doi.org/10.1104/pp.110.164814>
- Whitney, S. M., Sharwood, R. E., Orr, D., White, S. J., Alonso, H., & Galmés, J. (2011). Isoleucine 309 acts as a C4 catalytic switch that increases ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) carboxylation rate in *Flaveria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(35), 14688–14693. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109503108>
- Wilson, R. H., & Whitney, S. M. (2017). Improving CO₂ Fixation by Enhancing Rubisco Performance. In M. Alcalde (A c. Di), *Directed Enzyme Evolution: Advances and Applications* (pp. 101–126). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50413-1_4
- Wolf, B. M., Niedzwiedzki, D. M., Magdaong, N. C. M., Roth, R., Goodenough, U., & Blankenship, R. E. (2018). Characterization of a newly isolated freshwater Eustigmatophyte alga capable of utilizing far-red light as its sole light source. *Photosynthesis Research*, *135*(1), 177–189. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0401-z>
- Yoshino, Y., Endo, S., Chen, Z., Qi, H., Watanabe, G., & Chiba, N. (2019). Evaluation of site-specific homologous recombination activity of BRCA1 by direct quantitation of gene editing efficiency. *Scientific Reports*, *9*(1), Articolo 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38311-x>

Zaidi, S. S.-A., Mahfouz, M. M., & Mansoor, S. (2017). CRISPR-Cpf1: A New Tool for Plant Genome Editing. *Trends in Plant Science*, 22(7), 550–553.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.05.001>

Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V., & Zhang, F. (2015). Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*, 163(3), 759–771.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>

Zhang, P., Ding, Y., Liao, W., Chen, Q., Zhang, H., Qi, P., He, T., Wang, J., Deng, S., Pan, T., Ren, H., & Pan, W. (2013). A simple, universal, efficient PCR-based gene synthesis method: Sequential OE-PCR gene synthesis. *Gene*, 524(2), 347–354.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.126>