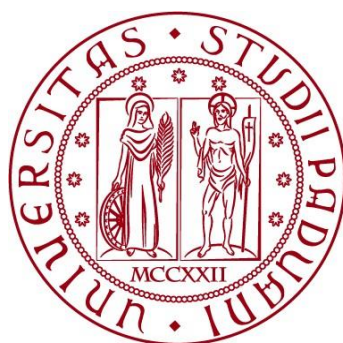


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
PADOVA**

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**Sviluppo di un ceppo di E. coli che espone enzimi per
la degradazione dei PFAS sulla membrana tramite
OmpT troncato**

Tutor: Prof.ssa Marisa Brini
Dipartimento di Scienze del Farmaco

Co-tutor: Dott. Davide Colaianni
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Veronika Anna Rofner

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Sommario

| | | |
|----|--|----|
| 1. | ABSTRACT | 4 |
| 2. | INTRODUZIONE | 5 |
| | 2.1 PFAS: struttura e proprietà chimiche | 5 |
| | 2.2 Stato dell'arte della degradazione dei PFAS | 6 |
| | 2.2.1 Biodegradazione dei PFAS | 6 |
| | 2.3 Un approccio sinergico alla biodegradazione dei PFAS | 7 |
| | 2.3.1 Meccanismo d'azione delle laccasi | 7 |
| | 2.3.2 Meccanismo d'azione delle dealogenasi | 8 |
| 3. | SCOPO DEL LAVORO | 10 |
| 4. | MATERIALI E METODI | 11 |
| | 4.1 Ceppi batterici utilizzati | 11 |
| | 4.2 Plasmide | 11 |
| | 4.3 PCR | 11 |
| | 4.3.1 Mutagenesi PCR | 12 |
| | 4.3.2 PCR nested | 12 |
| | 4.4 Elettroforesi su gel | 13 |
| | 4.5 Gel estrazione | 13 |
| | 4.6 Tecniche di clonaggio | 13 |
| | 4.6.1 Digestione con enzimi di restrizione | 13 |
| | 4.6.2 Ligazione | 13 |
| | 4.6.3 Trasformazione | 14 |
| | 4.7 Sequenziamenti | 14 |
| 5. | RISULTATI | 15 |
| | 5.1 Il sistema di espressione superficiale | 15 |
| | 5.1.1 Impiego di OmpT troncato come carrier | 15 |
| | 5.1.2 Isolamento di OmpT troncato | 17 |
| | 5.2 Assemblaggio della cassetta di espressione | 19 |
| | 5.3 Design del vettore di espressione superficiale | 21 |
| 6. | ESPERIMENTI FUTURI | 22 |
| | 6.1 Verifica dell'espressione enzimatica | 22 |
| | 6.2 Caratterizzazione dell'attività enzimatica | 22 |
| | 6.3 Verifica dell'attività degradativa dei PFAS | 23 |
| | Bibliografia | 24 |

1. ABSTRACT

I PFAS sono noti inquinanti tossici che sono stati dispersi in molte aree del mondo, tra cui il Veneto. L'esposizione prolungata a questi composti è associata a seri rischi per la salute umana, tra cui disfunzioni endocrine, danni al fegato e un aumento dell'insorgenza di alcuni tipi di cancro. Tale situazione di rischio biologico ha anche un forte impatto psicologico sulle popolazioni delle aree contaminate.

Questo elaborato di tesi si inserisce nel più ampio progetto del gruppo studentesco MUTANS (Team iGEM UniPd), il cui obiettivo è applicare i metodi della biologia sintetica per sviluppare un sistema di degradazione dei PFAS. L'approccio proposto consiste nell'ingegnerizzazione di un ceppo di *Escherichia coli* perché esponga sulla sua superficie un enzima degradativo, in particolare una laccasi o una dealogenasi. In prospettiva si prevede di applicare questo sistema alle acque di falda, per ridurre la concentrazione di PFAS.

Nel seguente trattato vengono descritte le procedure sperimentali per l'esposizione degli enzimi di interesse sulla superficie batterica. A tale proposito è stata utilizzata una versione troncata della proteina di membrana esterna OmpT, il cui dominio transmembrana è stato fuso con gli enzimi di interesse in modo che fungesse da motivo di ancoraggio.

2. INTRODUZIONE

2.1 PFAS: struttura e proprietà chimiche

Le Sostanze Per- o Poli-Fluoro-Alchiliche, conosciute come PFAS, rappresentano una vasta famiglia di composti organici sintetici. Questi sono caratterizzati da una catena alchilica idrofobica di lunghezza variabile (da 4C a 16C), parzialmente o completamente fluorinata (almeno due carboni devono avere come unici sostituenti degli atomi di fluoro). Nei PFAS più semplici, tra cui PFOA e PFOS, la catena carbonica è associata a una testa idrofila, costituita da un gruppo funzionale (solfonico in PFOS e carbossilico in PFOA).

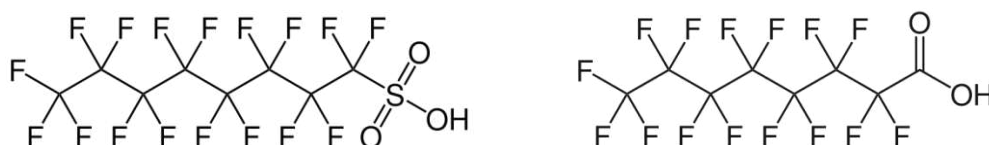


Figura 1. Sono mostrate le strutture chimiche di PFOS (acido perfluorooctansolfonico, a sinistra) e PFOA (acido perfluorooctanoico, a destra), ossia i PFAS più comuni.

L'impiego industriale dei PFAS ha avuto inizio negli anni Quaranta, principalmente per la realizzazione di rivestimenti antiaderenti. La forza del legame C-F e la sua inaccessibilità, dovuta alla conformazione tridimensionale della molecola e all'ingombro sterico degli atomi di fluoro, conferiscono ai PFAS un'eccezionale resistenza sia all'esposizione ad acqua e grassi, che a condizioni termico-chimiche estreme. Queste proprietà li hanno resi estremamente vantaggiosi nella fabbricazione di numerosi oggetti di uso quotidiano, dai cosmetici ai rivestimenti dei cartoni della pizza [1].

Paradossalmente, le stesse caratteristiche chimico-fisiche che ne hanno incentivato l'uso su larga scala, hanno comportato serie conseguenze: la combinazione di alta durevolezza e mobilità di alcuni PFAS (quest'ultima legata alla loro solubilità in acqua), hanno contribuito a una diffusione globale, rendendoli ubiquitari contaminanti nell'ambiente e nei tessuti di animali e piante [2]. I PFAS si disperdono nell'ambiente attraverso molteplici vie, tra le acque reflue industriali non trattate adeguatamente, lo smaltimento improprio dei rifiuti e l'uso di schiume antincendio. Una volta rilasciati nel suolo, subiscono un processo di liscivazione che li porta a contaminare le falde acquifere, causando un incremento progressivo della loro concentrazione nelle fonti di acqua potabile. Questa diffusione costituisce una minaccia significativa per la salute pubblica e per gli ecosistemi acquatici [2].

I PFAS rappresentano un rischio considerevole per la salute umana e per altri organismi anche a causa della loro tendenza al bioaccumulo. Sono inoltre coinvolti in un processo di biomagnificazione: ne sono state rilevate concentrazioni crescenti nei tessuti di animali, man mano che si risale la catena trofica. Il tasso di bioaccumulo varia in base alla specie animale e alla struttura

chimica del PFAS in questione [2]. Nell'uomo, le concentrazioni maggiori sono state rilevate in reni e polmoni, principalmente costituite da un tipo specifico di PFAS (PFBA) [3]. Per questi motivi, l'European Chemicals Agency [4] ha recentemente catalogato i PFAS tra i Persistent Organic Pollutants (POPs), definendoli "inquinanti di origine organica che persistono nell'ecosistema, accumulandosi negli organismi e costituendo un rischio alla salute umana e per l'ambiente".

2.2 Stato dell'arte della degradazione dei PFAS

I PFAS sono conosciuti anche come *forever chemicals*: devono la loro persistenza all'elevata resistenza chimica e termica, che ne ostacola la degradazione. Tra le tecniche più comuni per il trattamento degli inquinanti, mostrano migliori performance nella degradazione dei PFAS l'incinerazione e l'ossidazione elettrochimica (la quale prevede l'applicazione di una corrente elettrica in una soluzione conduttrice, provocando un trasferimento diretto di elettroni dall'inquinante all'anodo) [5]. Tuttavia, questi metodi presentano diversi svantaggi: oltre ad essere aspecifici e costosi, producono sostanze tossiche o reattive come prodotti secondari [6]. Non sono quindi considerabili soluzioni ottimali di biorisanamento, applicabili su larga scala. È quindi di fondamentale importanza e urgenza fare altri studi per trovare strategie di degradazione più efficaci.

2.2.1 Biodegradazione dei PFAS

Rispetto ai trattamenti fisico-chimici per la degradazione di inquinanti, quelli di natura biologica sono generalmente considerati maggiormente efficaci ed ecologicamente sostenibili [7]. Tuttavia, nel caso dei PFAS, la biodegradazione è un processo limitato e raro: interessa solo alcune tipologie e, inoltre, richiede diversi mesi per avvenire [8]. La scarsità di organismi che abbiano evoluto la capacità di degradarli è probabilmente influenzata dalla tossicità dello ione fluoruro, rilasciato in seguito alla rottura del legame tra carbonio-fluoro della catena alchilica. A livello cellulare, infatti, lo ione fluoruro può provocare stress ossidativo, interferire con l'omeostasi redox e alterare l'espressione genica, spesso portando all'apoptosi. Nei batteri, in particolare, i danni cellulari causati sembrano attribuibili all'inibizione dell'attività di enzimi sia essenziali che non- [8]. Un altro fattore fondamentale da considerare per capire l'assenza in natura di un'efficace biodegradazione di PFAS, è la loro origine antropica. Prima della loro invenzione negli anni Quaranta, non esisteva una pressione selettiva favorevole all'evoluzione di vie metaboliche per la degradazione di composti perfluoroalchilici, dato che il legame C-F è estremamente raro in natura [8].

Nonostante la tossicità dei PFAS, legata anche alla loro tendenza al bioaccumulo, alcuni microrganismi sono riusciti ad adattarsi ad essi. Screening ambientali condotti in aree contaminate da PFAS hanno rivelato la presenza di alcuni

microrganismi in grado di sopravvivere in tali condizioni, suggerendo una loro possibile capacità di degradare PFAS o, perlomeno, di integrarli nel proprio metabolismo.

Harris e collaboratori [9] hanno corroborato tale ipotesi, dimostrando l'abilità di crescita del batterio *Delftia acidovorans* in un terreno minimo contenente PFOA, suggerendo che possa essere utilizzato come fonte energetica dal batterio. Altri batteri in cui si è riscontrata la sopravvivenza in terreni contaminati da PFAS sono alcune specie dei generi *Pseudomonas*, *Desulfovibrio* e *Sporumosa* ed *Escherichia coli* [10].

Una delle frontiere più promettenti per la *bioremediation* dei PFAS è la biologia sintetica. Questa disciplina consente l'introduzione di proteine eterologhe, ossia proteine espresse in specie diverse da quelle in cui si trovano naturalmente, in organismi modello facilmente manipolabili in laboratorio. La biologia sintetica permette non solo di ottimizzare l'attività delle proteine esistenti, migliorandone stabilità, performance e ampliandone il range di substrati, ma anche di combinare l'attività di diversi enzimi per migliorare la degradazione complessiva dei PFAS.

Applicando i principi della biologia sintetica, nel lavoro qui presentato è stato ingegnerizzato un ceppo di *E. coli* per esprimere alternativamente l'enzima dealogenasi del batterio Gram negativo *Delftia acidovorans*, o la laccasi del cianobatterio *Synechocystis sp. PCC 6803*. Questo approccio permette di sfruttare un enzima della comprovata capacità di degradare PFAS [11], lavorando con *E. coli*, l'organismo modello più comune in biologia sintetica, ben caratterizzato e di facile manipolazione. La scelta di *E. coli* come ospite si basa anche sulla sua capacità di crescita in terreni contaminati da PFAS [12], una considerazione cruciale per progettare un microrganismo che funga da scavenger sintetico.

2.3 Un approccio sinergico alla biodegradazione dei PFAS

Il tallone d'Achille della biodegradazione microbica dei PFAS consiste nella loro eliminazione incompleta: può produrre composti a catena più corta, ma ancora polifluorinati e quindi persistenti in ambiente [8].

La letteratura scientifica propone laccasi e dealogenasi come migliori candidati per la biotrasformazione dei PFAS [13]; suggerisce inoltre l'uso combinato dei due enzimi, per la potenziale complementarità della loro azione catalitica.

2.3.1 Meccanismo d'azione delle laccasi

Le laccasi sono metalloproteine ampiamente utilizzate nel biorisanamento delle acque reflue, note per la loro bassa specificità di substrato e la capacità di operare in un ampio spettro di temperatura e pH [2]. La loro attività catalitica si basa sulla presenza di quattro ioni rameici nel sito attivo, che accettano elettroni dai substrati e riducono una molecola di ossigeno, formando due molecole d'acqua (con gli

atomi di idrogeno forniti da residui di aspartato e glutammato del sito attivo) [7].

Nei progetti di bioremediation, le laccasi vengono sfruttate per la loro capacità di ossidare una vasta gamma di composti, risultando particolarmente efficaci su fenoli e ammine aromatiche. Sebbene vari studi abbiano dimostrato attività della laccasi su alcuni PFAS, il meccanismo e i prodotti finali della reazione non sono ancora completamente chiari. Analisi di spettrometria di massa suggeriscono che le laccasi possano produrre PFAS a catena più corta rispetto al substrato originale. Per quanto riguarda i PFOA, è stato proposto che le laccasi non ossidino direttamente il composto, ma utilizzino un *mediatore* per generare radicali liberi con forte potere ossidante [14]. Questi radicali possono rimuovere un elettrone dal gruppo carbossilico del PFOA ($C_8HF_{15}O_2$, vedi Figura 1 per la struttura molecolare), innescando una decarbossilazione che genera un radicale di PFAS a catena più corta, come il perfluoroeptilato (C_7F_{15}). Quest'ultimo può subire ulteriori reazioni di idrolisi, con rilascio di una molecola di acido fluoridrico e un fluoruro, formando acido perfluoroesanoico ($C_6F_{13}COOH$) [14].

2.3.2 Meccanismo d'azione delle dealogenasi

Le dealogenasi costituiscono una classe di enzimi che catalizzano la rimozione di atomi di alogeni da molecole organiche; si distinguono tra loro per l'alogeno su cui agiscono e la loro specificità di substrato. La fluoroacetato dealogenasi, ossia la dealogenasi utilizzata in questo progetto, è l'unico enzima noto in grado di scindere i legami C-F: attraverso reazioni di idrolisi, porta alla rimozione di uno ione fluoruro. In natura, utilizza il fluoroacetato come substrato, producendo fluoruro e glicolato. Non è ancora noto il preciso meccanismo: in generale, la dealogenasi effettua un attacco nucleofilo sull'atomo di carbonio secondario dell'acido fluoroacetico, provocando il distacco dello ione fluoruro da quest'ultimo.

Nonostante sia nota l'alta specificità della fluoroacetato dealogenasi per il fluoroacetato, è stata considerata per la biodegradazione dei PFAS, data la somiglianza strutturale del primo con alcuni tipi di perfluoroalchili: presenta un gruppo carbossilico, come i PFOA, e un carbonio secondario che ha un atomo di fluoro come sostituito. Tuttavia, le prove sperimentali condotte in "A Synthetic Biology Approach to PFAS Bioremediation: Preliminary Computational and Molecular Studies on Fluoroacetate Dehalogenase"[15] non hanno rilevato attività di defluorinazione della fluoroacetato dealogenasi su PFAS di lunghezza variabile (in particolare con la catena alchilica di 3, 4 o 8 atomi di carbonio), suggerendo l'effettivo adattamento del sito attivo dell'enzima per molecole molto più piccole e meno fluorinate dei PFAS.

Il progetto presentato in questa tesi sfrutta l'azione combinata di laccasi e dealogenasi; l'idea si basa sull'ipotesi avanzata da Marchetto e collaboratori [13], secondo cui le fluoroacetato dealogenasi potrebbero essere efficaci sui prodotti

intermedi dell'azione delle laccasi, data la somiglianza di questi ultimi con l'acido fluoroacetico. Effettivamente, l'attività enzimatica della dealogenasi di *Delftia acidovorans* (in particolare di DeHa2) è stata rilevata solo su substrati come il monofluorinato e l'etilfluoroacetato [11].

L'obiettivo del progetto è ottenere un effetto sinergico mai sperimentato prima tra questi due enzimi: le laccasi scinderebbero il legame tra due atomi di carbonio, generando due PFAS a catena più corta, i quali verrebbero quindi defluorinati dalle dealogenasi. Questo approccio innovativo potrebbe aprire nuove prospettive nella biodegradazione dei PFAS, superando i limiti delle attuali strategie di bioremediation.

3. SCOPO DEL LAVORO

Questo elaborato di tesi rientra in *SurPFAS*: un progetto ideato dal gruppo studentesco Mutans (<https://mutans.biologia.unipd.it/it/home-2/>), che partecipa alla competizione internazionale di biologia sintetica iGEM 2024 per il settore *Bioremediation*.

Il nome del progetto deriva dalla crasi di “Surface” e “PFAS”, riassumendo l’intento degradativo dell’esposizione degli enzimi sulla superficie batterica. L’obiettivo finale di SurPFAS è infatti la progettazione di un sistema di degradazione dei PFAS, efficace e allo stesso tempo sostenibile. Ciò coinvolge in primo luogo la messa a punto del sistema filtrante, che prevede sia l’ottimizzazione dei filtri attualmente utilizzati che la ricerca di soluzioni di desorbimento chimiche che permettano di staccare i PFAS dal substrato del filtro. Questa fase è fondamentale per permettere la rigenerazione dei filtri e il trasferimento dei PFAS nel bioreattore, dove avverrà la loro degradazione. Nell’ambiente controllato e ottimale del bioreattore saranno coltivati due ceppi di *E. coli*, i quali saranno stati modificati geneticamente per esprimere o una laccasi o una dealogenasi sulla superficie esterna della loro membrana. La scelta degli enzimi da esprimere è avvenuta in seguito a una ricerca nella letteratura scientifica e a un’analisi bioinformatica di proteine omologhe di quelle selezionate e la loro “codon optimisation” per l’espressione in *E. coli*.

L’implementazione di una tecnologia di sensoristica permetterà di monitorare la presenza di PFAS in diversi step del processo di bioremediation che utilizzerà questi ceppi batterici ingegnerizzati, in modo da seguire la degradazione dei contaminanti.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Ceppi batterici utilizzati

Escherichia coli TOP10

Genotipo F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG (ThermoFisher).

Questo ceppo è stato usato per l'estrazione di OmpT-troncato.

Escherichia coli F'

Genotipo [proAB+ lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^R)] Δ (lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1 λ ⁻ (ThermoFisher).

Questo ceppo è comunemente utilizzato in biologia sintetica per l'elevata efficienza di trasformazione. Presenta un gene *lacI*, a differenza di molti altri ceppi di *E. coli*. Il gene *lacI* codifica il repressore del lattosio, che legandosi a lacO, modula l'espressione dei geni sotto il controllo del promotore pTac. F' è stato usato per la costruzione del vettore di espressione superficiale.

4.2 Plasmide

È stato usato il vettore pJump29-1A (codice Addgene: 126978) come backbone, ossia la struttura portante su è stato costruito il nuovo vettore di espressione. È un plasmide a medio numero di copie, contenente 3371 pb, contenente OriV. Presenta come marker di selezione il gene per la resistenza a kanamicina.

4.3 PCR

Le PCR sono state eseguite usando una high fidelity DNA polymerase. La soluzione impiegata nella PCR era così composta: 12,5 μ l Xpert AmpliFi Mastermix 2x (GRISP, Porto, Portogallo), 2 μ l di primer forward (concentrato 5 pmol/ μ l), 2 μ l di primer reverse (concentrato 5 pmol/ μ l) e 0,5-5,0 μ l del DNA templatato (volume scelto in base alla quantificazione al NanoDrop del campione, calcolato per ottenere 50-100ng di DNA nella soluzione finale), con aggiunta di acqua per arrivare a un volume finale di 25 μ l.

L'amplificazione è stata eseguita con un termociclatore, impostato per compiere un ciclo iniziale di 1 minuto a 95°C, nel quale far avvenire la denaturazione del DNA templatato; a questo sono seguiti 25-35 cicli di amplificazione, composti ognuno da 15 secondi a 95°C, 15 secondi alla temperatura di annealing (impostata come la temperatura di melting del primer con T_m più bassa) e 30 secondi per kpb di DNA target a 72°C, per l'estensione. Infine è stata effettuata l'estensione finale, per 3 minuti a 72°C. I prodotti della PCR, quindi, sono stati quantificati con il NanoDrop (NanoDropTMR One/OneC Microvolume UV-Vis, ThermoFisher Scientific) e analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio.

4.3.1 Mutagenesi PCR

Tecnica usata per introdurre mutazioni specifiche in una sequenza di DNA durante la PCR, usando primer mutagenizzati: consistono in primer che presentano dei mismatch, ossia dei cambiamenti di base rispetto alla sequenza templato. Nel momento in cui vengono impiegati in una PCR, la DNA polimerasi amplifica una sequenza contenente la mutazione desiderata: in questo modo, la sequenza replicata a partire dal primer mutagenizzato, presenterà delle mutazioni puntiformi rispetto all'originale.

È stata compiuta una mutagenesi PCR per rimuovere il sito NdeI presente nel vettore pJump29-1A, in quanto questo avrebbe interferito con la costruzione del sistema di espressione (in particolare con l'inserimento di OmpT troncato nella cassetta di espressione, descritto nel paragrafo 5.3). Impiegandovi i primer mostrati in Tabella 1, è stato possibile ottenere la sequenza linearizzata del vettore privato del sito di restrizione (successivamente circolarizzato utilizzando il protocollo di ligazione, descritto nella sezione 4.6.2).

Tabella 1. Primer mutagenizzati disegnati per appaiarsi sulla sequenza del vettore pJump29-1A comprendente il sito NdeI. Rispetto alla sequenza templato, presentano una base modificata: in questo modo il prodotto della mutagenesi PCR in cui saranno impiegati presenterà la sequenza CATAAG, al posto di CATATG (che corrisponde al sito di restrizione di NdeI). In blu le basi che si appaiano al sito NdeI; in rosso sono messi in risalto i mismatch.

| Nome | Sequenza 5' → 3' |
|--------------|--------------------------------------|
| Mut_NdeI_For | CCG CATA AGGTGCACTCTCAGTACAAT |
| Mut_NdeI_Rev | GTGCAC CTAT GCGGTGTGAAATACCG |

4.3.2 PCR nested

La *PCR nested* è stata utilizzata per migliorare la specificità e la sensibilità dell'amplificazione del DNA. In particolare, essa prevede l'esecuzione di due PCR consecutive, utilizzando due coppie di primer differenti: la prima amplificazione (*PCR esterna*) seleziona una regione relativamente ampia del DNA bersaglio, la quale viene usata come templato per la seconda (*PCR interna*), in cui si utilizzano dei primer immediatamente a monte e a valle della sequenza desiderata, chiamati *primer nested*. Questa tecnica permette un aumento di specificità, per la riduzione della probabilità di amplificare sequenze non specifiche, poiché i primer nested si legano a una sequenza nucleotidica notevolmente ridotta rispetto alla sequenza usata come templato per la PCR esterna (in generale, la sequenza esterna dovrebbe presentare circa 500 paia di basi in più rispetto a quella interna, sia a monte che a valle di quest'ultima).

Questa tecnica è stata utilizzata per l'estrazione della sequenza di OmpT troncato dal genoma di *E. coli* Top10, come approfondito nella sezione 5.1.2.

4.4 Elettroforesi su gel

Tutti i gel per elettroforesi sono stati preparati con agarosio all'1% m/V in tampone TAE 1X. Sono stati aggiunti 5 μ L di SYBR Safe DNA Gel Stain 10000X (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ogni 50 mL di gel, in modo da visualizzare le bande di DNA. Sono stati caricati 5 μ L del ladder SharpMass 1kb plus 0,1 μ g/ μ l (Euroclone, Pero, Italy) insieme ai campioni, per permettere una stima delle loro lunghezze in paia di basi.

4.5 Gel estrazione

È stato usato il QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit (QIAGEN, Venlo, Paesi Bassi), seguendo il protocollo proposto per la estrazione da gel con centrifugazione. Il principio su cui si basa il kit è la purificazione dell'oligonucleotide dal frammento di gel corrispondente alla banda (il quale è stato disciolto, riscaldandolo), facendogli attraversare una membrana, presente nelle "colonnine" fornite dal kit. Tale membrana lega il DNA in condizioni di elevata forza ionica del buffer fornito dal kit; il DNA legato alla colonnina viene quindi eluito in seguito ad un lavaggio con un buffer a basso contenuto salino o acqua calda.

È stata compiuta gel estrazione per separare i prodotti delle reazioni di digestione; in particolare è stata compiuta per isolare il *backbone* del vettore pJump29-1A dal suo inserto (sulla reazione di doppia digestione con gli enzimi EcoRI e PstI), nell'ottica di sostituire quest'ultimo con la cassetta di espressione progettata.

4.6 Tecniche di clonaggio

I protocolli di clonaggio in seguito descritti sono stati utilizzati sia nella fase di costruzione del vettore di espressione contenente l'enzima da esprimere, che per l'inserimento in questo di OmpT-troncato.

4.6.1 Digestione con enzimi di restrizione

Per le digestioni di DNA sono stati impiegati i enzimi di restrizione FastDigest (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). La soluzione di reazione era composta da 2 μ L di ogni enzima di restrizione, 2 μ L di FastDigest Green Buffer 10X, un volume di campione a 400-2000 ng di DNA, e una quantità d'acqua tale da arrivare a 40 μ L di volume totale. Questa veniva quindi incubata in un termociclatore a 37°C, per 20 minuti. Non era necessaria la disattivazione termica degli enzimi, dato che la soluzione veniva subito impiegata per la ligazione.

4.6.2 Ligazione

Le ligazioni sono state eseguite con T4 DNA Ligase 1 U/ μ L (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Il volume di reazione era composto da 2 μ L di ligasi, 2 μ L del rispettivo buffer (T4 DNA Ligase buffer 10X) e 16 μ L di DNA. Quest'ultimo comprende sia l'inserto che il vettore: partendo da 40-60 ng

di vettore, si calcola il volume di inserto da prendere per avere un rapporto stechiometrico tra i due che vari da 1:1 a 1:7. Al volume di DNA calcolato, c'è l'aggiunta di acqua per arrivare ai 16 μL . La reazione è stata condotta in un termociclatore a 16°C, overnight; in seguito, è stata disattivata la DNA ligasi, ponendo i campioni a 60°C per un'ora.

4.6.3 Trasformazione

A un'aliquota di batteri competenti del ceppo prescelto, venivano aggiunti 10 μL di soluzione di ligazione. Dopo 30 minuti in ghiaccio, venivano sottoposti a uno shock termico per 1 minuto, ponendoli in un TermoBlocco impostato a 42°C. Successivamente venivano posti nuovamente in ghiaccio, per 1 minuto. Dopo avervi aggiunto 1 ml di terreno LB, i batteri venivano fatti crescere per un'ora a 37°C, in agitazione. Quindi i batteri venivano centrifugati a 10000 rpm per 1 minuto: dopo aver scartato il LB presente nel surnatante, il pellet veniva risospeso e quindi piastrato su piastre contenenti agar-LB con l'antibiotico appropriato per selezionare i batteri trasformati.

4.7 Sequenziamenti

Per accertare l'inserzione della sequenza corretta all'interno del vettore, sono stati compiuti dei sequenziamenti (BMR Genomics, Padova, Italia). Di seguito è riportata la tabella dei primer utilizzati per i sequenziamenti, i quali si appaiano nelle regioni a monte e a valle dell'inserto (rispettivamente nelle regioni chiamate *prefisso* e *suffisso*).

Tabella 2. Primer disegnati per appaiarsi a monte (Primer_PREFIX) e a valle (Primer_SUFFIX) della cassetta di espressione progettata, per verificarne tramite sequenziamento l'inserzione nel plasmide della sequenza desiderata.

| Nome | Sequenza 5' → 3' |
|---------------|------------------------|
| Primer_PREFIX | GAATTCGCGGCCGCTTCTAGAG |
| Primer_SUFFIX | CCTGCAGCGGCCGCTACTAG |

5. RISULTATI

Nel lavoro descritto in questo elaborato, è stato ingegnerizzato un ceppo di *E. coli* per esprimere sulla propria superficie degli enzimi proposti per la degradazione dei PFAS. Questa sezione approfondisce la progettazione sperimentale e i risultati ottenuti nelle diverse fasi del progetto, inclusa la creazione del sistema di ancoraggio e l'isolamento di OmpT troncato.

La scelta di esporre le proteine sulla membrana batterica è stata motivata da diversi fattori. In primo luogo, permette di superare problematiche legate alla permeabilità: sebbene sia noto che i PFAS siano permeabili alla membrana [16], non è altrettanto chiaro se lo siano i prodotti intermedi delle reazioni catalizzate da laccasi e dealogenasi. Pertanto, l'espressione superficiale permette di eliminare l'incognita, poiché i prodotti intermedi vengono direttamente rilasciati nello spazio extracellulare; questo aspetto è cruciale per l'utilizzo combinato e sequenziale dei due enzimi (descritto nella sezione 2.3).

L'espressione superficiale potrebbe inoltre ridurre gli effetti tossici dello ione fluoruro a livello intracellulare, menzionati nel paragrafo 2.2.1.

Infine, l'ancoraggio alla membrana delle laccasi potrebbe migliorarne le prestazioni. La letteratura, infatti, suggerisce che questi enzimi abbiano una maggiore stabilità e lavorino più efficacemente quando sono fissati ad un supporto, piuttosto che in forma libera [7].

5.1 Il sistema di espressione superficiale

Un sistema di espressione superficiale (*display system*) permette l'esposizione stabile di una biomolecola target (*passaggero*), sulla superficie cellulare, mediante la fusione con un motivo di ancoraggio (*carrier*), costituito solitamente da una proteina di superficie ingegnerizzata [17]. La strategia per la costruzione di questo sistema prevede la selezione di una regione contenente un loop esterno della proteina, il quale possa essere troncato per consentirne la fusione alla proteina da esporre sulla superficie. La sequenza codificante l'ancora include anche un *signal peptide*, il quale contiene l'informazione che indirizza la proteina verso la membrana e ne permette l'inserimento [17]. Tale peptide viene rimosso in seguito alla traslocazione della proteina.

In questo progetto, è stato scelto di utilizzare una versione troncata della proteina OmpT come carrier per la presentazione superficiale.

5.1.1 Impiego di OmpT troncato come carrier

L'uso di OmpT troncato come carrier nel display system è supportato dalla letteratura scientifica, che lo identifica come uno dei motivi di ancoraggio più comuni e versatili, capace di esporre sulla superficie di *E. coli* sia piccoli peptidi, come l'His tag, sia proteine di peso molecolare maggiore, come mCherry [17]. Un ulteriore vantaggio è la semplicità di design del suo sistema di esposizione

superficiale: include un peptide segnale per l'esposizione, la sequenza ridotta di OmpT e la sequenza codificante la proteina passeggero da esporre.

OmpT (Outer Membrane Protease) è una proteasi della membrana esterna di *E. coli* che contribuisce alla patogenicità batterica, degradando o processando proteine o peptidi dell'ospite [18]. La proteina matura, composta da 317 amminoacidi, presenta un dominio transmembrana che forma una struttura a β -barile composta da 10 filamenti- β antiparalleli; questi ultimi sono collegati da loop che protrudono dal doppio strato fosfolipidico e costituiscono il sito attivo dell'enzima nello spazio extracellulare. I loop più lunghi sono particolarmente adatti per l'ingegnerizzazione, poiché conferiscono maggiore flessibilità al sistema di esposizione enzimatica [17], fornendo alla proteina ancorata un maggiore spazio di movimento.

Nel sistema ideato in questo progetto, è stato scelto di utilizzare i primi 158 amminoacidi di OmpT, come nel lavoro di Hui e collaboratori [17]. Questa regione include i primi tre filamenti transmembrana e un frammento del terzo loop extracellulare, fino al residuo di aspartato in posizione 158. Quest'ultimo funge da sito di fusione per la proteina passeggero, consentendo l'ancoraggio alla superficie cellulare di proteine che, altrimenti, non verrebbero esposte naturalmente.

Nel display system sviluppato è stato inoltre scelto di utilizzare il peptide segnale nativo di OmpT stesso, comunemente impiegato per favorire la secrezione di una proteina di interesse nello spazio extracellulare, tramite la sua fusione all'estremità N-terminale del target [19]. Poiché questo peptide è naturalmente codificato nella sequenza di OmpT-troncato (in particolare dalle prime 20 triplette nucleotidiche [18]), è stato possibile estrarre l'intera sequenza direttamente dal genoma di *E. coli*, senza necessità di ulteriore ingegnerizzazione.

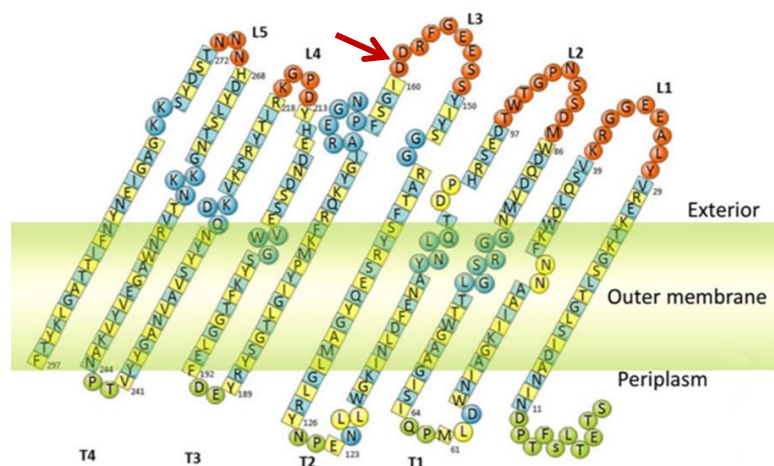


Figura 2. Rappresentazione della sequenza aminoacidica di OmpT, che evidenzia la sua locazione rispetto alla membrana batterica. Una freccia indica il punto in cui OmpT viene troncato, nel terzo loop esterno la nuova estremità C-terminale che protrude verso l'esterno viene fusa con la proteina di interesse, ancorandola alla membrana. Nella rappresentazione non sono inclusi gli amminoacidi codificanti il signal peptide di OmpT, poiché questi vengono rimossi con l'inserimento della proteina nella membrana. Immagine di Hui e collaboratori [17].

5.1.2 Isolamento di OmpT troncato

Per poter utilizzare OmpT troncato come carrier nel sistema di espressione superficiale, è stato necessario isolarlo preliminarmente. Questo è stato ottenuto estraendo il gene dal genoma di *E. coli* Top10, mediante l'uso di primer progettati specificamente con il software Benchling [20]. Nella progettazione dei primer, sono state adottate diverse strategie per ottimizzare il processo di isolamento e per soddisfare i requisiti di un display system. In seguito, vengono descritti in dettaglio gli obiettivi che si intendevano raggiungere e le strategie impiegate:

Tabella 2. Sono mostrate le sequenze dei primer progettati per l'estrazione della sequenza del gene endogeno OmpT di *E. coli*, mediante una nested PCR. Sono riportate le caratteristiche principali dei primer, quali lunghezza in paia di basi, contenuto percentuale in GC e temperatura di melting. Nei primer nested forward (1c) e reverse (1d) sono presenti delle etichette, che segnalano gli elementi particolari inclusi nel design.

| | | |
|----|--|--|
| 1a | <p style="text-align: center;">OmpT fw ampio (19 bp)</p> <p style="text-align: center;">C A C G T C C C A C T A C C T C A A A</p> <p style="text-align: center;">2 4 6 8 10 12 14 16 18</p> | <p>Primer ampio forward 19 bp $\%_{GC} = 52.63$ $T_m = 53.3^\circ$</p> |
| 1b | <p style="text-align: center;">OmpT rev ampio (18 bp)</p> <p style="text-align: center;">G G G T T G C T G T C G C C T A T T</p> <p style="text-align: center;">2 4 6 8 10 12 14 16 18</p> | <p>Primer ampio reverse 18 bp $\%_{GC} = 55.65$ $T_m = 54.1^\circ C$</p> |
| 1c | <p style="text-align: center;">primer NdeI FW (34 bp)</p> <p style="text-align: center;">A A A A C G A T T G A A T G G A G A A C T C A T</p> <p style="text-align: center;">2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24</p> <p style="text-align: right; margin-right: 20px;">NdeI site</p> <p style="text-align: center;">A T G C G G G C G A</p> <p style="text-align: center;">26 28 30 32 34</p> <p style="text-align: left; margin-left: 20px;">NdeI site</p> | <p>Primer nested forward 34 bp $\%_{GC} = 44.12$ $T_m = 64.9^\circ C$</p> |
| 1d | <p style="text-align: center;">primer NdeI RV (48 bp)</p> <p style="text-align: center;">a t a t c a t a t g G C T G C C G C G C G G C A</p> <p style="text-align: center;">2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24</p> <p style="text-align: center;">NdeI site trombin cut site</p> <p style="text-align: center;">C C A G T C T G A A T C C C T C C T C A G A A C</p> <p style="text-align: center;">26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48</p> <p style="text-align: left; margin-left: 20px;">trombi... site complementary sequence</p> | <p>Primer nested reverse 48 bp $\%_{GC} = 56.35$ $T_m = 73.7^\circ C$</p> |

- L'isolamento di OmpT troncato, data la lunghezza relativamente breve della sequenza nucleotidica rispetto all'intero genoma di *E. coli* (534 pb contro 4,6 Mpb [21]), poteva risultare molto difficile e ha richiesto la scelta di una strategia mirata. Per superare questa difficoltà, è stata scelta la PCR nested, che offre vantaggi significativi (approfonditi nella sezione 4.3.2). Nella prima PCR sono stati impiegati i primer esterni (illustrati in 1a e 1b), mentre nella seconda quelli interni (in 1c e 1d). In particolare, il primer nested reverse si

appaia a una regione interna al gene di OmpT, consentendo l'isolamento della sola sequenza desiderata. Dalla PCR nested è stata così ottenuto il prodotto OmpT troncato, la cui concentrazione è stata quantificata con il Nanodrop a 150 ng/μL.

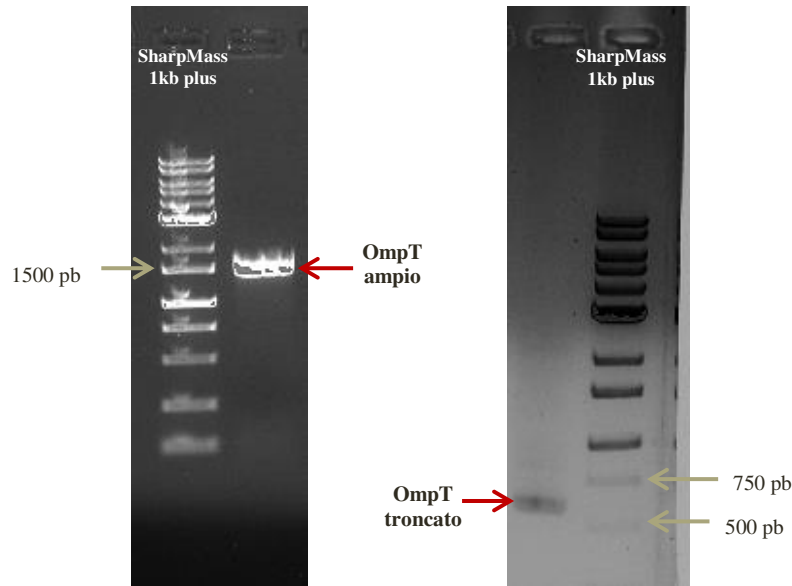


Figura 3. A sinistra: corsa in camera elettroforetica dell'amplificato ampio "OmpT ampio", lungo 1480 pb. A destra: corsa in camera elettroforetica dell'amplificato nested, ossia "OmpT troncato", lungo 534 pb. In entrambi i casi, è stato usato il ladder SharpMass 1kb plus. Questi risultati hanno confermato il successo dell'isolamento di OmpT troncato dal genoma di *E. coli*.

- Per facilitare l'inserimento successivo di OmpT troncato nella cassetta di espressione, sono stati introdotti i siti di taglio NdeI alle estremità del frammento nucleotidico. Questi sono stati inseriti nei primer nested: in particolare, il primer nested forward è stato mutagenizzato per presentare il sito di taglio, mentre quello reverse lo include nella coda. Quando si inserisce un sito di taglio all'estremità di un frammento di DNA, è necessario aggiungere delle basi aggiuntive ai lati del sito di riconoscimento, per garantire una digestione efficiente [22] (nel caso di NdeI, sono necessarie almeno 3 pb aggiuntive).



Figura 4. Sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione NdeI; il suo sito di taglio specifico, marcato in figura con i triangoli, lascia delle sticky ends. Data la presenza nella sequenza riportata di "ATG", il primer nested forward è stato disegnato in modo che questa si appaia proprio con la prima tripletta di OmpT troncato.

- Per garantire la flessibilità necessaria al sistema di espressione superficiale, affinché il passeggero potesse espletare la propria attività catalitica, è stato inserito un linker tra OmpT troncato e la proteina stessa. In pratica, è stata aggiunta una coda al primer nested reverse. Una *coda* è una sequenza oligonucleotidica non complementare al DNA template, la quale viene posizionata all'estremità 5' della parte appaiata primer: in questo modo, le

basi addizionali vengono incorporate nel DNA amplificato. L'oligonucleotide è stato progettato per contenere sia il sito di taglio NdeI (il motivo è descritto nella sezione 5.3) che uno per la trombina.

- Al fine di poter isolare efficacemente l'enzima una volta espresso sulla superficie della membrana batterica, è stato introdotto un sito di taglio per la trombina nel linker (situato a monte del gene codificante l'enzima degradativo). In questo modo, dopo il trattamento del batterio ingegnerizzato con la trombina, il passeggero può essere facilmente isolato sfruttando l'His-tag posto al suo C-terminale. L'isolamento dell'enzima può essere utile per eseguire test enzimatici in vitro o per verificare l'espressione sulla superficie, come descritto nella sezione dedicata agli Esperimenti Futuri (6.2). In particolare, il sito di taglio della trombina inserito è: 5'-GCTGCCGCGCGGCACCAG-3'. La trombina, infatti, riconosce la sequenza amminoacidica Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser e taglia il legame tra arginina e glicina.

A fronte di queste aggiunte, il primer nested reverse ha assunto dimensioni notevoli, pari a 48 paia di basi. Questo ha implicato un aumento della sua temperatura di melting: è stato quindi necessario adattare il primer nested forward a questo parametro, allungandolo a sua volta ($T_mRV=73,3$ °C e $T_mFW=64,9$ °C).

5.2 Assemblaggio della cassetta di espressione

Per la costruzione del vettore di espressione superficiale vero e proprio, è stata assemblata, come punto di partenza, una cassetta di espressione; questa è stata progettata per contenere nell'ordine: un promotore, un sito di legame ribosomiale (RBS), il gene codificante la dealogenasi DeHa2 e un terminatore. La sequenza descritta, priva di terminatore, è stata sintetizzata da una ditta (Integrated DNA Technologies IDT, Coralville, Iowa, USA). Questo oligonucleotide lineare, di 866 pb, è stato inserito all'interno del plasmide pJump29-1A, previa digestione con gli enzimi di restrizione EcoRI e PstI; come terminatore è stato utilizzato quello già presente nel backbone del plasmide.

- **Promotore:** pTac (riferimento registry iGEM: BBa_K864400) è un promotore ibrido, derivato dai promotori trp e lac, i quali sono rispettivamente regolati da triptofano e lattosio. La scelta di utilizzare un promotore inducibile, che richiede la somministrazione di IPTG, è stata effettuata per evitare il sovraccarico metabolico del batterio. È stato infatti osservato che la trasformazione con il plasmide contenente DeHa2 aveva esito positivo nei ceppi F', ma non nei ceppi Top10, suggerendo un possibile effetto tossico dovuto alla sovraespressione di DeHa2. Questo effetto è ottenuto nel ceppo F' come conseguenza dell'espressione costitutiva del gene lacI, la quale porta alla repressione del promotore pTac in assenza di IPTG.
- **RBS:** con un forte sito di legame ribosomiale (riferimento registry iGEM: BBa_B0030), scelto per garantire un'alta efficienza di traduzione.

- **Proteina da esprimere:** la cassetta di espressione è stata inizialmente creata con DeHa2 al suo interno. Questa è una dealogenasi di *Delftia acidovorans*, che ha mostrato promettenti capacità di monodefluorinazione (riferimento registry iGEM: BBa_K3723002) [11].
- **Terminatore:** Lambda T0; è stato utilizzato il terminatore di trascrizione proveniente dal fago lambda per garantire una terminazione efficace della trascrizione.

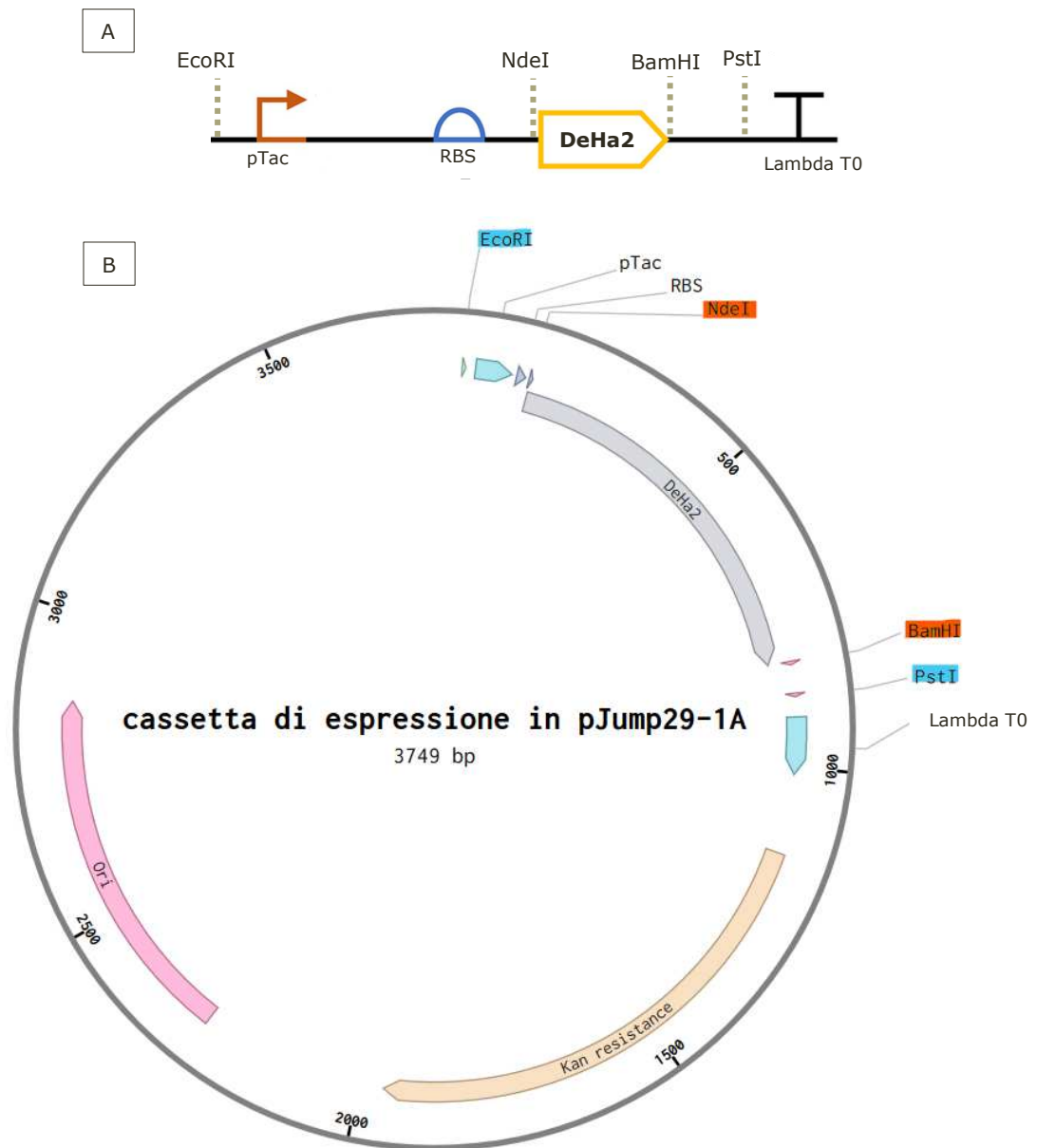


Figura 5. È riportata la cassetta di espressione progettata: in A nella sua forma lineare, con la rappresentazione convenzionale Synthetic Biology Open Language Visual; in B è inclusa nel backbone pJump29-1A, in cui sono presenti il gene per la resistenza alla kanamicina e l'origine di replicazione. In B sono inoltre evidenziati i siti di restrizione utilizzati nell'elaborato (in particolare sono stati usati EcoRI e PstI per l'inserimento della sequenza IDT nel plasmide).

5.3 Design del vettore di espressione superficiale

La cassetta di espressione precedentemente descritta è stata progettata per essere implementata in un vettore di espressione superficiale, con cui trasformare *E. coli*. Utilizzando protocolli di clonaggio descritti in Materiali e Metodi, nella cassetta di espressione sono stati quindi inseriti:

- **Ancora (*OmpT* troncato):** l'inserzione di *OmpT* troncato (estratto da *E. coli* come descritto nella sezione 5.1), è avvenuta tramite la digestione del vettore di espressione con l'enzima di restrizione *NdeI*, che riconosce un sito di taglio posto a monte del gene codificante *DeHa2*. La sequenza di *OmpT* troncato, precedentemente digerita con *NdeI*, è stata poi inserita nel vettore attraverso un processo di ligazione. Tuttavia, l'uso di un solo enzima di restrizione non garantisce un *inserimento direzionato*, poiché le sticky ends lasciate da *NdeI* (mostrate in figura 4) possono permettere l'inserzione sia in direzione 5'→3' che in direzione inversa (3' →5'); quest'ultima compromette l'espressione della corretta proteina. È quindi necessario un sequenziamento per confermare la corretta orientazione dell'inserito.
- **Linker:** questo elemento, inserito come coda nel primer reverse utilizzato per l'isolamento di *OmpT* troncato, viene implementato nel display system nel momento in cui viene inserita l'ancora stessa.
- **Proteina passeggero:** la cassetta è stata disegnata in modo tale da poter facilmente cambiare il gene codificante la proteina passeggero. Ciò è reso possibile dalla digestione con gli enzimi di restrizione *NdeI* e *BamHI*, i cui siti di taglio sono stati posti rispettivamente a monte e a valle del gene codificante *DeHa2*. Le sequenze degli enzimi degradativi da inserire, eccetto *DeHa2* già presente nella cassetta, sono state ordinate (Integrated DNA Technologies IDT, Coralville, Iowa, USA) con i siti di restrizione appropriati già inseriti nelle loro estremità.

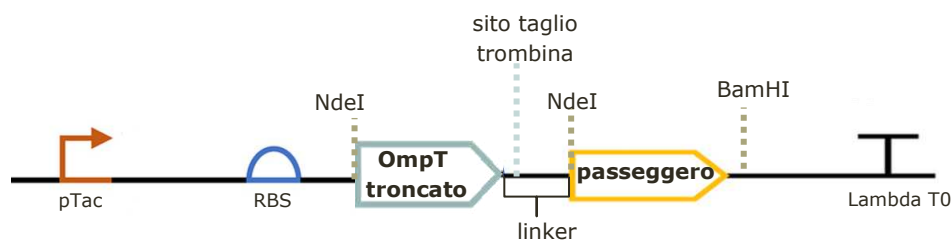


Figura 6. Architettura della cassetta di espressione da implementare nel vettore di espressione superficiale (rappresentazione con convenzione Synthetic Biology Open Language Visual); questa permette di esprimere un peptide costituito da *OmpT* troncato (carrier) collegato tramite un linker a un enzima degradativo (passeggero). Sono rappresentati anche i siti di taglio sfruttabili nel sistema di espressione superficiale. In particolare si può cambiare il gene del passeggero tramite *EcoRI* e *BamHI* e si può isolare l'enzima esposto attraverso il taglio con la trombina.

6. ESPERIMENTI FUTURI

Una volta completata la costruzione del sistema di espressione superficiale, il vettore verrà utilizzato per trasformare un ceppo di *E. coli*. Sono in programma una serie di esperimenti per confermare l'effettiva espressione delle proteine sulla superficie e per caratterizzare la loro attività enzimatica. Verrà inoltre testata l'espressione a livello intracellulare (eliminando OmpT troncato e il linker dal vettore di espressione superficiale, tramite digestione con NdeI), in modo da confrontare le performance degli enzimi quando presenti nel citosol e quando ancorati alla superficie batterica.

6.1 Verifica dell'espressione enzimatica

Per verificare l'espressione della proteina d'interesse, i batteri verranno lisati e sottoposti a centrifugazione, in modo da poter analizzare il surnatante ottenuto tramite SDS-page (tecnica di laboratorio che prevede la separazione di proteine di diverso peso molecolare, sfruttando l'elettroforesi su gel di poliacrilammide denaturante). Nel caso di espressione intracellulare, ci si aspetta di osservare una banda del peso molecolare dell'enzima, mentre per l'espressione superficiale, una banda che rifletta il peso molecolare di OmpT sommato a quello dell'enzima espresso.

Un controllo più specifico delle proteine esposte verrà effettuato sfruttando il sito di taglio della trombina inserito nel linker (scindendo la proteina dal complesso di ancoraggio). In questo caso, senza la lisi batterica, i batteri verranno trattati con la trombina e poi centrifugati. L' SDS-page verrà effettuata sia sul surnatante che sul pellet: nel primo caso si dovrebbe osservare una banda corrispondente al peso molecolare dell'enzima espresso e una a quello della trombina; nel pellet, sostanzialmente costituito dai batteri, saranno trattati come descritto in precedenza, per estrarne il contenuto: si dovrebbe vedere una banda corrispondente al peso di OmpT troncato, rimasto nella membrana.

Il controllo negativo verrà effettuato con una coltura batterica ingegnerizzata senza induzione con IPTG: l'analisi con SDS-page non dovrebbe mostrare bande corrispondenti ai pesi molecolari considerati, dato che non dovrebbe avvenire l'espressione del costrutto.

6.2 Caratterizzazione dell'attività enzimatica

Dopo aver confermato l'espressione enzimatica, sarà necessario accertarsi della loro funzionalità. L'attività enzimatica verrà analizzata in primo luogo su *substrati reliable*, ossia substrati che vengono trasformati dall'enzima stesso in modo noto e prevedibile, tramite test secondo i protocolli standard. Per le laccasi, si utilizzerà il Syringaldazine (SGZ) e per le dealogenasi il cloroacetato. L'attività della laccasi su SGZ sarà verificata tramite spettrofotometria, mentre quella della dealogenasi sul cloroacetato tramite cromatografia liquida.

6.3 Verifica dell'attività degradativa dei PFAS

Una volta accertata l'effettiva attività dei ceppi clonati con il vettore di espressione superficiale disegnato, ne verrà testata la degradazione dei PFAS. I batteri ingegnerizzati verranno coltivati in un terreno LB contenente PFOA o PFOS: se si verificherà la diminuzione delle loro concentrazioni significherà che l'enzima avrà degradato (almeno in parte) le sostanze inquinanti. I prodotti di degradazione verranno analizzati con la spettrometria di massa.

Un confronto con le prestazioni sui *substrati reliable* fornirà preziose informazioni sull'efficacia dei due enzimi nella degradazione dei PFAS. Verrà anche testata l'azione sinergica di laccasi e dealogenasi, co-coltivando i due ceppi di *E. coli* ingegnerizzati.

Se questi esperimenti dimostreranno l'efficienza del sistema di espressione nel degradare i PFAS, si apriranno nuove prospettive per il biorisanamento. Inoltre, la scoperta di un'azione sinergica tra laccasi e dealogenasi rappresenterebbe un passo significativo verso la comprensione della loro attività, la quale è fondamentale per sviluppare un sistema degradativo ancora più efficace.

Bibliografia

- [1] Glüge et al., «An overview of the uses of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS),» *Environmental Science: Processes & Impacts*, vol. 12, 2020.
- [2] Ahrens e Bundschuh, «Fate and effects of poly- and perfluoroalkyl substances in the aquatic environment: A review,» *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 33, pp. 1921-1929, 2014.
- [3] Pérez et al., «Accumulation of perfluoroalkyl substances in human tissues,» *Environment International*, vol. 59, pp. 354-362, 2012.
- [4] «European Chemical Agency,» [Online]. Available: <https://echa.europa.eu/understanding-pops>. [Consultato il giorno 05 08 2024].
- [5] Meegoda et al., «A Review of PFAS Destruction Technologies,» *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 19, n. 24, p. 16397, 2022.
- [6] Liu et al., «Perfluoroalkyl substances (PFASs) in leachate, fly ash, and bottom ash from waste incineration plants: Implications for the environmental release of PFAS,» *Science of The Total Environment*, vol. 795, p. 148468, 2021.
- [7] Dong et al., «Laccase: A potential biocatalyst for pollutant degradation,» *Environmental Pollution*, vol. 319, p. 120999, 2023.
- [8] Wackett, «Nothing lasts forever: understanding microbial biodegradation of polyfluorinated compounds and perfluorinated alkyl substances,» *Microbial Biotechnology*, vol. 15, n. 3, pp. 773-792, 2022.
- [9] Harris, «Engineering and characterization of dehalogenase enzymes from *Delftia acidovorans* in bioremediation of perfluorinated compounds,» *Synthetic and Systems Biotechnology*, vol. 2, pp. 671-676, 2022.
- [10] «Microbes take the 'forever' out of 'forever chemicals',» *Nature*, vol. 618, 2023.
- [11] Farajollahi et al., «Defluorination of Organofluorine Compounds Using Dehalogenase,» *ACS OMEGA*, vol. 9, pp. 28546-28555, 2024.
- [12] Young et al., «A Synthetic Biology Approach Using Engineered Bacteria to Detect Perfluoroalkyl Substance (PFAS) Contamination in Water,» *Military Medicine*, vol. 186, pp. 801-807, 2021.
- [13] Marchetto et al., «Bioremediation of Per- and Poly-Fluoroalkyl Substances (PFAS) by *Synechocystis* sp. PCC 6803: A Chassis for a Synthetic Biology Approach,» *Life*, vol. 11, p. 1300, 2021.
- [14] Luo et al., «Laccase-Catalyzed Degradation of Perfluorooctanoic Acid,» *Environmental Science & Technology Letters*, vol. 2, pp. 198-203, 2015.
- [15] Vascon e Fillippini, «A Synthetic Biology Approach to PFAS Bioremediation: Preliminary Computational and Molecular Studies on Fluoroacetate Dehalogenase,» *Tesi magistrale, Università degli Studi di Padova*, 2019.
- [16] Kleszczyński e Składanowski, «Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids.: I. Alteration in plasma membrane potential and intracellular pH level,» *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 3, pp. 300-305, 2009.
- [17] Hui et al., «Development of a novel bacterial surface display system,» *Biotechnological Letters*, vol. 41, n. 6-7, pp. 763-777, 2019.
- [18] Kramer et al., «In vitro folding, purification and characterization of *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT,» *European Journal of Biochemistry*, vol. 267, n. 3, pp. 885-893, 2001.
- [19] iGEM16_Harvard_BioDesign, «ompT + PETase (PET-degrading enzyme, origin I.

- sakaiensis),» 2016. [Online]. Available: https://parts.igem.org/Part:BBa_K2010001. [Consultato il giorno 30 07 2024].
- [20] «Benchling,» [Online]. Available: <https://www.benchling.com/>. [Consultato il giorno 01 09 2024].
- [21] G. National Center for Biotechnology Information (NCBI, «Escherichia coli K-12 substr. MG1655, complete genome,» 2024. [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000005845.2/. [Consultato il giorno 19 07 2024].
- [22] New England Biolabs, «New England Biolabs,» [Online]. Available: <https://www.neb.com/en/tools-and-resources/usage-guidelines/cleavage-close-to-the-end-of-dna-fragments>. [Consultato il giorno 18 06 2024].